



**HAL**  
open science

# Étude de la physiopathologie de l'infection Chikungunya en phase aiguë et chronique chez l'homme

Marie-Christine Jaffar-Bandjee

► **To cite this version:**

Marie-Christine Jaffar-Bandjee. Étude de la physiopathologie de l'infection Chikungunya en phase aiguë et chronique chez l'homme. Sciences agricoles. Université de la Réunion, 2010. Français. NNT : 2010LARE0014 . tel-00671277

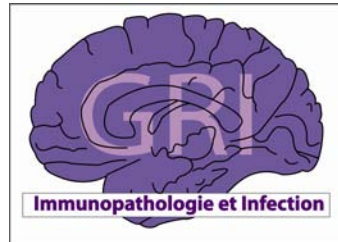
**HAL Id: tel-00671277**

**<https://theses.hal.science/tel-00671277>**

Submitted on 17 Feb 2012

**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.



THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LA REUNION

Ecole Doctorale Interdisciplinaire

Spécialité Biologie Médecine Santé

Présentée par Mme Marie-Christine LAW-YE, JAFFAR-BANDJEE

Le 12 octobre 2010

Dirigée par le Professeur Philippe GASQUE

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de la Réunion

Etude de la physiopathologie de l'infection chikungunya en phase aiguë  
et chronique chez l'homme

Jury composé de :

Pr Jacques IZOPET, Toulouse

Rapporteur

Dr Philippe DESPRES, Paris

Rapporteur

Pr Denis MALVY, Bordeaux

Examineur

Pr Xavier de LAMBALLERIE, Marseille

Examineur, co-directeur de thèse

Pr Pascale GUIRAUD, La Réunion

Examineur

Pr Philippe GASQUE, La Réunion

Directeur de thèse



**Résumé:**

Chikungunya est un *alphavirus* transmis par les moustiques (*Aedes*) et qui provoque de la fièvre, des éruptions cutanées, des myalgies et des arthralgies. La maladie (CHIKVD) est transitoire, mais des formes sévères menant à des arthrites chroniques incapacitantes ont été signalées.

Nous avons dans un premier temps étudié prospectivement les paramètres cliniques et immunologiques associés à la maladie chez des patients hospitalisés et identifiés comme étant 'guéris' ou 'chronique' à M12 après l'infection. Dans la deuxième partie, nous avons observé *in vitro* les mécanismes et le rôle de l'apoptose dans le processus infectieux permettant au virus de persister dans les sanctuaires tissulaires.

En phase aiguë, une forte réponse immune dominée par une activation des cellules NK/dendritique/cellules T, la production d'anticorps spécifiques et une faible production de cytokines Th1 > Th2 a été observée mais sans aucune différence significative entre les deux groupes. Cependant, la virémie initiale s'est révélée beaucoup plus élevée dans le groupe chronique est nous avons pu identifier du matériel viral dans les macrophages du tissu synovial d'un patient chronique post-CHIKVD (M18).

Dans la deuxième partie de l'étude, nous avons constaté que CHIKV est capable d'induire l'apoptose par la voie intrinsèque et extrinsèque et également par un mécanisme 'bystander'. De plus, nous avons observé que le CHIKV présent dans des corps (blebs) apoptotiques était capable d'infecter les cellules voisines (Hela et macrophage MM6). Notre étude a permis de mettre en évidence pour la première fois que CHIKV contrôle et détourne à son profit les mécanismes de défense anti-infectieux.

Mots- clés : Chikungunya, alphavirus, immunité innée, immunité adaptative, arthrite chronique, apoptose

Summary:

**Physiopathology of chikungunya in acute and chronic stages of the disease in human.**

Chikungunya is an *Alphavirus* transmitted by mosquitoes (*Aedes*) and which causes fever, rash, myalgia and arthralgia. The disease (CHIKVD) is transient but severe forms leading to chronic incapacitating arthritis have been reported.

The study involved first a prospective cohort study of hospitalized patients from Reunion Island subsequently categorized into ‘recovered’ or ‘chronic arthralgia’ groups at M12 post infection. Clinical and immunological parameters were measured throughout the disease course. In part two, we addressed *in vitro* the role of apoptosis in the infection process and particularly to ascertain the mechanisms allowing the virus to persist in tissue sanctuaries.

We observed that a rapid immune antiviral response was evidenced by the robust dendritic/NK//T cell activation and accompanied by a specific IgM/IgG response and a rather weak Th1/Th2 cytokine response in both groups. The viremia was much more pronounced in the chronic group and, critically, we found that CHIKV was persisting (M18) in perivascular synovial macrophages. Fibroblast hyperplasia, strong angiogenesis and acute cell deaths were observed in the injured synovial tissue.

In the second part of the study, we found that CHIKV was able to trigger apoptosis through intrinsic and extrinsic pathways. Bystander apoptosis was also evidenced in neighboring cells in a caspase 8-dependent manner. Remarkably, CHIKV hiding into apoptotic blebs was able to infect neighboring cells and these events were inhibited specifically by inhibitors of caspases, blebbing and engulfment.

We herein describe a novel mechanism by which CHIKV invades and escapes the host immune response and contribute to chronic arthralgia/arthritis.

Keywords : Chikungunya, alphavirus, innate, immunity, adaptive immunity, chronic arthritis, apoptosis

**A ma famille**

**Mon mari**

**Et mes enfants**

**A la mémoire de mon grand-père arrivé à la Réunion en 1925**

**A la mémoire d'Ayoub, avec qui j'aurais aimé partager ce moment**

## REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu le Pr Philippe GASQUE, qui a su réveiller en moi un vieux rêve, me remettre sur la voie de la thèse. Ta perpétuelle bonne humeur, gentillesse, optimisme et compétences m'ont permis de garder le cap. Je n'aurai jamais assez de mots pour te remercier. Ce fut un vrai plaisir de travailler avec toi !

Je remercie les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail, à commencer par ceux qui ont bien voulu se déplacer de la Métropole. Je remercie tout particulièrement mes rapporteurs, le Pr Jacques IZOPET et le Dr Philippe DESPRES, pour le temps consacré à examiner et évaluer ce manuscrit. Je remercie également le Pr Pascale GUIRAUD, le Pr Denis MALVY et le Pr Xavier de LAMBALLERIE qui ont également accepté d'examiner mon travail.

Un petit mot supplémentaire à l'attention du Pr MALVY pour ses marques de sympathie et d'amitié qu'il me manifeste à chacune de ses visites Outre-Mer et au Pr de LAMBALLERIE pour avoir accepté d'être le co-directeur de cette thèse.

Merci à toute l'équipe du GRI (Groupe de Recherche Immunopathologie et maladies infectieuses) qui m'a fait partager des moments très forts avec la mise en place du laboratoire en Juillet 2006 tout d'abord au CHD dans notre « cage d'ascenseur » puis au CYROI. Merci tout particulièrement au Dr Jean-Jacques Hoarau pour sa gentillesse, sa disponibilité, toujours là pour dépanner et trouver une solution. Merci au Dr Pascale Krejbich-Trotot pour nos longues discussions, et la relecture de la thèse. Merci aussi à Gyslaine pour son dévouement et ses « petites mains » rapides ! Merci à Claudine, l'artiste, pour sa contribution aux tableaux et aux schémas !

Merci à tous les amis Afsa, Anne, Catherine, Françoise, Gilberte, Karl, Linda, Marie-Anne, Marianne, Marie-Claude, Sonia, et tous les autres,... qui m'ont toujours encouragée dans cette entreprise et apporté leur soutien.

Merci à Zen, mon compagnon de fortune et d'infortune, qui a su me supporter, me reconforter et avec qui je partage ce dénouement !

Mes pensées à Tannvir, Mourad et Myriam, toujours présents près de moi, qui m'ont toujours encouragée dans cette entreprise !

Si j'y suis arrivée, c'est grâce à vous !

## Table des matières

<b>. Le virus Chikungunya.....</b>	<b>20</b>
<b>.1 Taxonomie et classification.....</b>	<b>20</b>
<b>.2 La structure .....</b>	<b>24</b>
<b>.3 L'organisation génomique.....</b>	<b>24</b>
<b>.4 Les protéines non structurales (nsP): .....</b>	<b>27</b>
.4.1 NsP1 : .....	27
.4.2 NsP2 : .....	27
.4.3 NsP3 : .....	28
.4.4 NsP4 : .....	28
<b>.5 Les protéines structurales.....</b>	<b>29</b>
.5.1 La protéine capside : .....	29
.5.2 La glycoprotéine E1 : .....	29
.5.3 Les glycoprotéines E2 et E3 : .....	30
.5.4 La petite protéine 6K : .....	30
<b>.6 La replication.....</b>	<b>31</b>
<b>. Le Vecteur.....</b>	<b>33</b>
<b>.1 Aedes, vecteur du CHIK.....</b>	<b>34</b>
<b>.2 Aedes Albopictus .....</b>	<b>36</b>
.2.1 Son aire géographique .....	36
.2.2 Biologie du vecteur : .....	38
.2.2.1 La plasticité physiologique : .....	38
.2.2.2 La plasticité écologique : .....	39
.2.2.3 Interaction avec les espèces résidentes : .....	40

.3	<b>Le réservoir .....</b>	<b>41</b>
.4	<b>Interactions Vecteur-Virus.....</b>	<b>42</b>
.	<b>Les épidémies.....</b>	<b>43</b>
.1	<b>Historique.....</b>	<b>43</b>
.2	<b>L'épidémie 2005-2006 dans les îles de l'Océan Indien et son extension.....</b>	<b>45</b>
.3	<b>La circulation des virus depuis l'épidémie de 2004 dans l'Océan Indien .....</b>	<b>46</b>
.4	<b>L'épidémie de la Réunion .....</b>	<b>48</b>
.	<b>Le tropisme cellulaire : données des études sur modèles cellulaires et de l'expérimentation animale.....</b>	<b>49</b>
.1	<b>Mécanisme infectieux cellulaire du CHIKV et modèles cellulaires:.....</b>	<b>50</b>
.2	<b>Expérimentation chez la souris .....</b>	<b>57</b>
.3	<b>Expérimentation chez le macaque (<i>Macaca fascicularis</i>) :.....</b>	<b>60</b>
.	<b>La maladie chikungunya chez l'homme .....</b>	<b>68</b>
.1	<b>Tableau clinique usuel .....</b>	<b>69</b>
.2	<b>Signes cliniques non classiques.....</b>	<b>72</b>
.3	<b>Formes émergentes graves du CHIKV chez l'adulte.....</b>	<b>72</b>
.3.1	<b>Formes neurologiques :.....</b>	<b>73</b>
.3.2	<b>Des formes hépatiques: .....</b>	<b>73</b>
.4	<b>Rhumatisme chronique post-CHIKV.....</b>	<b>73</b>
.5	<b>Formes émergentes du nouveau-né et de l'enfant.....</b>	<b>76</b>
.5.1	<b>Description de la transmission verticale materno-néonatale .....</b>	<b>76</b>
.5.2	<b>Caractéristiques cliniques en pédiatrie :.....</b>	<b>77</b>
.6	<b>Diagnostic au laboratoire.....</b>	<b>78</b>

.6.1	Mise en évidence du virus : .....	78
.6.2	Sérologie : .....	79
<b>.7</b>	<b>Traitements .....</b>	<b>81</b>
.7.1	Traitements symptomatiques .....	81
.7.2	Immunothérapie .....	82
.7.2.1	Immunothérapie passive .....	82
.7.2.2	Les pistes vaccinales .....	82
<b>.8</b>	<b>Mesures de prévention .....</b>	<b>83</b>
<b>.</b>	<b>Réponse immunitaire protectrice contre l'infection par les alphavirus... 85</b>	
<b>.1</b>	<b>Scénario probable de l'initiation de la réponse immunitaire .....</b>	<b>85</b>
<b>.2</b>	<b>Les molécules permettant d'engager la réponse immunitaire innée .....</b>	<b>87</b>
.2.1	La réponse immune innée .....	87
.2.2	Les TLRs impliqués dans la lutte antivirale .....	90
.2.2.1	Structure et localisation des TLRs .....	90
.2.2.2	PAMPs des alphavirus reconnus par les TLR .....	90
.2.2.3	Activation des TLRs .....	90
.2.3	Les hélicases RLRs impliquées dans la lutte anti-virale .....	92
.2.3.1	Caractérisation de RIG-I et de MDA-5 .....	92
.2.3.2	Domaines fonctionnels : .....	95
.2.3.3	Modulation de la reconnaissance par RIG-I .....	95
.2.4	Activation de la voie de signalisation IPS-1 et production de cytokines : .....	96
.2.5	Les récepteurs NLRs et infection virale .....	97
.2.6	La diversité de la réponse cellulaire par une distribution différente des senseurs : .....	97
.2.7	Les interférons (IFN) et leurs récepteurs .....	98
.2.8	Les protéines antivirales : .....	101

.2.8.1	PKR (dsRNA dependant protein kinase) : .....	102
.2.8.2	2'5'-oligoadénylate synthétases (OAS).....	103
.2.8.3	Protéines MX.....	103
.2.8.4	Les autres protéines anti-virales .....	104
.2.9	Les chimiokines et les cytokines inflammatoires : .....	104
<b>.3</b>	<b>Les cellules de l'immunité innée et infection par les alphavirus.....</b>	<b>105</b>
.3.1	Les cellules dendritiques et les monocytes-macrophages .....	105
.3.2	Les cellules NK .....	107
.3.3	Le fibroblaste .....	109
<b>.4</b>	<b>L'apoptose.....</b>	<b>109</b>
<b>.5</b>	<b>La réponse immune acquise après une infection par les alphavirus .....</b>	<b>112</b>
.5.1	Les cellules T cytotoxiques (LTc, CD8+) : .....	112
.5.2	Les cellules T Helper ou auxiliaires (LTh, CD4+) : .....	113
.5.3	Les cellules B et la réponse anticorps (Ac) : .....	113
<b>.6</b>	<b>Stratégies d'évasion des alphavirus .....</b>	<b>114</b>
.6.1	Interférence dans les mécanismes de détection : .....	115
.6.2	Inhibition de la production et de la voie de signalisation de l'IFN .....	115
.6.3	Modulation de l'apoptose .....	116
<b>.</b>	<b>Immunopathologie des atteintes articulaires à alphavirus .....</b>	<b>116</b>
<b>.1</b>	<b>Atteintes articulaires après une infection alphavirale .....</b>	<b>117</b>
.1.1	Le modèle souris de l'arthrite/arthralgie à RRV : .....	117
.1.2	La pathologie arthrite/arthralgie à RRV chez l'homme : .....	118
<b>.2</b>	<b>Rôle des macrophages dans l'inflammation chronique post-infectieuse.....</b>	<b>119</b>
<b>.3</b>	<b>Rôle des médiateurs solubles:.....</b>	<b>119</b>
<b>.4</b>	<b>Rôle des cellules T : .....</b>	<b>120</b>



.5	<b>Phénomène d’ADE et infections chroniques à alphavirus :</b> .....	<b>121</b>
.6	<b>Persistance virales et conséquences immunologiques :</b> .....	<b>123</b>
.	<b>Objectifs et hypothèses de travail</b> .....	<b>124</b>
.	<b>Résultats</b> .....	<b>128</b>
	1: Chikungunya virus takes centre stage in virally-induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis.....	128
	2 : Emergence and clinical insights into the pathology of Chikungunya virus infection. ....	147
	3: Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response.....	165
	4: Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defence. ....	193
.	<b>Discussion générale</b> .....	<b>210</b>
.	<b>Perspectives</b> .....	<b>218</b>
.	<b>Conclusions générales</b> .....	<b>221</b>

## Liste des Figures

1. Arbre phylogénétique des alphavirus (Luers, Adams et al. 2005) .....	23
2. Organisation du génome du CHIKV et les produits des gènes .....	25
3. L'organisation du génome et grandes fonctions des protéines des alphavirus (Powers, Brault et al. 2001).....	31
4. Photo d'Ae. albopictus .....	36
5. Distribution mondiale du CHIKV (endémique en jaune hachuré, cas importés en bleu) et d'Aedes albopictus (avant 1980 en vert et après 1980 en rose). Adapté de (Powers and Logue 2007) et de (Charrel, de Lamballerie et al. 2007) .....	37
6. La réponse immune localisée au niveau du site infectieux contre les alphavirus. ....	86
7. Les trois familles de récepteurs (TLR, RLR et NLR) de l'immunité innée impliquées dans la reconnaissance et la réponse contre les virus. ....	88
8. Reconnaissance des virus par les RLRs et voies de signalisation.....	94
9. Changement de conformation et activation du domaine de CARD (Caspase activation recrutement domain) .....	96
10. Les différents types d'interférons et leurs récepteurs couplés à des kinases. ....	100
11. La réponse interféron de type I permet d'induire de multiples protéines antivirales (PKR, Mx, OAS...). Cette réponse peut cependant être contrôlée à tous les niveaux par différentes protéine virales pour échapper ainsi au système immunitaire innée.....	101
12. Cellules de l'immunité innée engagées dans la réponse antivirale (IFN- $\alpha$ , perforine, granzyme) avec la production de cytokines permettant d'initier la réponse immune acquise (CD4/CD8 et la production d'anticorps neutralisants).....	108
13. Les différentes voies de l'apoptose (extrinsèque et intrinsèque) .....	111

## Liste des tableaux

<b>I.</b> Alphavirus responsables de pathologies humaines.....	22
<b>II.</b> Infection, réplication et réponse cellulaire au CHIKV.....	52
<b>III.</b> Modèle expérimental d'infection par le CHIKV chez la souris et chez le singe (macaque adulte).....	63
<b>IV.</b> Caractéristiques cliniques principales observées chez 157 patients présentant une infection à CHIKV ( issu de (Borgherini, Poubé et al. 2007)). .....	71

Liste des Abréviations :

Ac	<b>anticorps</b>
ADAR	<b>adenosine deaminase acting RNA</b>
ADCC	<b>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</b>
ADE	<b>antibody-dependent enhancement</b>
ADN	<b>acide déoxyribonucléique</b>
ADNc	<b>ADN complémentaire</b>
Ae	<b>Aedes</b>
AINS	<b>anti-inflammatoire non stéroïdien</b>
ALAT	<b>alanine amino transférase</b>
Anti-CCP	<b>Anti-corps anti-peptides cycliques citrullinés</b>
AP-1	<b>activating protein-1</b>
Apaf	<b>apoptotic protease activating factor 1</b>
APC	<b>antigen presenting cell</b>
ARN	<b>acide ribonucléique</b>
ARNdb	<b>ARN double brin</b>
ARNi	<b>ARN interférent</b>
ARNm	<b>ARN messenger</b>
ARNsb	<b>ARN simple brin</b>
ARNt	<b>ARN de transfert</b>
ASAT	<b>aspartate amino transférase</b>
ATF	<b>activating transcription factor</b>
ATP	<b>adenosine tri-phosphate</b>
BTI	<b>Bacillus thuringiensis israeliensis</b>

CARD	caspace <b>activating</b> <b>recrutment</b> <b>domain</b>
CARDIF	<b>CARD</b> adapter-inducing <b>IFN</b> $\beta$
cDC	<b>conventional</b> <b>dendritic</b> <b>cell</b>
CHIKV	<b>Chikungunya</b> <b>virus</b>
CMH	<b>complexe</b> <b>majeur</b> d' <b>histocompatibilité</b>
CR	<b>complexe</b> de <b>réplication</b>
CRP	<b>C</b> <b>reactive</b> <b>protein</b>
CTD	<b>C-terminal</b> <b>domain</b>
CTL-A4	<b>cytotoxic</b> <b>T-lymphocytic-associated-4</b>
Da	<b>dalton</b>
DC	<b>dendritic</b> <b>cell</b>
DD	<b>death</b> <b>domaine</b>
DISC	<b>Death-inducing</b> <b>signaling</b> <b>complex</b>
DTT	<b>dichlorodiphenyltrichloroethane</b>
ECP	<b>effet</b> <b>cytopathogène</b>
EEEV	<b>Eastern</b> <b>Equine</b> <b>Encephalitis</b> <b>virus</b>
EMCV	<b>Encephalomyocarditis</b> <b>virus</b>
FADD	<b>Fas-associated</b> <b>death</b> <b>domain</b> <b>containing</b> <b>protein</b>
FasL	<b>Fas</b> <b>Ligand</b>
FR	<b>Facteur</b> <b>Rhumatoïde</b>
IFN	<b>interferon</b>
IFNAR	<b>IFN</b> <b>alpha</b> <b>receptor</b>
IFNAR-KO	<b>IFNAR</b> <b>knock-out</b>
I $\kappa$ B	<b>Inhibitor</b> <b>kB</b>
I $\kappa$ K	<b>I<math>\kappa</math>B</b> <b>kinase</b>

I $\kappa$ Ki	inducible <b>I</b> $\kappa$ <b>B</b> kinase
IL	interleukine
IP-10	<b>IFN</b> inducible <b>p</b> rotein <b>10</b>
IPS-1	<b>IFN</b> $\beta$ <b>p</b> romoter <b>s</b> timulator- <b>1</b>
IRAK	interleukin <b>1</b> <b>r</b> eceptor <b>a</b> ssociated kinase
IRF	<b>IFN</b> <b>r</b> egulating <b>f</b> actor
IRM	imagerie par <b>r</b> ésonnance <b>m</b> agnétique
ISG	<b>IFN</b> <b>s</b> timulated <b>g</b> ene
ISGF3	<b>IFN</b> -stimulated gene <b>f</b> actor <b>3</b>
ISRE	<b>IFN</b> -sensitive <b>r</b> esponse <b>e</b> lement
JAK-STAT	<b>J</b> anus <b>k</b> inase-signal <b>t</b> ransducers and <b>a</b> ctivators of <b>t</b> ranscription
JNK	<b>J</b> un <b>N</b> -terminal kinase
KO	knock-out
LC	<b>L</b> angerhans cell
LCMV	<b>L</b> ymphocytic <b>c</b> horiomeningitidis <b>v</b> irus
LGP2	laboratory of <b>g</b> enetics and <b>p</b> hysiology <b>2</b>
LRR	leucin <b>r</b> ich <b>r</b> egion
LT	<b>L</b> ymphocyte <b>T</b>
LTc	lymphocyte <b>T</b> <b>c</b> ytotoxique CD8+
LTh	lymphocyte <b>T</b> <b>h</b> elper CD4+
MAP	<b>m</b> itogen <b>a</b> ctivated <b>p</b> rotein
MAP3k	<b>M</b> AP <b>k</b> inase <b>k</b> inase <b>k</b> inase <b>1</b>
MAVS	<b>m</b> itochondrial <b>a</b> ntiviral <b>s</b> ignalling
MAYV	<b>M</b> ayaro <b>v</b> irus
MCMV	<b>M</b> urin <b>c</b> ytomegalovirus

MCP1	<b>monocyte chemotactic protein 1</b>
MDA5	<b>melanoma differentiation associated antigen 5</b>
MIP	<b>macrophage inflammatory protein</b>
mDC	<b>myeloid dendritic cell</b>
MEF	<b>murine embryonic fibroblast</b>
MKK	<b>MAP kinase kinase</b>
MMP	matrix metalloproteinase
MOI	<b>multiplicity of infection</b>
MYD88	<b>myeloid differentiation factor 88</b>
NC	<b>nucléocapside</b>
NF-kB	<b>nuclear factor kB</b>
NHP	<b>non human primate</b>
NK	<b>Natural killer</b>
NLR	<b>NOD-like receptor</b>
NOD	<b>nucleotide oligomerisation domain</b>
NOS2	<b>Nitric oxide synthetase 2A</b>
NsP	<b>non structural protein</b>
nt	<b>nucléotide</b>
OAS	<b>5'oligo adenylate synthetase</b>
OMS	<b>organisation mondiale de la santé</b>
ONNV	<b>o'nyong'nyong virus</b>
ORF	<b>open reading frame (cadre de lecture)</b>
PAMP	<b>pathogen-associated molecular pattern</b>
PARP	<b>Poly-(ADP-ribose) polymerase</b>
PBMC	<b>peripheral blood mononuclear cell</b>

pDC	plasmacytoid dendritic cell
PFU	<b>p</b> articule <b>f</b> orming <b>u</b> nit
pi	<b>p</b> ost- <b>i</b> nfection
PKR	<b>p</b> rotein <b>k</b> inase <b>R</b>
PM	<b>p</b> oids <b>m</b> oléculaire
Poly(IC)	poly <b>i</b> nosinic poly <b>c</b> ytidylic acid
PPR	<b>p</b> attern- <b>r</b> ecognition <b>r</b> eceptor
PR	<b>p</b> olyarthrite <b>r</b> humatoïde
RANTES	<b>r</b> egulated on <b>a</b> ctivation <b>n</b> ormal <b>T</b> -cell <b>e</b> xpressed and <b>s</b> ecreted
RD	<b>r</b> epressor <b>d</b> omain
RHIM	<b>R</b> ip <b>h</b> omotypic <b>i</b> nteraction <b>m</b> otif
RIG1	<b>r</b> etinoic acid <b>i</b> nducible <b>g</b> ene <b>1</b>
RIP	<b>r</b> eceptor <b>i</b> nteracting <b>p</b> rotein
RIP-1	<b>r</b> eceptor- <b>i</b> nteracting <b>p</b> rotein <b>1</b>
RLH	<b>r</b> etinoic acid- <b>i</b> nducible <b>l</b> ike <b>h</b> elicase
RLR	RIG-1 <b>l</b> ike <b>r</b> eceptor
RRV	<b>R</b> oss <b>R</b> iver <b>v</b> irus
RSE	<b>r</b> epeated <b>s</b> equenced <b>e</b> lement
RSV	<b>r</b> espiratoiry <b>s</b> yncytial <b>v</b> irus
RT-PCR	<b>r</b> everse- <b>t</b> ranscription <b>p</b> olymerase <b>c</b> hain <b>r</b> eaction
SeV	<b>S</b> endaï <b>v</b> irus
SFV	<b>S</b> emliki <b>F</b> orest <b>v</b> irus
SINV	<b>S</b> indbis <b>v</b> irus
SiRNA	<b>s</b> mall <b>i</b> nterfering <b>R</b> NA
SNC	<b>s</b> ystème <b>n</b> erveux <b>c</b> entral



STAT	signal transducers and activators of transcription
STING	stimulator of interferon gene
TAB1	<b>TAK-1</b> binding protein
TAK1	transforming growth factor b activated protein kinase <b>1</b>
TBid	t-Bcl2-interacting domain death agonist
TBK1	<b>TABK</b> binding kinase <b>1</b>
TGF $\beta$	transforming growth factor <b><math>\beta</math></b>
TIR	<b>Toll/IL1</b> receptor
TLR	<b>Toll-like</b> receptor
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor <b><math>\alpha</math></b>
TRADD	<b>TNFR-associated</b> death domain
TRAF3	<b>TNF-receptor</b> associated factor <b>3</b>
TRAF6	tumor necrosis factor receptor associated factor <b>6</b>
TRIF	TIR-domain containing adapter inducing interferon $\beta$
TRIM25	<b>tripartite</b> motif <b>25</b>
VCPI	vacuole cytopathique de type <b>I</b>
VEEV	<b>Venezuelan Equine Encephalitis</b> virus
VHC	virus de l'hépatite C
VISA	virus-induced signalling adapter
VSV	vesicular stomatitis virus
WEEV	<b>Western Equine Encephalitis</b> virus
WNV	<b>West Nile</b> virus

# **INTRODUCTION**

# I. Le virus Chikungunya

## I.1 Taxonomie et classification

Le virus chikungunya (CHIKV) appartient au genre alphavirus, qui fait partie du groupe IV des virus et de la famille des *Togaviridae*, selon le système de classification fondé sur la composition du génome viral établi par David Baltimore (1971). Les alphavirus, comme tous les autres virus du groupe IV, ont un génome enveloppé constitué d'un seul brin d'ARN à polarité positive d'environ 12 000 nucléotides (Rice and Strauss 1981; Strauss and Strauss 1994). Il existe au moins 29 alphavirus capables d'infecter divers invertébrés et vertébrés comme les humains, les rongeurs, les oiseaux et les grands mammifères tels que les chevaux (Johnson 1988). La transmission entre individus et entre espèces se fait par l'intermédiaire des moustiques, ce qui permet de ranger les alphavirus dans le groupe des arbovirus ou *Arthropod Borne Virus* (Weaver and Barrett 2004). On note cependant l'existence d'alphavirus isolés du saumon d'Atlantique ou de la truite arc-en-ciel qui ne nécessiteraient pas de vecteurs arthropodes (Weston, Welsh et al. 1999; Powers, Brault et al. 2001). Les alphavirus sont présents sur tous les continents, à l'exception de l'antarctique.

La classification regroupant les arbovirus en fonction de leur mode de transmission rassemble des virus morphologiquement hétérogènes appartenant à plusieurs familles distinctes : *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae* et *Bunyaviridae*. Elle exclut des virus proches n'ayant pas le même mode de transmission et les virus appartenant à des familles, autres que celles mentionnées ci-dessus (*Filoviridae*, *Arenaviridae*) provoquant des maladies similaires (fièvres hémorragiques).

Le genre alphavirus comprend plusieurs espèces qui ont divergé il y a quelques milliers d'années (Harley, Sleight et al. 2001) (Powers, Brault et al. 2001). Certains d'entre eux ne sont pas pathogènes pour l'homme alors que d'autres le sont, donnant des tableaux cliniques mineurs à graves. Les alphavirus ont une très large distribution géographique, mais peuvent être répartis entre alphavirus du Nouveau Monde et alphavirus de l'Ancien Monde (Strauss and Strauss 1994). Le virus CHIKV fait partie du groupe Semliki Forest appartenant aux alphavirus de l'Ancien Monde à l'exception des virus Mayaro et Una sévissant en Amérique du Sud . Ce groupe comprend entre autres Semliki Forest virus (SFV), o'nyong-nyong virus (ONNV) et Ross River virus (RRV). Six alphavirus, dont CHIKV (Afrique, Asie du sud-est), ONNV (Afrique), SFV (Afrique, Eurasie), RRV (Australie, Océanie), Sindbis virus (SINV) (Afrique, Asie, Europe, Australie) ainsi que Mayaro virus (MAYV) (Amérique du Sud) sont dits arthritogènes et sont à l'origine de syndromes fébriles arthralgiques chez l'homme. A l'opposé, la majorité des virus du Nouveau Monde comprenant les groupes des virus de l'encéphalite équine de l'Est (EEEV), de l'encéphalite équine de l'Ouest (WEEV) (Amérique nord et sud), et de l'encéphalite équine du Venezuela (VEEV) (Amérique sud, centrale) causent des encéphalites chez l'homme, les chevaux et certaines espèces aviaires (Olsen, Turell et al. 1997). Le virus ONNV, très proche du CHIKV, notamment sur le plan sérologique, est probablement issu de l'évolution du CHIKV qui aurait muté et qui se serait ainsi adapté à l'anophèle. Les vecteurs sont les moustiques des espèces *Aedes(Ae) funestus* et *Aedes gambiae* (Johnson 1988). Il n'y a pas de réservoir vertébré identifié. Les études phylogénétiques montrent qu'ils sont génétiquement distincts (Powers, Brault et al. 2000) et se multiplient *in vitro* dans des types cellulaires différents (Chanas, Hubalek et al. 1979).

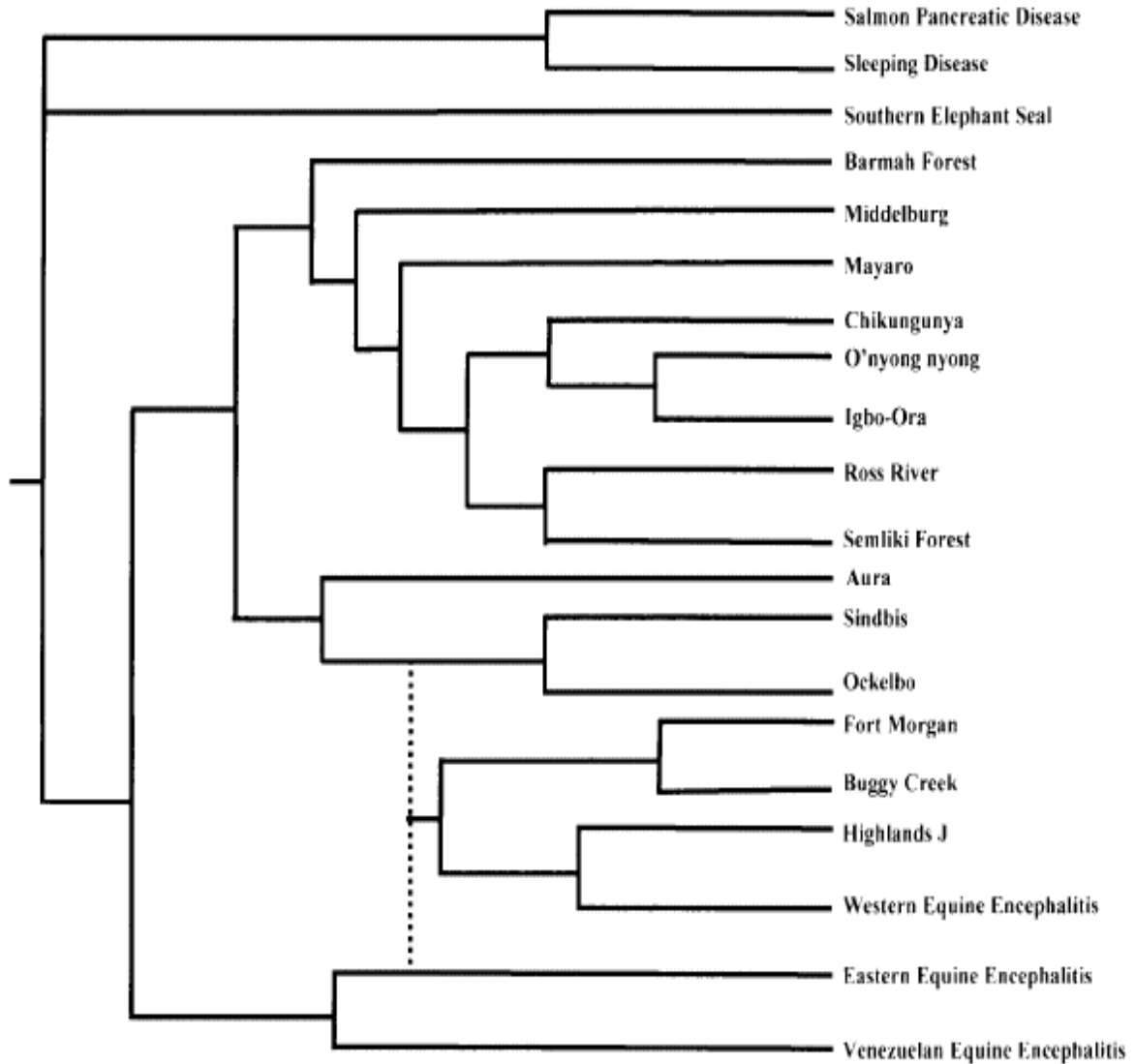
Les alphavirus sont originaires du Nouveau Monde et comprennent trois groupes EEEV, WEEV et VEEV ; ils ont été introduits probablement par les oiseaux migrateurs vers l'Ancien Monde à

deux reprises, la première pour générer le groupe SINV, la deuxième le groupe SFV (Strauss and Strauss 1994).

**Tableau I.** Alphavirus responsables de pathologies humaines

Alphavirus	Maladie	Réservoir vertébré	Dist. géographique	Epidémie
Sindbis				
Ockelbo	Arthrite, éruption	Oiseaux	Europe	Oui
Babanki	Arthrite, éruption	Oiseaux	Afrique de l'ouest	Non
Semliki Forest	Arthrite, éruption	Oiseaux	Afrique, Eurasie	Non
O'nyong nyong	Arthrite, éruption	Primates, Hommes	Afrique	Oui
Igbo Ora	Arthrite, éruption		Australie, Océanie	Oui
Ckikungunya	Arthrite, éruption	Primates, Hommes	Afrique, Inde, S-E	Oui
	Encéphalite		Asie, Europe	
Mayaro	Arthrite, éruption	Primates, Hommes	Amérique du sud	Oui
Ross River	Arthrite, éruption	Mammifères, Hommes	Australie, Océanie	Oui
Barmah Forest	Arthrite, éruption	Hommes	Australie	Non
EEEV	Encéphalite	Oiseaux	Amériques	Oui
WEEV	Encéphalite	Oiseaux, Mammifères	Amérique du nord	Oui
Highlands		Oiseaux	Est des Etats-Unis	Non
VEEV	Encéphalite	Rongeurs, Chevaux	Amériques	Oui
Everglades		Rongeurs, Oiseaux	Floride	Non
Mucambo		Rongeurs, Oiseaux	Brésil, Pérou	Non
Tonate		Oiseaux	Amérique du sud	Non

**Figure 1.** Arbre phylogénétique des alphavirus (Luers, Adams et al. 2005)



Des études phylogénétiques ont montré que les souches de CHIKV appartiennent à trois génotypes différents : Ouest Africain, Central/Est/Afrique du Sud, et Asiatique (Powers, Brault et al. 2000) (Powers and Logue 2007). Powers et al ont montré sur un échantillonnage de souches de CHIKV asiatiques couvrant presque 35 années, une divergence de la séquence nucléotidique de moins de 3 % (Powers, Brault et al. 2000). Cette conservation génétique

s'observe aussi pour d'autres alphavirus tels que WEEV ou SINV (Weaver, Kang et al. 1997) (Sammels, Lindsay et al. 1999).

## **I.2 La structure**

Comme tous les alphavirus, CHIKV est un petit virus enveloppé presque sphérique (bien que légèrement pléomorphe), et possède une nucléocapside isométrique de 40 nm (Powers, Brault et al. 2000) (Strauss and Strauss 1994).

Les virions mûres sont composés de trois protéines structurales : la protéine de capsid C et les glycoprotéines E1 et E2, ainsi qu'une petite protéine 6K retrouvée en quantités sub-stoechiométriques dans la particule. Dans chaque particule virale, la nucléocapside est constituée de l'ARN associé à 240 molécules de la protéine de capsid. L'enveloppe dérive par bourgeonnement de la membrane plasmique cellulaire et porte des spicules, également au nombre de 240, chacune composée de trois hétérodimères des deux glycoprotéines E1 et E2. Avec les spicules, le diamètre du virion atteint environ 70 nm. Ces alphavirus sont stables à pH compris entre 7 et 8 mais sont rapidement inactivés à pH acide. A 37°C, les alphavirus ont une demi-vie d'environ 7 jours. Ils sont rapidement inactivés à 58°C et sont sensibles aux solvants organiques et aux détergents (Strauss and Strauss 1994).

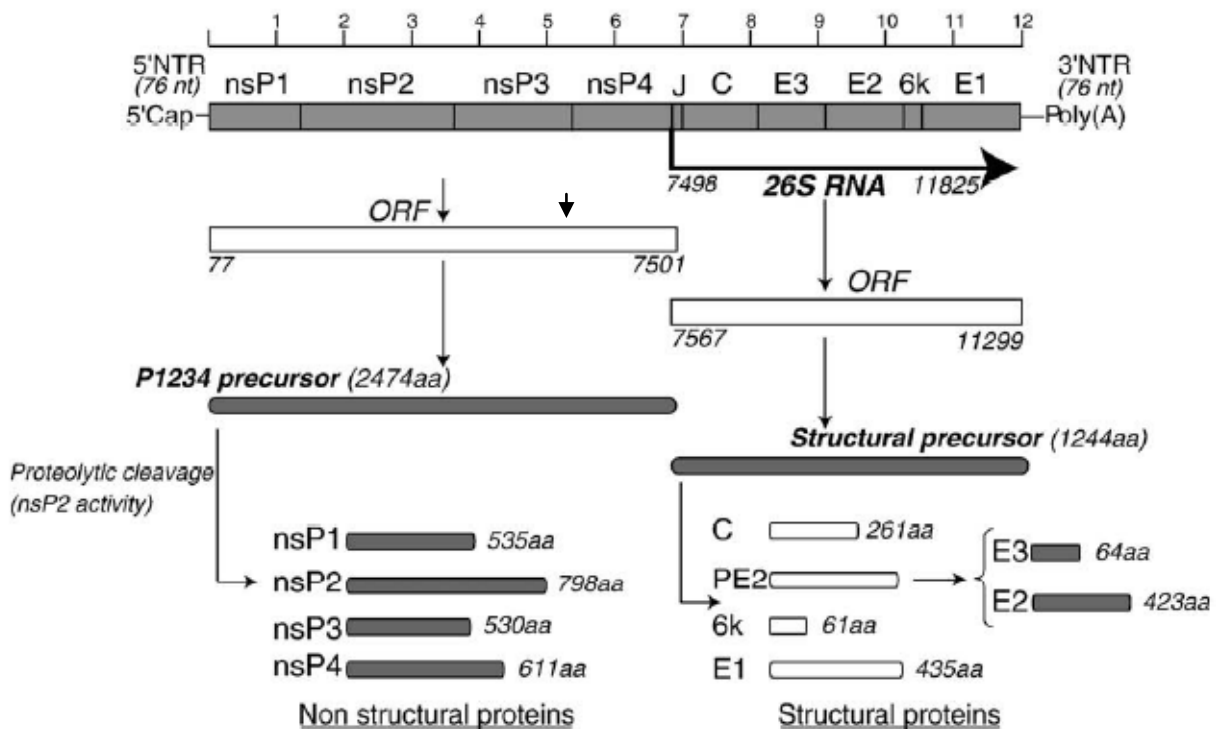
## **I.3 L'organisation génomique**

Le génome se compose d'un simple brin d'ARN enroulé en sens positif pourvu d'une coiffe à l'extrémité 5' et d'une queue poly (A) à l'extrémité 3'. La longueur totale du génome est de 11805 nucléotides en excluant la coiffe en 5' et la queue poly (A) en 3'. Le génome est organisé suivant la séquence : 5' cap-NsP1-NsP2- NsP3-NsP4- (zone de jonction)-C- E3- E2-6K-E1-poly(A)-3'. L'ARN viral est infectieux, c'est-à-dire, qu'il peut, à lui seul, initier la réplication. Il

existe deux phases ouvertes de lecture (ORF) dans le génome, une ORF non structurale et une ORF structurale. La première, non structurale (7424 nt), code pour les protéines nécessaires à la transcription et à la réplication de l'ARN viral, et la seconde, structurale, (3732 nt) code pour quatre protéines de structure: la protéine C de la capside, les glycoprotéines d'enveloppe E1, E2 et E3 (Strauss and Strauss 1994) (**Figure 2**).

**Figure 2.** Organisation du génome du CHIKV et les produits des gènes

(adapté d'après (Solignat, Gay et al. 2009).



Les séquences complètes des souches de référence isolées en Tanzanie en 1953, Ross et S27, ont été déterminées, ainsi que celle isolée en 1983 au Sénégal (Khan, Morita et al. 2002). Les séquences des virus isolés dans les différentes îles de l'Océan Indien au cours de l'épidémie 2005-06 ont confirmé leur appartenance au génotype Est/Central/Sud Africain (Bessaud, Peyrefitte et al. 2006; Schuffenecker, Itean et al. 2006).



On observe une différence de 1,13% (28 acides aminés) des protéines nsPs quand on compare la souche de référence S27 à celle de la Réunion 05.115, la plus grande diversité étant observée dans nsP3 (2,26%) et la plus faible dans nsP2 (0,6%). Une différence importante est la présence d'un codon stop (UGA) dans nsP3 au lieu d'un CGA codant pour une arginine chez S27 (Schuffenecker, Iteman et al. 2006). La fonction de cette dernière serait de réguler une possible polymérase dans nsP4 par un mécanisme d'échappement (« read-through ») (Strauss and Strauss 1994). Ce phénomène est observé chez d'autres alphavirus (Simpson, Davis et al. 1996; Myles, Kelly et al. 2006). La présence de ce codon stop pourrait être lié à la virulence (Tuittila and Hinkkanen 2003).

La zone de jonction (J), non traduite, est composée de 68 nucléotides. Elle délimite les régions non-structurale et structurale du génome viral et regroupe la séquence de l'extrémité carboxy-terminale de la polyprotéine P1234, le promoteur et le site de démarrage pour la transcription de l'ARNm sousgénomique 26S (Grakoui, Levis et al. 1989).

La région non codante 5' NTR : l'extrémité 5' comprend 4 structures en « épingle à cheveu » dont la première serait indispensable pour la synthèse efficace d'ARN de polarité négative (Frolov, Hardy et al. 2001). Par ailleurs une de ces structures régulerait la traduction de l'ARN sousgénomique 26S. Elle ralentirait le mouvement des ribosomes au cours de la traduction de l'ARN 26S afin que certains facteurs sous représentés dans la cellule puissent s'associer aux complexes de répllication et favoriser ainsi la production des protéines structurales au détriment de celles des protéines cellulaires (Frolov and Schlesinger 1996).

La région non codante 3' NTR (Solignat, Gay et al. 2009) : la taille de la région 3'NTR des alphavirus est très variable, allant de 77 nucléotides pour le Pixuna virus à plus de 609

nucléotides pour le Bebaru virus, le CHIKV comprenant 526 nucléotides (Pfeffer, Kinney et al. 1998). De telles différences sont liées au nombre de séquences répétées insérées ou de délétions dans une petite région 3'NTR ancestrale.

## **I.4 Les protéines non structurales (NsP):**

### **I.4.1 NsP1 :**

Cette protéine dans le modèle SINV a un rôle dans l'initiation de la synthèse de l'ARN(-) à partir de la matrice d'ARN(+) génomique (Wang, O'Rear et al. 1996). Elle a également des activités guanyl-transférases et guanine-7-méthyl transférase requises pour l'addition des coiffes aux ARN génomiques et sous-génomiques lors de leur transcription (Mi, Durbin et al. 1989; Wang, O'Rear et al. 1996; Kaariainen and Ahola 2002). C'est la seule protéine non structurale interagissant avec les membranes. Elle s'associe aux endosomes, aux lysosomes et à la face cytoplasmique de la membrane plasmique, et cette liaison induit la formation des complexes de réplication (CR) membranaires (Ahola, Lampio et al. 1999). Elle serait aussi impliquée dans l'association du complexe de réplication avec les vacuoles cytopathiques de type I (VCPI). NsP1 aurait aussi une fonction modulatrice de l'activité protéasique de NsP2 (de Groot, Hardy et al. 1990).

### **I.4.2 NsP2 :**

NsP2 joue un rôle central dans la réplication et la transcription. Sous sa forme soluble, NsP2 reconnaît le promoteur de l'ARNm 26S et agit comme un facteur d'initiation de la transcription (Suopanki, Sawicki et al. 1998). Elle est aussi requise pour l'addition de la coiffe des ARN viraux (Vasiljeva, Merits et al. 2000). La région amino-terminale de NsP2 porte l'activité hélicase à ARN (Gomez de Cedron, Ehsani et al. 1999). La région carboxy-terminale a une

activité protéasique responsable des clivages de la polyprotéine P1234 (Strauss and Strauss 1994). Cette région contient également une séquence de localisation nucléaire PRRRV responsable de la moitié de la séquestration de NsP2 dans le noyau, principalement dans les nucléoles (Rikkonen, Peranen et al. 1992). Cette séquestration induit chez les alphavirus de l'Ancien Monde une apoptose qui est corrélée au blocage de la réplication de l'ADN cellulaire (Gorchakov, Frolova et al. 2005; Garmashova, Gorchakov et al. 2007).

#### I.4.3 NsP3 :

NsP3 est une phosphoprotéine qui comprend trois domaines : le premier, situé en N-terminal, est conservé chez les alphavirus, les coronavirus et les virus de l'hépatite E et de la rubéole mais sa fonction n'est pas encore connue (Koonin and Dolja 1993). Le second conservé chez les alphavirus est essentiel pour l'infectivité (Strauss and Strauss 1994). Et le troisième, situé en C-terminal, est hypervariable et contient la majorité des sites de phosphorylation. La phosphorylation de NsP3 chez SINV est probablement requise pour une synthèse efficace de l'ARN 26S et des ARN de polarité négative, ainsi que pour la pathogénicité virale (Wang, Sawicki et al. 1994; Vihinen, Ahola et al. 2001). La protéine NsP3 aurait aussi un rôle dans le clivage de la protéine NsP2 (de Groot, Hardy et al. 1990; Strauss and Strauss 1994).

#### I.4.4 NsP4 :

NsP4 est l'ARN polymérase ARN dépendante des alphavirus. Au cours des étapes précoces de la réplication virale, la majorité des molécules NsP4 vont être protégées de la protéolyse en s'associant aux autres NsPs pour former des CRs, les autres seront rapidement dégradées car instables sous leur forme soluble (de Groot, Hardy et al. 1990).

## **I.5 Les protéines structurales**

### **I.5.1 La protéine capside :**

Formée de 261 acides aminés, avec un poids moléculaire (PM) de 30kDa, la protéine capside participe, entre autres, au cycle répliatif viral. La région I amino-terminale des alphavirus (aa 1 à 80), riche en acides aminés basiques, est impliquée dans la formation et la dissociation des nucléocapsides (NCs) (Weiss, Nitschko et al. 1989; Owen and Kuhn 1996). La région II (aa 81 à 113) est une séquence conservée qui permet la liaison spécifique et l'encapsidation de l'ARN génomique (Owen and Kuhn 1996). Cette région joue aussi un rôle dans le bourgeonnement viral en interagissant avec la protéine E2 (Strauss and Strauss 1994; Zhao, Lindqvist et al. 1994). La région III carboxy-terminale (aa 114 à 258-275) conservée possède une activité auto-protéase permettant le clivage co-translationnel en cis au sein de la chaîne polypeptidique du SINV (Han, Sabbatini et al. 1996).

### **I.5.2 La glycoprotéine E1 :**

La glycoprotéine d'enveloppe E1, qui est une hémagglutinine, est composée de 435 aa (44kDa) et est responsable de la fusion en se liant aux membranes cibles à l'aide du domaine transmembranaire qui agit comme une séquence d'ancrage à la membrane du réticulum endoplasmique (Simizu, Yamamoto et al. 1984). L'ectodomaine est stabilisé par des ponts disulfures intramoléculaires. Le domaine N-terminal porte le peptide de fusion (Pletnev, Zhang et al. 2001). Le domaine C-terminal permet l'ancrage de la protéine à la membrane. La protéine E1 possède un site de glycosylation.

### I.5.3 Les glycoprotéines E2 et E3 :

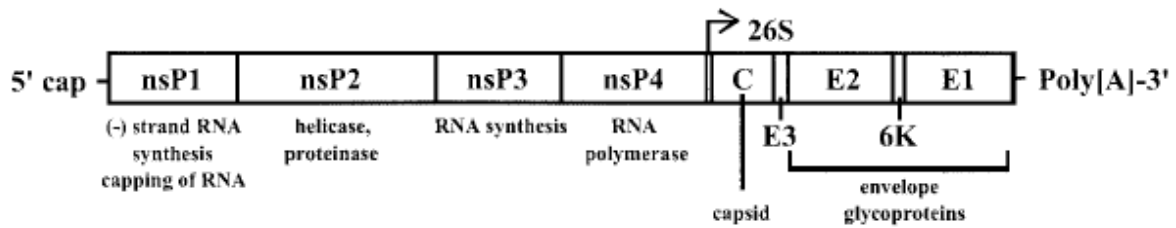
Le clivage protéolytique du précurseur pE2 (62 kDa) libère les glycoprotéines E2 (43kDa – 432 aa) et E3 (11kDa) (**Figure 2**). La partie N-terminale d'E2 constitue l'ectodomaine qui interagit avec les ligands et la liaison au récepteur. La partie carboxy-terminale porte le domaine d'ancrage dans la bicouche lipidique (Pletnev, Zhang et al. 2001). En aval du domaine transmembranaire, la protéine E2 possède un endodomaine cytoplasmique dont la fonction principale est la liaison à la NC pour permettre l'assemblage (West and Brown 2006). Ce domaine intervient aussi dans l'intégration et la maturation des protéines structurales au niveau du réticulum endoplasmique (Lee, Ricker et al. 1994; Owen and Kuhn 1997).

La protéine E3 du CHIKV n'est pas associée aux virions mais est relarguée par les cellules infectées (Simizu, Yamamoto et al. 1984). On ne connaît pas la fonction de E3, mais comme pour SINV, E3 pourrait être impliquée dans le repliement et la formation des spicules de l'enveloppe virale (Parrott, Sitarski et al. 2009).

### I.5.4 La petite protéine 6K :

Le polypeptide hydrophobe 6K (55aa, 6kDa) est associé à la particule virale et pourrait participer, en tant que protéine chaperon, au repliement de la glycoprotéine E1 lors de la formation de l'hétérodimère E1/E2. Cette protéine est palmitoylée et cette palmitoylation est importante dans le processus de bourgeonnement de la particule virale (Gaedigk-Nitschko and Schlesinger 1990).

**Figure 3.** L'organisation du génome et grandes fonctions des protéines des alphavirus (Powers, Brault et al. 2001)



## I.6 La replication

Comme les autres alphavirus, CHIKV peut être cultivé sur différents types cellulaires provenant de leurs hôtes naturels (mammifères, homme, moustiques), à des températures variant de 25 à 41°C. Leur multiplication est intra-cytoplasmique. Les alphavirus se fixent aux membranes des cellules sensibles par l'intermédiaire de leurs protéines d'enveloppe mais le récepteur cellulaire n'est toujours pas identifié (Solignat, Gay et al. 2009).

Après fixation, le virus est internalisé dans une vésicule d'endocytose, où le faible pH induit un changement de conformation des protéines d'enveloppe qui permet la fusion de l'enveloppe virale (rôle essentiel d'E1) et de la membrane vésiculaire. La NC est alors libérée dans le cytoplasme où commence, après décapsidation, la traduction de la région 5' de l'ARN. Dès l'entrée, l'ARN viral sert d'ARNm pour la synthèse des NsPs. Les NsP1 à NsP4 sont produites à partir du précurseur P1234 par clivages protéolytiques successifs. Selon les virus, la traduction de l'ARN génomique produit une seule polyprotéine 1234, ou deux polyprotéines p123 et 1234, la traduction s'arrêtant le plus souvent à un codon stop (UGA) facultatif. Quelques molécules de précurseur p1234 s'ont alors produites par échappement (« read-through »). Les précurseurs polypeptidiques sont clivés par la protéase virale.

L'ARN 26S est transcrit à partir de l'ARN complémentaire et correspond à l'extrémité 3' de l'ARN génomique. La capsid est clivée très rapidement par sa propre activité protéolytique qui

se trouve ensuite neutralisée. Les glycoprotéines de l'enveloppe (précurseur E1-6k-E2-E3) sont transloquées dans le réticulum endoplasmique et clivées par des protéases cellulaires. Elles sont ancrées dans la membrane par des domaines C-terminaux et subissent des glycosylations différentes selon les virus. Le précurseur E2 est clivé plus tardivement par la furine, pour donner E2 et E3 (Ozden, Lucas-Hourani et al. 2008). Les complexes de réplication (CR) des alphavirus associant les protéines nsP123, P4, ainsi que quelques protéines cellulaires, sont constitués pendant les phases initiales du cycle viral et restent stables pendant toute la durée de l'infection. Ils sont confinés dans des structures membranaires, les vacuoles cytopathiques de type I (VCPI). (Lemm, Bergqvist et al. 1998; Ahola, Lampio et al. 1999).

La synthèse d'un ARN de polarité négative peut alors commencer, selon une exacte complémentarité du génome viral, excepté pour la présence d'un G excédentaire non apparié à l'extrémité 3'. Elle est assurée par l'activité enzymatique (hélicase, protéase, ARN polymérase) des 4 nsPs. Cette copie de polarité négative sert ensuite de matrice pour la production de nouvelles copies d'ARN génomiques (+) et pour la traduction de la partie sous génomique 26S en protéines structurales, sous le contrôle d'un promoteur situé entre les régions codant les protéines non structurales et structurales.

La synthèse de l'ARN négatif s'arrête après six heures d'infection, puis seuls les ARN positifs sont produits (Strauss and Strauss 1994). L'ARN 26S est traduit en protéines structurales. L'encapsidation des ARN positifs génomiques s'effectue dans le cytoplasme. De l'ARN 26S peut être lui aussi encapsidé. Les nouvelles particules virales sont ensuite produites par bourgeonnement au niveau de la membrane cytoplasmique sur laquelle sont fixées les glycoprotéines de l'enveloppe.

Dans les cellules de moustique, après une courte phase initiale productive, une infection persistante à faible niveau s'établit, sans lyse cellulaire. Dans les cellules de vertébrés sensibles (cellules Vero, BHK21, MRC5), l'infection est rapidement très productive, puis elle conduit à la lyse cellulaire (voir **Tableau II**).

Ces observations sont à rapprocher de l'infection *in vivo* : les insectes restent infectés toute leur vie sans affection apparente. Cette persistance chez l'insecte vecteur est un élément essentiel dans le cycle de transmission vecteur-hôte. Les femelles piquent car elles ont besoin de sang pour assurer la production d'œufs. Après un repas, le virus se réplique dans l'intestin puis gagne les glandes salivaires. L'injection de la salive au moment de la piqûre assure la pénétration du virus dans l'hôte (Turell, Gargan et al. 1984; Nakoune, Finance et al. 2007). Bien que cytoplasmique, la réplication des alphavirus dans les cellules d'insecte est fortement perturbée par l'actinomycine D ou par l'énucléation, indiquant que les fonctions nucléaires sont requises durant cette phase. Au contraire, dans les cellules de vertébrés, où l'infection provoque un effet cytopathique important, l'actinomycine D (inhibe la synthèse des acides ribonucléiques) ou l'énucléation ont peu d'effet sur la réplication (Condreay, Adams et al. 1988).

## **II. Le Vecteur**

Afin de comprendre les facteurs qui amènent à l'émergence ou à la ré-émergence de la maladie, il convient d'analyser, après les facteurs liés au virus, ceux liés au vecteur et d'identifier son réservoir ainsi que les interactions virus-vecteur.



## II.1 *Aedes*, vecteur du CHIK

Pour le maintien du virus dans la nature, réservoir et vecteur doivent cohabiter. En Afrique, le virus semble être maintenu dans un cycle sylvatique impliquant des primates (cercopithèques, babouins) et des moustiques sauvages de la famille *Aedes* (*Ae.*) (en fait *Stegomyia*, nouvelle appellation officielle) (Jupp and Kemp 1996; Diallo, Thonnon et al. 1999). Ce cycle sylvatique n'a pas été identifié autre part qu'en Afrique, ce qui est en faveur de l'origine africaine du CHIKV (Carey 1971). Le cycle sylvatique a été mis en évidence dans plusieurs régions, incluant le Sénégal, la Côte d'Ivoire, la République Centrafricaine et l'Afrique du Sud (Jupp and McIntosh 1990; McCarthy, Haberberger et al. 1996; Diallo, Thonnon et al. 1999). Les espèces de moustiques en cause varient sur le plan géographique et en fonction des conditions écologiques. Au Sénégal, *Ae. Furcifer-taylori*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. Africanus* et *Ae. aegyptis* sont les espèces les plus importantes dans le maintien du cycle sylvatique. Plusieurs de ces espèces sont aussi impliquées dans le maintien du virus de la fièvre jaune, ce qui pourrait expliquer les épidémies de CHIKV concomitantes avec celles de fièvre jaune (Traore-Lamizana, Fontenille et al. 1996).

Ni les simiens ni les vecteurs ne semblent avoir une expression clinique de la maladie liée à la présence du virus. Les moustiques femelles, infectées après un repas sanguin, répliquent le virus. La transmission verticale transovarienne existe à un très faible taux, 1 à 2 %, mais son rôle dans le cycle de transmission et dans le maintien à long terme du virus reste à démontrer (Kuno 2001). Contrairement à la situation africaine où de nombreuses espèces sont impliquées dans le maintien du CHIKV, en Asie, CHIKV est transmis par *Ae.aegypti* dans un cycle urbain, péri-domestique, essentiellement homme-vecteur-homme, et de façon moindre par *Ae. albopictus* (Lam, Chua et al. 2001; Laras, Sukri et al. 2005).

*Ae aegypti* est présent dans la plupart des zones où le CHIKV est endémique (Gubler 1997). L'émergence de la dengue, sous sa forme hémorragique en Asie, a été attribuée à *Ae aegypti*, originaire d'Afrique, qui a aussi disséminé autour de la Terre et qui est considéré comme le vecteur principal de la dengue et de la fièvre jaune (Gubler 1997). *Ae albopictus* a été systématiquement considéré comme un vecteur secondaire, ou accessoire de virus, en particulier de la dengue, avec une faible capacité vectorielle, surtout dans les régions où les deux espèces coexistent (Charrel, de Lamballerie et al. 2007) (Black, Bennett et al. 2002).

Les virus CHIK et dengue sont transmis par les mêmes moustiques en Asie et leurs tableaux cliniques sont très similaires, ce qui ne permet pas toujours de les différencier. De plus, des coinfections CHIKV et dengue sont régulièrement rapportées (Halstead, Udomsakdi et al. 1969), compliquant davantage la caractérisation de l'infection CHIKV en Asie. Et *Ae. Albopictus* est capable d'inoculer simultanément les virus CHIK et dengue lors d'un repas sanguin (Vazeille et al, 2010, à enregistrer).

La dissémination d'*Ae. albopictus* a été considérée moins comme un problème de santé publique, mais plutôt comme la propagation d'un opportuniste zoophile résultant de la globalisation, actuellement source de nuisance, et accessoirement comme une possibilité de contrôler *Ae. aegypti*, en raison de la compétition entre les deux espèces. Bien qu'il ait été démontré qu'*Ae. albopictus* puisse transmettre bon nombre de virus, comprenant des *Flavivirus*, des *Alphavirus*, des *Bunyaviridae*, des *Reoviridae* et des *Nodaviridae*, à ce jour, seul son rôle dans la transmission de la dengue et du CHIK est reconnue. Mais depuis l'émergence du CHIKV en 2006-2007 dans le sud-ouest de l'Océan Indien, en Afrique Centrale et en Italie, le statut d'*Ae. albopictus* a irrémédiablement changé (Paupy, Delatte et al. 2009).

Il est à noter une description de la tique Ixodidaeas comme vecteur potentiel d'arbovirus (Konstantinov 1990).

## II.2 Aedes Albopictus

### II.2.1 Son aire géographique

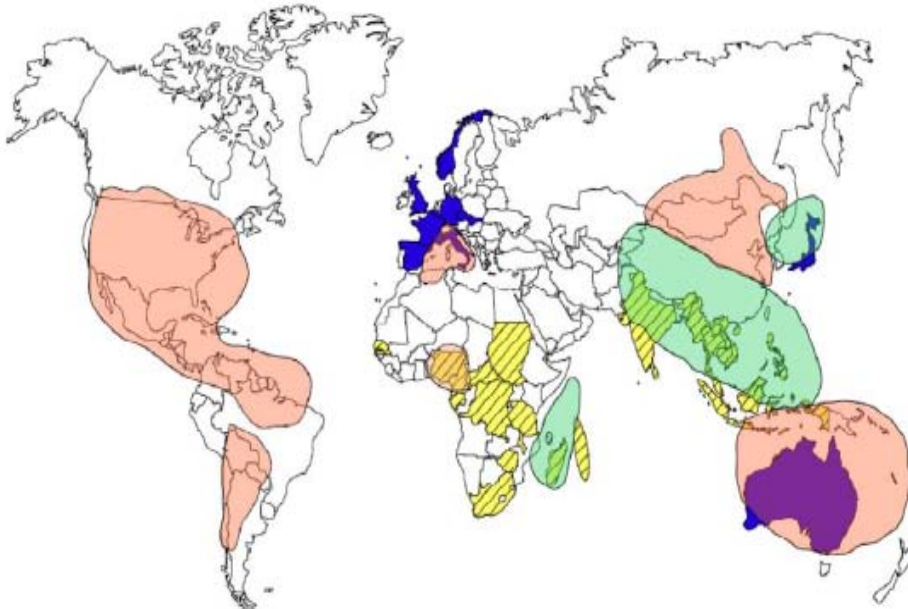
**Figure 4.** Photo d'Ae. albopictus



*Ae. Albopictus*, ou « moustique tigré d'Asie », est originaire des forêts d'Asie du sud-ouest, où il était probablement zoophile. Puis l'espèce s'est progressivement adaptée à l'anthropogénicité en raison des changements de l'environnement qui lui procurent des sources alternatives de sang (animaux domestiques et humains), ainsi que des collections d'eau pour les gîtes larvaires. Il colonise tous les gîtes, aussi bien naturels qu'artificiels (Knudsen 1995). En laboratoire, *Ae. albopictus* montre une grande compétence vectorielle, c'est-à-dire la capacité intrinsèque d'un vecteur à transmettre un pathogène, pour de nombreux arbovirus (Hawley 1988). A partir de zones urbaines et péri-urbaines d'Asie où il est particulièrement abondant - à Kuala Lumpur, à Singapour et à Tokyo, où la végétation persiste de façon conséquente (Hawley 1988), *Ae. albopictus*, accompagnant les migrations humaines, s'est répandu vers de nouveaux espaces tels que la péninsule indo-malaisienne et les îles de l'Océan Indien (Reiter, Fontenille et al. 2006). Cette extension a été favorisée par la mondialisation survenue durant le 20<sup>e</sup> siècle, comme l'illustre bien le commerce intercontinental des pneus qui est responsable de l'introduction d'*Ae. albopictus* aux Etats-Unis en 1985 (Reiter and Sprenger 1987). Sur l'île de la Réunion, l'infestation par *Ae. albopictus* est survenue après le déclin d'*Ae. aegypti* suite à l'utilisation massive du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) dans le but d'éradiquer la paludisme de 1949

à 1952 (Hamon 1953; Salvan and Mouchet 1994). Actuellement, *Ae. albopictus* a été retrouvé dans de nombreuses régions tropicales et tempérées. La dissémination géographique d'*Ae. albopictus* s'est effectuée durant les trois dernières décennies. Après celles d'*Ae. aegypti* et de *Cules pipiens*, c'est le troisième exemple d'expansion de moustique causée par l'activité humaine (Lounibos 2002). *Ae albopictus* a été isolé aux Amériques, des USA à l'Argentine, dans de nombreuses îles du Pacifique ( Hawaii, les îles Salomon et Fidji) et en Australie. En Afrique, *Ae albopictus* a été détecté la première fois en 1989 en Afrique du sud, puis au Nigéria, au Cameroun, en Guinée Equatoriale et au Gabon. En Europe, il a été décrit la première fois en Albanie en 1979, et depuis, on l'a détecté dans de nombreuses régions, en Bosnie Herzégovine, en Croatie, en Grèce, en France, en Italie, au Monténégro, aux Pays Bas, en Serbie, en Slovénie, en Espagne et en Suisse (Scholte 2007). La région du sud-est du territoire métropolitain est concernée depuis 2004 par la rapide dissémination d'*Ae. Albopictus* avec un risque de cas de CHIK autochtones comme en Italie.

**Figure 5.** Distribution mondiale du CHIKV (endémique en jaune hachuré, cas importés en bleu) et d'*Aedes albopictus* (avant 1980 en vert et après 1980 en rose). Adapté de (Powers and Logue 2007) et de (Charrel, de Lamballerie et al. 2007)



## II.2.2 Biologie du vecteur :

### II.2.2.1 La plasticité physiologique :

Sur le globe, *Ae. albopictus* est détecté beaucoup plus au nord qu'*Ae. Aegypti*, et à plus haute altitude. A la Réunion, on le retrouve jusqu'à une altitude de 1200 m. Ce phénomène est lié à sa propriété à s'adapter aux températures froides en devenant dormant durant l'hiver des régions tempérées. L'analyse climatologique des données de terrain et de laboratoire sur des colonies du Japon, de la Réunion et des USA ont montré que les populations d' *Ae. albopictus* ont la capacité de se reproduire et de survivre à une température moyenne de 10°C au Japon et à la Réunion (Kobayashi, Nihei et al. 2002) (Delatte, Gimonneau et al. 2009) et de -5°C aux USA (Nawrocki

and Hawley 1987). Cette capacité d' *Ae. albopictus* à résister aux températures froides est probablement liée à sa capacité à synthétiser un plus grand nombre de lipides. La lipogénèse larvale d' *Ae. albopictus* est beaucoup plus efficace que celle d'*Ae. aegypti* (Briegel and Timmermann 2001).

#### II.2.2.2 La plasticité écologique :

*Ae. albopictus* possède une plasticité écologique qui lui permet une adaptation rapide à une large variété d'habitats. Par exemple, bien qu'il provienne initialement des forêts asiatiques, il s'est bien adapté à l'environnement humain, aussi bien aux zones péri-urbaines qu'aux zones urbaines (Dalla Pozza and Majori 1992). Les sites de reproduction larvaire sont très variés, allant de milieux naturels (souches de bambou et d'arbres, broméliacés) aux contenants artificiels (bacs de stockage d'eau, carcasses de voiture, déchets électro-ménagers...) (Hawley 1988). *Ae. albopictus* est essentiellement un moustique diurne, avec un pic d'activité le matin et en fin d'après-midi, bien que des exceptions aient été reportées en fonction de la saison et de la nature de l'habitat humain. Exophile, il peut également piquer à l'intérieur des habitations, ainsi que la nuit s'il est dérangé dans ses sites de repos : feuillage, couverts végétaux (Jupp PG. 1988).

Bien que les moustiques femelles se nourrissent à partir de la plupart des vertébrés, y compris les animaux à sang froid (reptiles, amphibiens), elles piquent préférentiellement les mammifères (Scholte 2007). En raison de son état d'opportuniste et de son comportement zoophilique, *Ae. albopictus* a généralement été considéré comme un piètre vecteur de pathogènes humains, tels que les arbovirus (Richards, Ponnusamy et al. 2006). Même si l'affinité d' *Ae. albopictus* pour les animaux, comparée à celle pour les humains, est très variable en fonction de l'origine géographique de la population de moustiques, lorsqu'il a le choix, *Ae. albopictus* préfère l'humain

(Niebylski, Savage et al. 1994; Delatte, Dehecq et al. 2008). Le large spectre d'hôtes associé à la diversité des habitats souligne le pouvoir invasif d' *Ae. albopictus*.

### II.2.2.3 Interaction avec les espèces résidentes :

Une fois introduit dans un nouveau milieu, l'installation et la dissémination d' *Ae. albopictus* sont fonction, d'une part des facteurs climatiques et environnementaux, et d'autre part, des interactions avec les espèces pré-existantes qui exploitent les mêmes habitats et/ou ressources alimentaires. Cette compétition peut aboutir à l'exclusion d'une des espèces ou à une coexistence stable. Dans les endroits où coexistent *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti*, les deux espèces partagent souvent les mêmes gîtes larvaires. A Mayotte, 7 ans après sa première détection sur l'île, *Ae. albopictus* coexiste avec *Ae. aegypti* dans 40% des gîtes larvaires (Bagny, Delatte et al. 2009). La réduction ou le déplacement des populations résidentes ont été observés dans de nombreuses régions après l'introduction d' *Ae. albopictus*. La compétition entre les larves des différentes espèces pour la nourriture semble être la raison principale du conflit (Paupy, Delatte et al. 2009). Les expériences en laboratoire utilisant de la nourriture artificielle ont montré un avantage d'*Ae. aegypti* en Asie, où il est une espèce invasive (Moore and Fisher 1969), ainsi qu'aux USA (Barrera 1996).

En revanche, les études de terrain menées aux USA et les expériences de laboratoire utilisant des conditions similaires aux expériences de terrain ont montré que *Ae. albopictus* était favorisé dans les interactions compétitives avec *Ae. aegypti* (Juliano, Lounibos et al. 2004) en raison d'un meilleur taux de croissance. Ainsi, vingt ans après l'introduction au Brésil d' *Ae. albopictus*, ce dernier semble causer le déclin des populations d'*Ae. Aegypti* et les expériences de terrain semblent confirmer la supériorité d' *Ae. albopictus* (Lourenco-de-Oliveira, Castro et al. 2004).

Les interactions interespèces impliquent aussi d'autres espèces résidentes, comme l'*Ochlerotatus triseriatus*, une espèce native d'Amérique du nord. Cette espèce coexiste avec *Ae albopictus* dans différentes niches écologiques, mais sans atteinte d'une des deux populations (Lounibos 2001). L'avantage d'une population sur l'autre résulte d'un meilleur taux de survie, d'une durée de développement plus courte et donc d'un taux de croissance supérieur de la population. Depuis son introduction en Italie, *Ae. albopictus* a colonisé les niches urbaines et péri-urbaines antérieurement occupées par *C. pipiens* (Carrieri 2003). Des études menées sur des populations d'*Ae albopictus* et de *C. pipiens* provenant de Floride et d'Italie ont montré que les aptitudes d'*Ae. albopictus* (survie et paramètres de survie) sont moins affectées par les compétitions interespèces que celles de *C. pipiens* (Costanzo, Kesavaraju et al. 2005).

### **II.3 Le réservoir**

Les alphavirus ont un éventail très large d'hôtes : rongeurs, marsupiaux, reptiles, poissons, oiseaux, chevaux, singes et animaux domestiques. Ces animaux peuvent être porteurs sains ou infectés de façon chronique et constituent le réservoir en dehors des périodes épidémiques. Chez nombre d'entre eux, la réaction immunitaire adaptative n'est pas protectrice, le taux des Ac pouvant diminuer et remonter au cours de réinfections (Kuno 2001). L'homme est un hôte accidentel mais, en période épidémique, constitue le réservoir principal en tant qu'hôte amplificateur (McCrae, Henderson et al. 1971). Le réservoir animal du CHIKV n'est pas bien connu mais 5,2% des sérums d'animaux domestiques ont des anticorps (Adesina and Odelola 1991). Les espèces animales, pour lesquelles une analyse sérologique a établi la présence du CHIKV, sont le singe *Macaca Fascicularis* aux Philippines (Inoue, Morita et al. 2003) et en Malaisie (Marchette, Rudnick et al. 1978), et l'espèce *Cercopithecus Aethiop Pygerythrus* en Afrique du sud (Kaschula, Van Dellen et al. 1978). Les orang outans à Bornéo semblent



également constituer des porteurs sains du CHIKV (Wolfe, Kilbourn et al. 2001). Un grand nombre d'espèces d'oiseaux migrateurs sont séropositives pour les arbovirus, y compris le CHIKV (Sidenko, Stepankovskaia et al. 1974; Renaudet, Jan et al. 1978). Le cheval peut également constituer un réservoir pour les alphavirus, dont le CHIKV (Olaleye, Oladosu et al. 1989).

## II.4 Interactions Vecteur-Virus

Jusqu'à présent, le principal vecteur du CHIKV était *Ae. aegypti*. Depuis l'épidémie réunionnaise de 2005, *Ae. albopictus* a été identifié comme vecteur principal ou vecteur de transition des dernières épidémies en Afrique de l'Est, en Inde et en Europe, là où effectivement ce dernier s'est répandu et a supplanté *Ae. aegypti*. L'explosion de ces épidémies serait liée à la mutation A226V (remplacement d'une Alanine par une Valine en position 226) de la protéine E1, qui résulterait de l'exposition du virus à *Ae. albopictus* (de Lamballerie, Leroy et al. 2008). Cette mutation, absente durant les premiers mois de l'épidémie réunionnaise, a été retrouvée chez plus de 90% des isolats de la Réunion après septembre 2005 (Schuffenecker, Iteaman et al. 2006). Elle augmente la capacité d'adaptation du virus au moustique et est exclusivement observée chez CHIKV isolé d'*Ae. albopictus* (Gould and Higgs 2009). Elle apporte un avantage sélectif qui améliore la réplication et la transmission de cette souche par ce moustique (Vazeille, Moutailler et al. 2007). Cette mutation est aussi responsable d'une dissémination accrue du virus chez *Ae. albopictus* qui intéresse des organes secondaires (Tsetsarkin, Vanlandingham et al. 2007). L'augmentation de cette capacité d'adaptation serait due à la perte de la dépendance au cholestérol nécessaire à la croissance du CHIKV, ce qui permet au virus d'être mieux adapté et de mieux se répliquer chez *Ae. albopictus* ainsi que chez d'autres espèces de moustiques, habituellement plus pauvres en cholestérol (Tsetsarkin, Vanlandingham et al. 2007; Vazeille,

Moutailler et al. 2007). Ce phénomène, lié à l'adaptation du virus au vecteur, avait déjà été décrit pour SFV. (Vashishtha, Phalen et al. 1998; Tsetsarkin, Vanlandingham et al. 2007). La même mutation en position 226 sur E1 chez SFV (Proline en Sérine) et chez SINV module aussi la dépendance vis-à-vis du cholestérol pour la croissance et coïncide avec une croissance rapide de SFV chez *Ae. albopictus*. Contrairement aux autres arbovirus, cette mutation ne semble pas avoir d'effet sur la virulence, bien que, de façon singulière, des virémies particulièrement élevées aient été observées dans l'infection à CHIKV (jusqu'à  $10^9$ - $10^{10}$  copies/ml), (Parola, de Lamballerie et al. 2006).

L'aptitude du CHIKV à s'adapter à *Ae. albopictus* a des conséquences importantes. On pourrait s'attendre à ce que les futures épidémies ne soient pas limitées à l'Asie et à l'Afrique, mais s'étendent globalement au-delà des zones tropicales et subtropicales, du fait de la prédominance d'*Ae. albopictus* dans les régions tempérées en Europe, aux Amériques, en Chine et au Japon (Moore and Mitchell 1997; Parola, de Lamballerie et al. 2006). En Asie, *Ae. albopictus* pourrait bientôt supplanter *Ae. aegypti* et devenir le vecteur principal du CHIKV en raison du déclin d'*Ae. aegypti* résultant de l'utilisation extensive du DDT pour contrôler le paludisme (Her, Kam et al. 2009; Pardigon 2009).

### **III. Les épidémies**

#### **III.1 Historique**

La première épidémie a été rapportée en 1952 au Tanganyika (actuellement Tanzanie) (Lumsden 1955; Robinson 1955). Mais probablement, au vu des descriptions, des épidémies antérieures peuvent être imputées au CHIKV (Gelfand 1948). Le virus a ainsi été isolé pour la première fois à partir de sérum de patients fébriles en 1952 (Ross 1956). Les caractéristiques épidémiologiques ont été décrites, telles que le lien avec une saison des pluies particulièrement

marquée, une forte population d'*Ae. Aegypti* et le stockage de l'eau (Lumsden 1955). Pendant de nombreuses années, le virus n'intéressait que les régions forestières ou avoisinantes d'Afrique, et la transmission se limitait aux simiens et aux humains. Entre les années 1960 et 1990, le virus a été isolé dans de nombreuses régions d'Afrique centrale et du sud incluant le Soudan (Guilherme, Gonella-Legall et al. 1996) (McIntosh, Harwin et al. 1963), l'Ouganda, la République Démocratique du Congo (Muyembe-Tamfum, Peyrefitte et al. 2003) et l'Afrique du Sud (McIntosh, Harwin et al. 1963). Le virus a aussi été isolé dans des régions d'Afrique de l'ouest : Sénégal, Côte d'Ivoire, République de Guinée et Nigéria (Ivanov, Ivanova et al. 1992) (Filipe and Pinto 1973; Moore, Reddy et al. 1974).

Dans différentes régions d'Asie, de fréquentes épidémies ont également été décrites, en Thaïlande (Nimmannitya, Halstead et al. 1969), en Inde (De Ranitz, Myers et al. 1965), en Malaisie (Lam, Chua et al. 2001), en Indonésie (Porter, Tan et al. 2004), au Vietnam (Deller and Russell 1968) et dans les îles du Pacifique (Mackenzie, Chua et al. 2001) (Tesh and Gubler 1975), où il a causé des épidémies touchant des centaines de milliers de personnes. Aucune épidémie n'avait intéressé l'Europe ni les Amériques. La similarité du tableau clinique, fréquente avec d'autres viroses, en particulier avec la dengue qui sévit sous les mêmes latitudes, explique la sous-évaluation probable des cas de CHIKV dans ces régions (Carey 1971). Des cas de co-infections avec la dengue ont été rapportés (Myers and Carey 1967) en Inde (Chahar, Bharaj et al. 2009), ainsi qu'avec le paludisme en République Démocratique du Congo (Muyembe-Tamfum, Peyrefitte et al. 2003).

Les épidémies les plus importantes de CHIKV ont été décrites à Bangkok dans les années 60 (Nimmannitya, Halstead et al. 1969), puis en Inde de 1963 à 1973 (Shah, Gibbs et al. 1964; Padbidri and Gnaneswar 1979). Durant ces 30 dernières années, des épidémies mineures sont survenues périodiquement. D'une façon générale, les épidémies humaines de CHIKV en Afrique surviennent à intervalles irréguliers, allant de 3 à 20 ans, et coïncidant habituellement avec des

périodes de pluie et à une explosion concomitante de la population de moustiques (Lumsden 1955) (Kennedy, Fleming et al. 1980). A l'inverse, certaines épidémies sur la côte est-africaine en 2004 étaient associées à une sécheresse et des conditions socio-économiques défavorables, l'utilisation des bacs de stockage d'eau par les moustiques comme gîtes larvaires favorisant la transmission du CHIKV.

### **III.2 L'épidémie 2005-2006 dans les îles de l'Océan Indien et son extension**

Ces dernières épidémies de la côte est-africaine ont probablement été les précurseurs de l'épidémie dans les îles de l'Océan Indien. En effet, à la suite d'une saison sèche particulièrement longue et chaude, l'épidémie a débuté en juin 2004 sur l'île de Lamu au Kenya (Sergon, Njuguna et al. 2008), pour s'étendre dans la région, notamment au Cameroun (Peyrefitte, Rousset et al. 2007; Shu, Yang et al. 2008). De janvier à mars 2005, plus de 5 000 cas ont ensuite été recensés aux Comores, puis entre mars et juin, ont été atteintes les îles de Mayotte, des Seychelles, de Maurice et de la Réunion. En janvier 2006, des cas ont été rapportés à Madagascar. Des épidémies ont ensuite intéressé l'Inde, avec des taux d'attaque atteignant 45% (Mavalankar, Shastri et al. 2007), la Thaïlande puis le Sri Lanka, bien qu'il soit difficile de préciser dans certaines régions à quel moment le virus africain a été introduit. Des enquêtes de séroprévalence ont montré des taux d'attaque similaires dans les autres îles (Maurice, Mayotte), même si le nombre de cas déclarés a été moindre (Sissoko, Moendandze et al. 2008). Cette différence semble être liée, d'une part aux modalités d'offre de soins, et d'autre part au recours à la médecine traditionnelle. Des études sérologiques ont montré un taux d'attaque élevé, avec une prévalence de 75% dans la population de Lamu (Sergon, Njuguna et al. 2008) et de 63% aux Comores (Sergon, Yahaya et al. 2007). Le virus a atteint La Réunion en mars 2005, avec une prévalence de 38,2% (Gerardin, Guernier et al. 2008). L'épidémie a ensuite disséminé vers

l'Inde et le sud-est asiatique. En Inde, il est estimé à plus d'1,6 million le nombre de personnes infectées par le CHIKV dans au moins 13 états (Arankalle et al, 2007) (Mavalankar, Shastri et al. 2007) (Gerardin, Guernier et al. 2008). L'épidémie a probablement atteint Singapour en janvier 2008 (Leo, Chow et al. 2009). Par ailleurs, de nombreux cas importés de voyageurs provenant de ces zones infestées ont été observés dans plusieurs pays d'Europe (Pfeffer 2006), aux Etats-Unis (Prevention. 2006), au Canada, à Hong-Kong, à Taiwan (Shu, Yang et al. 2008) et plus récemment en Chine (Zheng, Li et al.). En France, 783 cas ont été diagnostiqués entre janvier et décembre 2006 (Ledrans M 2007) (Hochedez, Jaureguiberry et al. 2006). En Italie, où *Ae. albopictus* est présent, une épidémie de plus de 200 cas est survenue dans la région de Ravenne durant l'été 2007 (Rezza, Nicoletti et al. 2007) (Watson 2007) ; le cas index était un touriste venant d'Inde qui rendait visite à un proche habitant la région. Le diagnostic différentiel le plus fréquent des patients provenant de ces zones est celui de la dengue (Hochedez, Canestri et al. 2008). Des cas de co-infections avec la dengue ont été décrits aux Maldives (Yoosuf, Shiham et al. 2009).

Actuellement, l'épidémie se poursuit avec plus de 12 000 cas estimés en Indonésie, rapportés entre mi-décembre 2009 et mi-janvier 2010.

### **III.3 La circulation des virus depuis l'épidémie de 2004 dans l'Océan Indien**

Jusqu'en 2004, les épidémies de CHIKV dans le sud-est asiatique, l'Inde et l'Indonésie étaient dues à la souche asiatique transmise par *Ae. aegypti* (Powers and Logue 2007) (Powers and Logue 2007). Néanmoins, au moins cinq ans avant l'épidémie du sud-ouest de l'Océan Indien, une autre souche est/central/sud africaine de CHIKV aurait déjà atteint l'Inde. La vague épidémique des îles de l'Océan indien représenterait en fait la seconde vague du virus

est/central/sud africain hors d'Afrique (de Lamballerie, Leroy et al. 2008; Gould and Higgs 2009).

Le CHIKV de l'épidémie 2004, appartenant au génotype Est/Centre/Sud africain, a été introduit aux Comores et aux Seychelles à partir du Kenya en 2004 et a été transmis par *Ae. aegypti* (Kariuki Njenga, Nderitu et al. 2008). Des études génétiques de ces souches virales montrent qu'elles avaient une Alanine en position 226. En arrivant à la Réunion et à Maurice où *Ae. aegypti* est rare ou absent et *Ae. albopictus* majoritaire, après quelques mois, le virus a acquis la mutation A226V. Cette mutation a été identifiée chez tous les isolats de Mayotte en 2006 (Schuffenecker, Iteman et al. 2006), ainsi que chez ceux de Madagascar en 2007 (de Lamballerie, Leroy et al. 2008). On observe donc la mutation A226V dans toutes les îles de l'Océan Indien où *Ae. albopictus* est présent. L'explication serait que la mutation ait été acquise de façon indépendante à différents endroits en présence d'*Ae. albopictus*, ou que la mutation ait progressé d'île en île (de Lamballerie, Leroy et al. 2008).

La situation est différente en Asie. Des études phylogénétiques suggèrent que la souche africaine provenant de l'Afrique de l'Est ou des Comores a été introduite en Inde en 2006 où sont présents *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* (de Lamballerie, Leroy et al. 2008). Des études ont montré la co-circulation des génotypes CHIKV Asiatique et Est/Central/Sud africain durant la période 2006-2009 dans plusieurs régions d'Asie (Huang, Yang et al. 2009).

La souche isolée en 2007 chez le touriste indien à l'origine de l'épidémie italienne, portait la mutation A226V et aurait été acquise soit en Italie, soit, plus probablement, en Inde. Il est tout aussi probable que la mutation A226V ait été acquise de façon indépendante de celle de l'Océan Indien. Par ailleurs, durant des épidémies au Cameroun (2006) et au Gabon (2007), où *Ae. albopictus* a déplacé *Ae. aegypti*, on a retrouvé la mutation A226V chez les souches centre-africaine, alors qu'elle était absente des souches centre-africaines originelles transmises par *Ae.*

*Aegypti* ; cette observation semble ainsi confirmer l'hypothèse de l'acquisition indépendante de la mutation en différents endroits (de Lamballerie, Leroy et al. 2008).

A la Réunion, la présence majoritaire d'*Ae. albopictus*, déjà reconnu responsable de l'épidémie de dengue en 1977-78 (Reiter, Fontenille et al. 2006), a probablement favorisée la survenue de cette mutation. Ce phénomène ajouté à l'absence d'immunité de la population, l'absence de lutte anti-vectorielle et l'augmentation de l'urbanisation, expliquerait l'ampleur de l'épidémie réunionnaise (Kam, Ong et al. 2009). L'accélération de l'épidémie qui a suivi semble indiquer que l'acquisition de cette mutation a correspondu à un « succès évolutif » pour la souche virale. Il s'agit donc d'une mutation adaptative en réponse à la transmission par *Ae. albopictus*. Ce phénomène de mutations convergentes, appelé « convergence évolutionnaire », est rarement observé dans la nature, et a été décrit chez d'autres virus tels que le virus influenzae sous une pression de sélection exercée par des traitements anti-viraux.

### **III.4 L'épidémie de la Réunion**

La dernière vague épidémique de CHIKV survenue dans l'Océan Indien en 2005 a remis au-devant de la scène ce virus finalement « méconnu » en raison de la survenue de formes graves décrites dans une région développée et disposant de moyens diagnostiques permettant un suivi fiable. L'épidémie de la Réunion, touchant une région dont les infrastructures sont identiques à celles des pays occidentaux, a bénéficié d'un système de surveillance et de moyens diagnostiques (Catteau, Sissoko et al. 2005), ce qui a permis une description précise de l'épidémie. Dès le 15 avril 2005, un dispositif de vigilance a été mis en place à la Direction des Affaires Sanitaires et Sociales (Drass) de la Réunion, suite à l'épidémie survenue aux Comores. Les premiers cas importés des Comores avaient été décrits en avril 2005, alors que les premiers

cas autochtones ont été documentés dès le 9 mai à la Réunion . Un premier pic épidémique a été relevé à la mi-mai 2005 (environ 450 cas/semaine) avec un nombre total de cas avoisinant les 3000. Après une accalmie coïncidant avec l'hiver austral, une recrudescence a été observée dès le mois d'octobre 2005. Elle s'est accentuée en décembre (300 cas/semaine) (Paquet, Quatresous et al. 2006) pour aboutir au deuxième pic épidémique, la 2<sup>e</sup> semaine de février 2006 avec 35 000 estimés par semaine (Josseran, Paquet et al. 2006). Puis le nombre cas a fortement baissé et l'épidémie s'est tari avec l'arrivée de l'hiver austral. L'épidémie réunionnaise a atteint 38,2% de la population, soit 266 000 cas (Gerardin, Guernier et al. 2008).

Le Chikungunya a rejoint la liste des maladies à déclaration obligatoire depuis le 19 décembre 2008 (décret). Après un silence de plus de 3 ans suite à l'épidémie de 2005-2006, nous avons observé la réapparition de cas de CHIKV sporadiques autochtones en août 2009 à la Réunion (D'Ortenzio, Grandadam et al. la2009). Et depuis le 17 mars 2010, une épidémie dont l'origine est probablement des cas importés de la côte Est de Madagascar a débuté ; le dispositif de surveillance coordonné par la Cire, antenne de l'Invs, a déclaré jusqu'au 23 juin 2010, 94 cas confirmés et 28 cas probables, [://www.Invs.sante.fr](http://www.Invs.sante.fr); [://www.ars.ocean-indien.sante.fr/La-Cellule-de-l-InVS-en-Region.88881.0.html](http://www.ars.ocean-indien.sante.fr/La-Cellule-de-l-InVS-en-Region.88881.0.html)

#### **IV. Le tropisme cellulaire : données des études sur modèles cellulaires et de l'expérimentation animale**

Les premières études datent des années 1960-80 et montrent que le CHIKV peut être produit par infection sur un éventail de lignées cellulaires non-humaines incluant les cellules Vero (cellule épithéliale de rein de singe vert), les cellules BHK21 (cellules épithéliales embryonnaires de hamster), les fibroblastes L929 de souris et les cellules embryonnaires C6/36 d'*Ae albopictus* (voir **Tableau II A**) (Glasgow 1966 ; Higashi, Matsumoto et al. 1967; Hahon and Hankins 1970;



Rinaldo, Overall et al. 1975; Igarashi 1978). Dès le début des années 70, il avait été démontré que les fibroblastes infectés par le CHIKV sont capables de produire de grandes quantités d'interférons de type I et de contrôler la réplication virale (Friedman 1964; Wagner 1964). A ce jour, ce sont essentiellement les lignées Vero et C6/36 qui sont utilisées pour isoler des alphavirus à partir d'échantillons biologiques car elles sont très sensibles à l'infection et ne produisent pas d'interférons (Desmyter, Melnick et al. 1968).

#### **IV.1 Mécanisme infectieux cellulaire du CHIKV et modèles cellulaires:**

Pour pénétrer dans la cellule, les conditions diffèrent selon les alphavirus mais impliquent un premier contact avec la membrane plasmique de la cellule cible. La composition en cholestérol de celle-ci semble, par exemple, jouer un rôle. Le cholestérol représente l'un des constituants-clés des domaines riches en sphingolipides et en stérols de la membrane cellulaire qui sont appelés « radeaux » (raft en anglais) lipidiques. Le fonctionnement de ces radeaux lipidiques est sensible à la déplétion en cholestérol par les agents tels que le cyclodextrine b-méthyl. Ainsi, la baisse en cholestérol de la membrane cellulaire cible diminue de façon significative l'infection des cellules HEK293T par le CHIKV (Solignat, Gay et al. 2009), ce qui suppose que les domaines enrichis en cholestérol joueraient un rôle important lors de l'entrée des particules virales dans les cellules humaines (Phalen and Kielian 1991; Waarts, Bittman et al. 2002). Les alphavirus du N ouveau Monde (exemple VEEV) semblent complètement insensibles à la déplétion en cholestérol. Ces différences de dépendance au cholestérol pourraient être liées aux variations de séquence de la glycoprotéine E2, plus précisément de l'acide aminé en position 226 (Lu, Cassese et al. 1999).

Le virus entrerait ensuite dans les cellules par un phénomène d'endocytose dépendant de la clathrine (Kolokoltsov, Fleming et al. 2006; Sourisseau, Schilte et al. 2007 ; Bernard, Solignat et

al. 2010). L'utilisation de molécules bloquant l'acidification des endosomes, telles que la bafilomycine-A1 ou la chloroquine, réduit l'infection et la réplication virale (Sourisseau, Schilte et al. 2007; Solignat, Gay et al. 2009). Le CHIKV nécessite un pH endosomal acide pour infecter de façon productive les cellules humaines.

Cette endocytose suggère un mécanisme dépendant d'un récepteur. Habituellement, chez les mammifères, les arbovirus se répliquent dans une grande variété de cellules (Mims, Murphy et al. 1973; Murphy, Taylor et al. 1973) pour lesquelles le facteur d'attachement au virus a été identifié : CD209 de la cellule dendritique pour SINV (Klimstra, Nangle et al. 2003) et pour le virus de la dengue (Tassaneetrithep, Burgess et al. 2003) alors que WNV se fixerait à une molécule d'adhésion ( $\alpha_v\beta_3$ ) (Chu and Ng 2004). La laminine et les glycosaminoglycanes pourraient aussi jouer un rôle dans la pénétration cellulaire du SINV (Wang, Kuhn et al. 1992). Un récepteur laminin-like des cellules de moustiques pourrait être la cible de la glycoprotéine d'enveloppe du VEEV (Strauss and Strauss 1994). Mais, à ce jour, ni le récepteur cellulaire du moustique, ni le récepteur humain n'ont été identifiés pour le CHIKV.

Le **tableau II** B-C répertorie à la fois la capacité du CHIKV à infecter différents types cellulaires mais également le pouvoir cytopathique et la capacité à induire l'expression d'interférons de type I (IFN- $\alpha$  et  $-\beta$ ). On peut observer que ce sont essentiellement les cellules du stroma (fibroblastes, cellules gliales, myoblastes) qui sont les cibles privilégiées du virus CHIK et ces données sont à rapprocher des atteintes des articulations, du système nerveux central (SNC) et des muscles décrites chez l'homme ainsi que dans les différents modèles animaux.

**Tableau II.** Infection, réplication et réponse cellulaire au CHIKV

Lignées cellulaires classiquement utilisées pour l'isolement et la multiplication:

Origine	Type cellulaire	Détection CHIKV	Cyto- toxicité	IFN $\alpha/\beta$	Référence
Poulet	Fibroblastes	+	?	+	Friedman, 1964
		+	?	+	Wagner, 1964
Singe	Vero African green monkey	+ (EM)		-	Higashi, 1967
		+	+	-	Sourisseau, 2007
		++ WB, IF	+	-	Hoarau, 2010
Souris	L929 et McCoy fibroblastes	+	+	?	Hahon, 1970a
Hamster	BHK21, rein	+ (IF)	?	?	Hahon, 1970a,b
Human	Hep-2, epitheliale, HeLa-like	+ (IF)	-	?	Hahon, 1970a
Moustique	C6/36, Aedes albopictus	+ (IF)	+/-	-	Igarashi, 1978
Mouton	Leucocytes	- (IF)	?	+	Rinaldo, 1975

Chez la souris :

Origine tissulaire	Type cellulaire	Détection CHIKV	Cyto- toxicité	IFN $\alpha/\beta$	Référence
Muscle/peau	Lignée C2C12 myoblaste	+ (WB)	?	?	Das (soumis)
	Lignée STO fibroblaste	+ (WB)	?	?	Das (soumis)
	MEF (fibroblaste embryonnaire)	+ (IF)	?	+	Schilte, 2010
		?	?	-	Burke, 2010
	+ (RTPCR)	?	+	Gardner, 2010	
	MEF IPS1 -/-	+++	?	-	Schilte, 2010

	Lignée B16 mélanocyte	- (WB)	-	?	Das (soumis)
Cerveau	Astrocytes primaires, GFAP+	+ (WB, IF)	+, apoptose	+	Das (soumis)
	Lignée CLTT astrocyte	+ (WB, IF)	+, apoptose	++	Das (soumis)
	Microglie, CD11b+	- (IF)	-	-	Das (soumis)
		-	?	?	Couderc, 2008
	Lignée BV2 microglie	- (IF, WB)	-	-	Das (soumis)
	Oligodendrocytes, GC+	+ (IF)	+	?	Das (soumis)
	Neurones primaires, Tuj1+	+ (IF)	+	?	Das (soumis)
	Lignée N1E115 neurone	+ (IF, WB)	+	?	Das (soumis)
	Lignée bEND3 endothéliale	+ (WB)	-	?	Das (soumis)
Adipocytes	Lignée cellulaire 3T3L1	+ (IF, WB)	+	?	Das (soumis)
Sang, Tissus	Leucocytes	-	-	?	Couderc, 2008
	Leucocytes, CD45+	- (GFP)	?	?	Schilte, 2010
Rate	Macrophage F4/80+	+GFP , +RTPCR	+ cresyl V. ?	? ?	Gardner, 2010 Couderc, 2008
Foie	Macrophage F4/80+	+ IF	?	?	Couderc, 2010

Chez l'homme :

Origine Tissulaire	Type cellulaire	Détection CHIKV	Cyto- toxicité	IFN $\alpha/\beta$	Références
Muscle/pea u	Cellules myoblaste	+ (IF)	+	?	Ozden, 2007
	Cellules différenciées en myotubes	-(IF)	?	?	Ozden, 2007
	Lignée myogénique LHCN-M2	+	?	?	Ozden, 2007
	Lignée HT1080	+ RTPCR	-	?	JaffarBandjee

					Cp
	Lignée HS633T	++ RTPCR	+	?	Hoarau, Cp
	Fibroblaste Hs 789.sk, peau	+	?	?	Ozden, 2007
	Fibroblaste de la peau (HFF)	+	?	?	Ozden, 2007
		+ (IF)	?	+	Schilte, 2010
Poumon	fibroblaste MRC5 (poumon)	+	?	?	Ozden, 2007
		+	?		Edelman, 2000
		+	+ apoptose	+	Thon Hon Cp.
		++	++		RTPCR Lewitt, 1986
		+	?		Edelman, 2000
		+	?		Sourisseau,
		+++ (IF)	?	+	2007
				(ELISA)	Schilte, 2010
	Lignée BEAS- 2B épithéliale	++ (IF)	?	?	Sourisseau, 2007
	Lignée A549 pneumocyte	-(IF)	?	?	Sourisseau,
		(Fix+)	?	?	2007
		- fixation+			Solignat, 2009
Cerveau	Lignée hCMEC/D3 endothéliale	-	?	?	Sourisseau, 2007
	Lignée SH- SY5Y neurone	++ (GFP)	++ (MTT)	?	Solignat, 2009
	Lignées IMR32/Kelly/LA15S	+ RTPCR	++	?	JaffarBandjee,
		+WB	apoptose		Cp
Articulation	Fibroblaste Synovie	+	+, apoptose	+	KrejbichTrotot

					Cp
Foie	Lignée HUH7 hépatocarcinome	++ (GFP)	++ (MTT)	++	Solignat, 2009
Rein	Lignée HEK293T épithéliale	++ (IF) + (GFP)	? + (MTT)	? ?	Sourisseau, 2007 Solignat, 2009
Placenta	Lignée FL épithéliale amniotique	+	?	?	Mantani, 1967
	Lignée BeWo Syncytiotrophoblaste	-	-	-	Couderc, 2008
Cervix	Lignée HeLa épithélial cervical	++(IF, WB, RTPCR) + (GFP)	+, apoptose +, MTT	? ?	Sourisseau, 2007 Solignat, 2009
Sang, Tissus lymphoïdes	Monocytes primaires	- (IF) - +IF,RTPC R	? - ?	? - ?	Sourisseau, 2007 Schilte, 2010 Her, 2010
	Macrophages dérivés de monocytes	+ (IF) + (GFP) +	? + (MTT) ?	? ? ?	Sourisseau, 2007 Solignat, 2009 Labadie, 2010
	Lignée Jurkat CD4+ T	- -	- -	- ?	Sourisseau, 2007 Hoarau, Cp
	Lignée T H9 CD4+	-	- (MTT)	?	Solignat, 2009
	Cellules dendritiques (Dc) Monocyte-Dc	- (IF)	?	?	Sourisseau,

	Monocyte-Dc	-	?	?	2007
	Monocyte-Dc	+	+	+	Solignat, 2009
	Monocyte + pDc (10 <sup>6</sup> PFU/ml)	?	?	-	Her, 2010
	Monocyte-Dc (MOI 5)	-(TCID)	?	?	Schilte, 2010
	Monocyte-Dc (MOI 1)	-(IF)	-	-	Labadie, 2010
					Hoarau, Cp
	Cellules NK, CD4+T, CD8+T	-	-	-	Her, 2010
	Cellules B	+	+	+	Her, 2010
	Lignée B-420 (EBV immortalisée)	-	-	?	Sourrisseau, 2009
	LignéeTHP1	-(IF)	-	-	Sourrisseau, 2007
	mono/macrophagique	-(GFP)	-	-	Solignat, 2009
	LignéeU937	-(IF)	-	-	Sourrisseau, 2007
	mono/ macrophagique	-(GFP)	-	-	Solignat, 2009
	Plaquettes	+ fixation			Larke, 1970
	Lignée cellulaire endothéliale de la moelle osseuse, ThBMEC	+(IF)	?	?	Sourrisseau, 2007

Abréviation (Tableau II) : ?, absence de données. Cp, communication personnelle. IF, Immunofluorescence. WB, Western blot. MTT, Test de viabilité. GFP : utilisation du clone infectieux fluorescent CHIKV-GFP pour tester l'infection cellulaire. GFAP : Glial fibrillary acidic protein, marqueur des astrocytes. GC : Galactocérobroside, marqueur des

oligodendrocytes. Tuj1 : beta III tubulin, marqueur des neurones. La zone grisée indique des données qui sont contradictoires et qui devront faire l'objet d'études plus approfondies pour clarifier notamment le rôle des macrophages et des cellules dendritiques dans l'infection par le CHIKV. Nous ne savons toujours pas à ce jour comment le CHIKV qui se réplique au niveau de la peau peut gagner la circulation sanguine extra-dermique.

## **IV.2 Expérimentation chez la souris**

La pathogénicité des alphavirus chez la souris est multifactorielle, bien que fortement liée à l'âge, sachant que la souris adulte est résistante à l'infection (Griffin 1998 ; Couderc, Chretien et al. 2008; Ziegler, Lu et al. 2008). Cette observation a été confirmée pour le CHIKV chez des souris CD1, ICR, NIH alors que le modèle récemment décrit par Gardner *et al.* montre que les C57BL6 adultes (six semaines) sont très susceptibles (Gardner, Anraku et al. 2010). La sensibilité accrue des nouveau-nés à l'infection pourrait impliquer différents facteurs dont la proportion tissulaire en fibroblastes, le taux de division cellulaire, ainsi que la maturité et l'efficacité de l'immunité innée (Levy 2007).

Chez la souris nouveau-née et de moins de 14 jours, l'injection sous-cutanée entraîne un tableau de léthargie, avec difficulté à la marche, faiblesse des pattes arrière et une perte de poids (Ziegler, Lu et al. 2008). Comme chez l'homme, des virémies élevées sont observées, de l'ordre de  $10^6$ - $10^8$  PFU (particule forming unit) / ml de sang. L'inflammation (arthrite et ténosynovite) par la souche CHIKV réunionnaise est plus importante que celle obtenue avec la souche asiatique même avec des virémies identiques (Gardner, Anraku et al. 2010). L'atteinte tissulaire peut évoluer vers la nécrose locale et inflammatoire, suivie de fibrose et de calcifications dystrophiques, mais il y a peu de décès et la plupart des animaux guérissent (Ziegler, Lu et al.



2008 ; Gardner, Anraku et al. 2010). La sévérité est généralement corrélée à l'importance de la virémie et à la dissémination au SNC (Couderc, Chretien et al. 2008).

CHIKV infecte essentiellement les fibroblastes (Couderc, Chretien et al. 2008 ; Ziegler, Lu et al. 2008 ; Schilte, Couderc et al. 2010). Dans le tissu musculaire, de façon moins intense, les cellules satellites progénitrices sont aussi infectées (Ziegler, Lu et al. 2008). Un infiltrat mono/macrophagique (avec également des cellules NK) est observé dans les muscles des nouveau-nés ou des jeunes souris (Ziegler, Lu et al. 2008 ; Gardner, Anraku et al. 2010). Gardner *et al.* ont montré que certains de ces macrophages (F4/80+) sont infectés par le CHIKV et qu'ils contribuent à la fois aux mécanismes inflammatoires (arthrite) et à la lutte antivirale. En effet, un traitement des souris avec du clodronate contenue dans des liposomes, agent cytotoxique pour les macrophages, limite l'inflammation des articulations et augmente la virémie (Gardner, Anraku et al. 2010). Dans le foie, les cellules cibles sont essentiellement les cellules endothéliales des capillaires sinusoides, et de façon moins importante les cellules macrophages de Kupffer. Par contre, les cellules macrophages microgliales du tissu cérébral sont complètement résistantes à l'infection par CHIKV. Les leucocytes du sang ne sont pas infectés par le CHIKV. Dans les cas d'infections sévères chez la souris IFNAR-KO (IFNAR-knock-out), le CHIKV affecte plus particulièrement le plexus choroïde, les leptoméniges et les cellules épendymaires de la zone sous-ventriculaire où se trouvent les cellules souches neuronales (Couderc, Chretien et al. 2008). Des infections du SNC impliquant des lésions de la substance blanche sous-ventriculaire ont été décrites chez la souris pour d'autres alphavirus tels que SFV, RRV et SINV (Mims, Murphy et al. 1973; Jackson, Moench et al. 1987 ; Fazakerley, Cotterill et al. 2006).

Dans l'étude de Ziegler (Ziegler, Lu et al. 2008), l'altération des cellules gliales et neuronales semble être liée à la réponse antivirale et inflammatoire plutôt qu'au virus lui-même, comme cela est décrit par ailleurs pour d'autres virus (Amor, Scallan et al. 1996; Rowell and Griffin 1999 ;

Rowell and Griffin 2002; Sharma, Bhattacharya et al. 2008). Ces données sont à contraster avec nos résultats sur des cultures primaires gliales de souris (Das et al, version en cours de révision dans *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*) où nous observons que le CHIKV est capable d'infecter et d'induire une forte apoptose des astrocytes et des neurones (Das, Jaffar-Bandjee et al. 2010). De manière intéressante, une forte apoptose des neurones (CHIKV +), associée à une activation microgliale, a été décrite dans les deux modèles d'infections par voie intranasale (Powers and Logue 2007; Wang, Volkova et al. 2008).

La réponse immune cellulaire et humorale à l'infection est néanmoins extrêmement efficace avec une négativation de la virémie au bout de 10 jours, comme observé chez l'homme, et une disparition du CHIKV dans les tissus. L'infection systémique par le CHIKV induit une réponse inflammatoire qui mobilise à la fois les cytokines (IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et IL6) et certaines chimiokines (MCP1/CCL2) impliquées dans l'activation et la migration des cellules immunes vers les foyers infectieux (Gardner, Anraku et al. 2010). De manière surprenante, aucune synthèse d'IL1 $\beta$  (connue pour son action pyrogène) ni d'IL-10 n'a été détectée au cours de la phase aiguë de l'infection par CHIKV (Gardner, Anraku et al. 2010). Cette réponse polarisée de type Th1 va pouvoir stimuler la réponse anticorps (IgG2c >>IgG1) et la neutralisation du virus (Gardner, Anraku et al. 2010).

Le rôle précoce de l'IFN de type I dans la réponse immunitaire innée a été démontré en utilisant des souris IFNAR-KO -/- homozygotes et IFNAR-KO-/+ hétérozygotes ; les auteurs ont observé une analogie entre les formes sévères de la maladie chez l'homme et le génotype homozygote IFNAR-KO -/-, et entre la forme bénigne humaine et le génotype hétérozygote IFNAR-KO -/+ (Couderc, Chretien et al. 2008). La forme bénigne correspondrait à l'infection périphérique ciblant essentiellement les muscles et les articulations, alors que la forme sévère associant une dissémination virale à d'autres organes, dont le SNC, correspondrait aux formes graves, en particulier avec des atteintes neurologiques.

### **IV.3 Expérimentation chez le macaque (*Macaca fascicularis*) :**

Beaucoup plus proches et représentatifs de la maladie humaine, les primates sont sensibles au CHIKV (Binn, Harrison et al. 1967; Paul and Singh 1968) et ces études ont permis d'étudier la transmission et la physiopathologie du CHIKV (Paul and Singh 1968) mais aussi de tester des molécules à visée thérapeutique ainsi que des vaccins (Harrison, Binn et al. 1967; Edelman, Tacket et al. 2000).

Plus récemment, le modèle macaque utilisé par Labadie et al infecté par une souche réunionnaise de CHIKV a permis de préciser les caractéristiques virales, cliniques et pathologiques de la maladie (Labadie, Larcher et al.). Ainsi, comme chez l'homme, une virémie pouvant dépasser  $10^{10}$  copies/ml peut être observée, avec une négativation au bout de 10 jours, témoignant de la bonne réponse immunitaire. Sur le plan clinique, on retrouve une fièvre supérieure à  $39^{\circ}\text{C}$  à J1-J2, un rash morbilliforme une semaine après l'inoculation ainsi que des atteintes muqueuses comme les gingivorragies. D'autres atteintes telles que les arthralgies, céphalées ou myalgies sont difficiles à évaluer chez l'animal. De façon contemporaine au pic virémique, tous les animaux présentaient une monocytopénie, lymphopénie, thrombopénie et une granulocytose. L'importance de la virémie s'avère clairement dépendante de la dose d'inoculation.

De même, l'intensité et la gravité des signes cliniques sont liées à la dose d'inoculation. Chez les animaux recevant une faible dose ( $10^1$  PFU), une réplication virale n'est détectée que chez 50% d'entre eux, sans aucun signe clinique. Les animaux recevant une dose intermédiaire ( $10^2$  à  $10^6$  PFU) présentaient une virémie, de la fièvre et un rash cutané. Les animaux ayant reçu un fort inoculum ( $\leq 10^7$  PFU) présentaient un œdème des poignets et des chevilles, des signes de méningoencéphalite, avec un taux de mortalité élevé.

L'étude histopathologique des tissus montre aussi une corrélation de l'importance des lésions avec la dose reçue. Les animaux ayant reçu une dose intermédiaire de CHIKV montraient une atteinte du foie, une infiltration mononuclée dans plusieurs tissus : la rate, les ganglions lymphatiques, le parenchyme hépatique et plus rarement dans le muscle.

Aucune anomalie importante n'a été observée dans les prélèvements de synoviale ou de tissu nerveux central. Chez les animaux ayant reçu une forte dose d'inoculation, on retrouvait l'infiltration mononuclée dans les tissus lymphoïdes et les muscles. Le liquide céphalo-rachidien d'un macaque présentant des signes de méningo-encéphalite avait plus de 800 cellules mononuclées/ $\mu$ l à majorité lymphocytaire. Le profil des cytokines dans le plasma reflétait le recrutement monocyttaire ainsi que l'activation macrophagique, avec une augmentation significative de nombreuses cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-6 et de l'IFN- $\gamma$  à 1-2 jours PI (post-infection). Le phénomène contemporain d'une diminution des CD14 + circulants, correspondrait au pic virémique et au recrutement des mono/macrophages par la sécrétion de MCP1/CCL2. Les tests d'hybridation *in situ* montraient que le virus persisterait essentiellement dans les cellules mononuclées et, dans une moindre mesure, dans les cellules endothéliales.

Du virus a été retrouvé dans le liquide céphalo-rachidien à 55 jours p.i. Une infection persistante est observée dans les articulations, les muscles, les organes lymphoïdes et le foie, permettant de faire un parallèle avec les symptômes de la maladie chronique chez l'homme. De fait, si le fibroblaste est considéré comme la cible privilégiée du virus, le macrophage est identifié comme la cellule réservoir du virus et aurait aussi un rôle clé dans le phénomène de nécrose musculaire.

Le **tableau III**, reprend les données bibliographiques actuelles concernant l'infection expérimentale chez la souris et chez le macaque publiées à ce jour. Les observations peuvent être très discordantes (infection du cerveau, le type de réponse immune et tissulaire) et ceci pourrait tout simplement être du à la grande hétérogénéité dans le choix soit du virus (isolat clinique,

clone recombinant ou encore souche adaptée à la souris après plus de 170 passages sur des embryons, souche Ross), soit de la dose et/ou de la voie d'injection. Il est intéressant de noter que la voie intranasale est probablement le meilleur modèle d'infection encéphalitogène (Powers and Logue 2007; Wang, Volkova et al. 2008), alors que l'infection au niveau de la patte donne une arthrite pouvant aboutir à des ténosynovites sans complication cérébrale (Gardner, Anraku et al. 2010).

Le tableau III regroupe les six modèles expérimentaux qui ont été récemment décrits et avec une grande hétérogénéité dans le choix des souris (souche et âge), du virus CHIK (après un ou plusieurs passages sur des cellules Vero ou C6/36 ou dans le cerveau de souris nouveau-nées), et le choix de la dose de virus et du site d'injection :

\* Couderc *et al*, 2008 : souris C57BL/6 nouveau-nées et âgées de 6-9 jours, et souris adultes IFNAR<sup>-/-</sup>, injection intradermique au niveau du thorax, 10<sup>6</sup> PFU

\*\* Ziegler *et al*, 2008 : souris outbred ICR/CD1 nouveau-nées (2-3 jours) et âgées de 14 jours, clone LR2006-OPY1, après cinq passages sur des cellules VERO, injection sous-cutanée dans le dos de 10<sup>4.6</sup> PFU.

\*\*\* Gardner *et al*, 2010 : souris femelles C57BL6 âgées de six semaines (adultes), injection sous-cutanée au niveau de la patte de 10<sup>4</sup> CCID<sub>50</sub>: test de deux isolats du C HIKV : clone asiatique (1960) après 9-10 passages chez la souris et le clone LR2006-OPY1 (deux passages sur des cellules C6/36 d'*Aedes albopictus*).

\*\*\*\* Wang *et al.* 2008 : souris femelles (3-5 semaines) NIH swiss et C57BL6, injection intranasale en utilisant soit le clone LR2006-OPY1, ou la souche Ross (1953, et sélectionné après 175 passages chez des souris nouveau-nées),  $10^{6.5}$  PFU. Seule la souche Ross a donné des résultats concluants et avec des infections sévères du cerveau et décès des animaux à J7.

\*\*\*\*\* Schilte et al. 2010 : Souris adultes C57BL6 et KO pour soit RIG, IFNAR, Stat, TLR3, IPS1, MYD88, injection intradermique d'isolat clinique du CHIKV ( $10^2$ - $10^6$ PFU) amplifié par deux passages sur des cellules C6.36.

Le sixième modèle a été brièvement décrit par Powers *et al* 2007 (article de synthèse dans Journal of General Virology) : injection intranasale du CHIKV (Ross) chez des souris BALB/c adultes.

Le modèle du macaque (*Macaca fascicularis*, 3-5ans) décrit par Labadie et al. 2010 consiste en une injection du clone LR2006-OPY1 (après trois passages sur Vero) soit par voie intraveineuse soit par voie intradermique à la dose de  $10$ - $10^8$  PFU.

**Tableau III.** Modèle expérimental d'infection par le CHIKV chez la souris et chez le singe (macaque adulte)

Organe	Age, souris, Type cellulaire	Détection CHIKV	Inflammation	Référence
Muscle	Adulte (OF1, C57BL6, 129 sv)	-	?	Couderc, 2008
		+ (Jour 3-7)	?	Couderc, 2008
	Nouveau né (C57BL6)	+ (J3-)	Faiblesse musculaire	Couderc, 2008

	Adulte IFNAR -/- (129sv)	+ (jour 1-5)	Nécrose + infiltration (inf.)	Gardner, 2010
	Adulte (C57BL6)	+ (J1-10)	Nécrose + infiltr. + fibrose	Ziegler, 2010
	Nouveau né (ICR, CD1)	+ (J1-10)	?	Ziegler, 2010
	Adulte 14j (ICR, CD1)	+ (J2-8)		Labadie, 2010
	Macaque			
	Epimysium (muscle fascia)	++ (IF)	?	Couderc, 2008
	(nouveau né, ICR)	++ (IPO)	++ (nécrose, calcification)	Ziegler, 2008
	Péri et endomysium	+ (IF)	+	Couderc, 2008
	Cellules satellites	+ (IF)	+	Couderc, 2008
	Myofibres	-	?	Couderc, 2008
	Macrophages F4/80, IFNAR -/-	+ (IF)	?	Couderc, 2008
	Fibroblastes (Vimentin +), IFNAR -/-	+ (IF)	+	Couderc, 2008
	Endothelium (macaque)	+ (HIS)	?	Labadie, 2010
	Muscle sous-cutané	+	+	Ziegler, 2008
Peau	Adulte (OF1, C57BL6, 129sv)	-	-	Couderc, 2008
	Nouveau né (C57BL6)	+ (Jour 3-5)	?	Couderc, 2008
	Adulte IFNAR -/- (129sv)	+		Couderc, 2008
	Adulte C57BL6 (CHIKV GFP)	+(GFP, RTPCR)	↗ IFN- $\alpha$ 4, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\beta$	Schilte, 2010
	Macaque	+		Labadie, 2010
Epiderme	Keratinocytes	?	?	
	Melanocytes	?	?	
	Cellules Langherans CD45+	-	?	Schilte, 2010
	Leucocytes, CD45+	-	-	Schilte, 2010

Derme	Fibroblastes IFNAR -/-	+ (IF)	?	Couderc, 2008
	Fibroblastes C57BL6 WT	+	?	Schilte, 2008
	Muscle	+ (IPO)	Nécrose, calcification, inf.	Ziegler, 2008
Ganglion	Adulte (C57BL6)	+ jour 1-5	Hypertrophie	Gardner, 2010
			Infiltration leucocyte	Gardner, 2010
Sang	Adulte (OF1, C57BL6, 129 sv)	- +/- Jour 3	?	Couderc, 2008 Couderc, 2008
	Nouveau né (C57BL6)	++ J3		Couderc, 2008
	Adulte IFNAR -/- (129sv)	++ J1-7	?	Ziegler, 2008
	Nouveau né (ICR, CD1)	+ J1-5	?	Ziegler, 2008
	Adulte 14J (ICR, CD1)	+ (jour 1-4)	↗TNF $\alpha$ ,MCP1,IL6,IFN- $\alpha/\beta$	Gardner, 2010
	Adulte (C57BL6)	-	No IL1- $\beta$ and IL10	Schilte, 2010
	Adulte (C57BL6)	+++	No IFN- $\alpha/\beta$	Schilte, 2010
	Adulte (C57BL6, INFAR -/-)	+ (J1-3)	++ IFN- $\alpha/\beta$ , deaths	Schilte, 2010
	Adulte (C57BL6, IPS -/-)	+ (J1-3)	IFN- $\alpha/\beta$ ? , no death	Schilte, 2010
	Adulte (C57BL6, MYD88 -/-)	+ (J1-7)	IFN- $\alpha/\beta$ ? , no death	
	Macaque		↗MCP1,IL6,IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$ No IL1- $\beta$ , IL8, IL4, IL10	Labadie, 2010
		Leucocytes	-	-
Articulatio n	Adulte (OF1, C57BL6, 129 sv)	-		Couderc, 2008
		+ Jour 3-7)	?	Couderc, 2008



	Nouveau né (C57BL6) Adulte IFNAR -/- (129sv)	++ (J3)		Couderc, 2008
	Adulte (C57BL6)	+ (jour 1-9) ?	Œdème (jour 3-8) Infiltration (> 14jours) ↗ TNF- $\alpha$ , MCP-1, IFN- $\gamma$ no IFN- $\alpha$ 4 et IFN- $\beta$	Gardner, 2010 Gardner, 2010 Gardner, 2010
	Fibroblaste IFNAR -/- Fibroblaste	+ (IF) ?	? Tenosynovite Infiltration monocyte	Couderc, 2008 Gardner, 2010 Gardner, 2010
	Macrophages F4/80+	?	Infiltration monocyte	Gardner, 2010
	NK, B, T, mDC et pDC	?	Forte Infiltration	Gardner, 2010
Os	Chondrocyte, IFNAR -/-	-	-	Couderc, 2008
	Ostéocytes, Ostéoblastes, IFNAR -/-	-	-	Couderc, 2008
Foie	Adulte (OF1, C57BL6, 129sv) Nouveau né (C57BL6) Adulte IFNAR -/- (129sv) Adulte (C57BL6) Macaque	- + (Jour 5-7) + J3 + (jour 1-3) + (J 1-8)	?    Apoptose hépatocyte	Couderc, 2008 Couderc, 2008 Couderc, 2008 Gardner, 2010 Labadie, 2010
	Hépatocytes			
	endothélium sinusoïdale (Adulte IFNAR -/- (129sv) Macaque	+ (IF, EM) + (IF)	+	Couderc, 2008 Labadie, 2010

	Macrophages (F4/80+) (Adulte IFNAR -/- (129sv))	+	+	Couderc, 2008
	Kupffer (souris) Kupffer (macaque)	+ - (IF)	? Hemosiderin +	Couderc, 2008 Labadie, 2010
Rate	Adulte (OF1, C57BL6, 129sv) Nouveau né (C57BL6) Adulte IFNAR -/- (129sv) Adulte (C57BL6) Macaque	- - + + J 1-5 + J 1-8	? ? ? Hyperplasie (T) Hyperplasie, $\nearrow$ macrophage	Couderc, 2008 Couderc, 2008 Couderc, 2008 Gardner, 2010 Labadie, 2010
	Macrophage F4/80 , IFNAR -/- Macrophage F4/80 Macrophage + endothelium Cell. dendritique (S100+)	+ + + ISH, IF + (IF)	? Ex vivo infection, cytopathie	Couderc, 2008 Gardner, 2010 Labadie, 2010 Labadie, 2010
SNC	Adulte (OF1, C57BL6, 129sv) Nouveau né (C57BL6) Nouveau né (ICR, CD1) Adulte IFNAR -/- (129sv) Adulte (C57BL6) Adulte 14j Adulte C57BL6, intranasale, Ross	- +/- (J3-7) + (J1-10) + J3 - - + + +	     Activation glie (microglie) Apoptose / nécrose neurones Infiltration lymphocytaire	Couderc, 2008 Couderc, 2008 Ziegler, 2008 Couderc, 2008 Gardner, 2010 Ziegler, 2008 Wang, 2008 Powers, 2007

	Adulte Balb/C, intranasale, Ross Macaque (forte dose CHIKV)		Nécroses des neurones (Olf)  CD8+, MØ dans le LCR	Labadie, 2010
	Cellules épithéliales des plexus choroïdes, IFNAR -/-	++	++	Couderc, 2008
	Cellules épendymaires, IFNAR -/-	++	++	Couderc, 2008
	Cellules leptoméningées, IFNAR -/-	++	++	Couderc, 2008
	Neurone hippocampe	+ (IPO)	+	Wang, 2008
	Neurone bulbe olfactif (IN)	+ (IPO)	Nécrose, apoptose	Powers, 2007
	Neurones, IFNAR -/-	-	?	Couderc, 2008
	Neurones du cortex cérébral	+ (IPO)	+	Wang, 2008
	Neurones de Purkinje cervelet	?	+ nécrose	Wang, 2008
	Endothélium du parenchyme	-	-	Couderc, 2008
	Astrocytes, IFNAR -/-	-	-	Couderc, 2008
	Cellules microgliales, IFNAR -/-	-	-	Couderc, 2008
Placenta	IFNAR -/-	-	-	Couderc, 2008

## V. La maladie chikungunya chez l'homme

Le cycle de l'infection vecteur-hôte pourrait se schématiser de la sorte : 1) le moustique prend son repas sanguin à partir d'un hôte infecté. Le repas sanguin doit contenir une concentration suffisante de virus pour permettre au virus de passer du tube digestif aux autres tissus (cycle extrinsèque), 2) s'ensuit une période d'incubation de quelques jours à quelques

semaines durant laquelle le virus se réplique dans les glandes salivaires qui deviennent infectées de façon persistante, sans effet cytopathogène. Le virus peut être ainsi transmis à différents hôtes durant toute la vie du moustique, 3) l'infection des hôtes vertébrés conduit à une multiplication virale, voire une virémie avec une symptomatologie clinique (Ryman and Klimstra 2008).

## **V.1 Tableau clinique usuel**

Le terme Chikungunya signifie dans la langue Makonde de la Tanzanie et du Mozambique « celui qui marche courbé », faisant référence à la posture des patients souffrant des douleurs articulaires invalidantes. La première description clinique a été rapportée par Marion Robinson (Robinson 1955) lors de l'épidémie 1952-53 survenue dans le district de Newala au Tanganyika, actuelle Tanzanie. Il s'agit d'un syndrome dengue-like (selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé, OMS), classiquement décrite comme bénigne, d'évolution aiguë ou sub-aiguë (Deller and Russell 1968 ; Jeandel, Josse et al. 2004), hormis quelques cas rares d'encéphalites rapportés en Asie chez des enfants (Chastel 1964; Mazaud, Salaun et al. 1971).

Le tableau clinique est aussi très proche de celui d'un autre alphavirus, RRV, qui lui sévit essentiellement en Océanie (Australie, Papouasie-Nouvelle-Guinée, îles Salomon) (Tesh and Gubler 1975), mais serait moins fébrile et sans atteinte du cerveau (Anderson and French 1957).

Après une incubation de 2 à 7 jours, CHIKV cause un tableau clinique caractérisé par une forte fièvre ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) d'apparition brutale (bien des patients nous ont rapporté une fièvre exceptionnelle avec un plateau à plus de  $40^{\circ}\text{C}$  pendant 3-4 jours), des frissons ainsi que des céphalées, rapidement accompagnée de myalgies, polyarthralgies mobiles classiquement symétriques (atteignant typiquement les genoux, les chevilles et les petites articulations) puis d'un rash maculo-papuleux contemporain de la défervescence thermique. Ce dernier peut toucher le visage, le cou, le tronc ou les membres mais surtout le thorax et peut être associé à un

œdème facial (Simon, Parola et al. 2007 ; Manimunda, Vijayachari et al. 2010). L'éruption cutanée morbilliforme est le plus souvent prurigineuse et parfois associée à une atteinte des muqueuses (aphtes, vésicules). Fourie *et al.* ont été les premiers à associer cette éruption cutanée à des signes histologiques comprenant essentiellement comme une forte infiltration immunitaire dans le parenchyme dermique (Fourie and Morrison 1979). Au niveau de l'épiderme, cette inflammation locale pourrait contribuer à une fragilisation des parois capillaires et à l'apparition d'érythrocytes au niveau du périoderme. Des pétéchies ne sont pas rares, mais les formes hémorragiques sont exceptionnelles. Des troubles de la sensibilité cutanée (paresthésies, picotements, sensation de brûlure) en regard de l'articulation sont souvent rapportés, ainsi qu'un œdème, mais sans signe inflammatoire (Borgherini, Poubeau et al. 2007).

Les articulations fragilisées (traumatisme, ancienne entorse, fracture) sont particulièrement susceptibles. Ces atteintes articulaires, pouvant entraîner une incapacité fonctionnelle importante (impossibilité d'ouvrir une bouteille ou de saisir un verre), sont aggravées chez le sujet âgé par la déshydratation. Parfois, la fièvre réapparaît après une phase d'amélioration. Des signes digestifs peuvent accompagner le tableau, à type de nausées et de vomissements. La maladie aiguë guérit généralement en deux semaines, mais la convalescence peut s'accompagner d'une asthénie importante. Les formes asymptomatiques constituent environ 5-15% des cas, taux relativement faible si l'on compare à d'autres viroses telles que la dengue (> 50% ) ou le virus West Nile (>70%)(Biggerstaff and Petersen 2003; CDC 2004; Gerardin, Barau et al. 2008 ). Les enfants présentent volontiers des formes plus bénignes.

**Tableau IV.** Caractéristiques cliniques principales observées chez 157 patients présentant une infection à CHIKV ( issu de (Borgherini, Poubeau et al. 2007)).

Symptômes	%
Fièvre	89
Polyarthralgie	96,1
Œdème	31,8
Eruption cutanée	40,1
Démangeaison	54
Céphalée	47,1
Signes gastro-intestinaux	47,1
Signes neurologiques	12,1

Sur le plan biologique, de façon paradoxale avec la forte fièvre observée, les paramètres biologiques (transaminases ALAT, ASAT) et inflammatoires classiques, CRP (C-reactive protein), fibrinogène, complément sont peu ou pas augmentés (Fourie and Morrison 1979; Kennedy, Fleming et al. 1980; Borgherini, Poubeau et al. 2007; Taubitz, Cramer et al. 2007; Ng, Chow et al. 2009 ). Néanmoins, une lymphocytose ainsi qu'une thrombopénie caractérisent la phase aiguë initiale (Borgherini, Poubeau et al. 2007). Pour Ng *et al*, une augmentation de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 ainsi qu'une diminution de RANTES (Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted) seraient associées à une sévérité de la maladie.

Toutefois, il est à noter que l'étude a été réalisée chez dix patients (age <45 ans et sans facteur de comorbidité) et que la sévérité avait été définie sur des critères peu spécifiques et probants tels qu'un taux de plaquettes < 100x10<sup>9</sup>/L, une fièvre >38.5°C ou encore une pulsation cardiaque >100/min (Ng, Chow et al. 2009). Plus de trente cytokines et chimiokines furent analysées dans

cette étude et aucune différence significative n'a été observée par rapport à une cohorte de sujets sains.

## **V.2 Signes cliniques non classiques**

Durant l'épidémie réunionnaise, des signes d'atteintes ophtalmiques ont été décrits à type d'atteinte muqueuse (hémorragie, hyperhémie), baisse de l'acuité par trouble de l'accommodation visuelle, paralysie oculomotrice (diplopie) (Gauzere 2007).

Un grand éventail des atteintes dermatologiques a été rapporté : kératodermie palmo-plantaire, éruptions dyshydrosiques, purpura, formes vésiculeuses profuses, bulleuses, ulcérations aphtoïdes buccales, bipolaires, inguino-scrotales, exacerbations de dermatoses préexistantes, hyperpigmentations, érythème noueux (Gauzere 2007 ; Robin, Ramful et al. 2010).

## **V.3 Formes émergentes graves du CHIKV chez l'adulte**

L'infection par le CHIKV était réputée ne pas mettre en jeu le pronostic vital. Pour la première fois, des décès (254) ont été attribués directement ou indirectement au CHIKV, soit 1 décès pour 1 000 cas à la Réunion (Renault, Solet et al. 2007), ainsi qu'en Inde (Mavalankar, Shastri et al. 2007). Parmi les formes graves, deux types de manifestations d'ominent : les atteintes neurologiques et les insuffisances hépatiques, ainsi que des décompensations de pathologies chroniques chez des patients souvent âgés (insuffisance respiratoire, rénale, cardiaque, diabète...), de plus aggravées par la déshydratation majorée par les températures élevées de l'été austral, par la toxicité des drogues (anti-inflammatoires non stéroïdiens AINS, paracétamol...) et par l'utilisation de la pharmacopée locale (herbages, tisanes).

### V.3.1 Formes neurologiques :

Les manifestations neurologiques graves chez l'adulte suite à l'infection CHIKV n'avaient été que rarement décrites par le passé (Mazaud, Salaun et al. 1971). Durant l'épidémie réunionnaise, nous avons rapporté, ainsi que d'autres auteurs, des tableaux d'encéphalite, de méningo-encéphalite, avec la présence d'IgM anti-CHIKV dans le liquide céphalo-rachidien (Gauzere 2007 ; Lemant, Boisson et al. 2008; Economopoulou, Dominguez et al. 2009 ; Tandale, Sathe et al. 2009). Les premiers cas de polyradiculonévrite (syndromes de Guillain-Barré) ont aussi été observés à la Réunion durant l'épidémie (Wielanek, Monredon et al. 2007), puis en Inde (Tandale, Sathe et al. 2009). Certains cas ont nécessité une assistance ventilatoire, mais tous ont eu une évolution favorable, la plupart avait été traitée par des immunoglobulines polyvalentes (Gauzere 2007; Wielanek, Monredon et al. 2007).

### V.3.2 Des formes hépatiques:

Des hépatites graves ou fulminantes avec comme facteurs aggravants, un éthyliisme chronique et probablement la consommation de paracétamol (Garnier P 2006 ; Gauzere 2007 ; Tandale, Sathe et al. 2009), ou des atteintes rénales (Solanki, Arya et al. 2007) ont été rapportées.

## **V.4 Rhumatisme chronique post-CHIKV**

Il est constitué d'une polyarthrite d'intensité variable, symétrique et touchant en particulier les poignets de type polyarthrite rhumatoïde-like (PR-like) ou spondylarthrite-like durant plusieurs mois, voire années après l'épisode aiguë et atteignant plus volontiers les femmes (Fourie and Morrison 1979; Simon, Parola et al. 2007; Chopra, Anuradha et al. 2008; Bouquillard and



Combe 2009; Malvy, Ezzedine et al. 2009; Sissoko, Malvy et al. 2009 ; Manimunda, Vijayachari et al. 2010).

A la différence de la dengue, les arthralgies persistantes du CHIKV peuvent entraîner une incapacité de plusieurs semaines, voire de plusieurs mois. Ces atteintes sont connues pour d'autres alphavirus, dont le RRV et SINV (Tesh 1982; McGill 1995; Toivanen 2008). Cette atteinte entraînant une incapacité fonctionnelle chez nombre de malades, constitue un problème majeur de santé publique. Les articulations les plus touchées sont les poignets, les chevilles, les articulations métacarpo-phalangiennes et les interphalangiennes proximales. Si, dans la majorité des cas, les patients se considèrent complètement guéris 3 ans après la phase aiguë, un certain nombre d'entre eux présentent encore des signes cliniques allant de la raideur à un tableau d'arthrite chronique associant douleurs articulaires persistantes, raideur et oedèmes fréquents (Ross 1956; Brighton, Prozesky et al. 1983). En considérant l'ensemble de la population, y compris les moins de 17 ans, Brighton *et al* ont observé environ 12% d'arthralgies chroniques à 3 ans post-CHIKV (Brighton, Prozesky et al. 1983).

Plus récemment, deux études réalisées chez l'adulte ont observé environ 60 % d'arthralgies chroniques 15 à 18 mois post-CHIKV (Borgherini, Poubeau et al. 2008; Sissoko, Malvy et al. 2009). La raideur matinale reste le symptôme le plus caractéristique, et dure en moyenne de 20 à 45 minutes (Sissoko, Malvy et al. 2009), jusqu'à 1 à 2 heures (Kennedy, Fleming et al. 1980).

Sur le plan biologique, les paramètres hématologiques et inflammatoires, ainsi que les dosages enzymatiques restent en général dans la norme ou sont peu augmentés ((Brighton, Prozesky et al. 1983; Borgherini, Poubeau et al. 2008). Les patients restent immunisés avec des taux d'IgG élevés (Borgherini, Poubeau et al. 2008). Le taux des IgM spécifiques reste également très élevé mais sans qu'il soit préférentiellement plus élevé dans le groupe de patients arthritiques post-CHIK par rapport au groupe guéris (Borgherini, Poubeau et al. 2008). Ceci contraste avec d'autres données où la persistance des IgM spécifiques est retrouvée essentiellement chez les

patients chroniques (Grivard, Le Roux et al. 2007; Chopra, Anuradha et al. 2008 ; Malvy, Ezzedine et al. 2009). Il est intéressant de noter que ces arthrites post-CHIKV ne sont pas nécessairement accompagnées d'une élévation des biomarqueurs de la poly-arthrite rhumatoïde tels que les anti-CCP (anticorps anti-peptides cycliques citrullinés) ou le FR (Facteur Rhumatoïde) (Chopra, Anuradha et al. 2008 ; Bouquillard and Combe 2009). L'association avec le typage HLA-B27 a été décrite notamment dans les cas d'arthrites post-CHIK sévères (Chopra, Anuradha et al. 2008; Malvy, Ezzedine et al. 2009 ).

L'inflammation du périoste est aussi caractéristique, évoluant vers une ténosynovite ou enthésopathie, objectivée à la radiologie par l'image d'apposition périostée (Simon, Parola et al. 2007 ; Jaffar-Bandjee, Das et al. 2009). Le traitement de ces formes est symptomatique avec la prescription de paracétamol associé aux anti-inflammatoires non-stéroïdiens, l'utilisation de glucocorticoïdes et du méthotrexate restant réservée aux cas les plus sévères (Chopra, Anuradha et al. 2008; Malvy, Ezzedine et al. 2009). Une étude réalisée après 15 mois d'évolution post-CHIKV a identifié comme facteurs prédisposant à l'évolution clinique l'âge supérieur ou égal à 45 ans, la sévérité des atteintes articulaires initiales, la présence de comorbidités (atteintes ostéo-articulaires, hypertension) (Sissoko, Malvy et al. 2009) ainsi que le bas niveau d'éducation (Larrieu, Poudroux et al.).

Même si les cas restent rares, des atteintes articulaires évoluant vers la synovite, voire un tableau de polyarthrite rhumatoïde-like ont été décrits chez des patients positifs pour le FR et les anti-CCP (Kennedy, Fleming et al. 1980 ; Chopra, Anuradha et al. 2008). Plus récemment, un cas d'arthrite destructive sans marqueur d'auto-immunité, mais avec des IgM persistantes a été rapporté (Malvy, Ezzedine et al. 2009).

Ces tableaux d'arthrites post-infectieuses ressemblent beaucoup à ceux décrits dans le cas d'une infection à RRV où il a été observé des épanchements synoviaux correspondant à un liquide

inflammatoire de type monocytaire, avec des macrophages contenant des inclusions virales (entre 2 000 à 5 000 éléments/mm<sup>3</sup>) (Clarris, Doherty et al. 1975; Fraser 1986). La présence d'une chondrolyse à l'imagerie (destruction cartilagineuse), une vitesse de sédimentation augmentée ou la présence d'une monoarthrite articulaire ne sont, par contre, pas en faveur d'une arthrite post-alphavirus (Fraser 1986; Harley, Sleight et al. 2001; Suhrbier and La Linn 2004).

## **V.5 Formes émergentes du nouveau-né et de l'enfant**

### V.5.1 Description de la transmission verticale materno-néonatale

Une transmission verticale materno-néonatale a été la première fois rapportée durant l'épidémie réunionnaise (Robillard, Boumahni et al. 2006 ; Touret, Randrianaivo et al. 2006). Ramful *et al* (Ramful, Carbonnier et al. 2007) ont rapporté 38 cas de transmission materno-néonatale durant l'épidémie 2005-2006 à la Réunion. La grande majorité des mères étaient symptomatiques durant la période périnatale, en moyenne 4 jours avant et 1 jour après l'accouchement. Tous les nouveau-nés étaient symptomatiques à 3 -7 jours de vie. L'intervalle entre les signes cliniques maternels et les signes cliniques chez le nouveau-né était de 5 jours (3-9 jours).

Les signes cliniques les plus fréquents étaient la fièvre (79%), la douleur (100%) et l'éruption (82%), ainsi que les œdèmes périphériques (58%). Sur le plan biologique, on notait une thrombopénie (76%), une lymphopénie (47%), une diminution du temps de prothrombine (65%), ainsi qu'une augmentation des ASAT (77%). Les complications étaient à type de convulsions, de syndromes hémorragiques et de désordres hémodynamiques. La détection virale par RT-PCR était positive dans 22/24 cas. Les anomalies retrouvées à l'IRM (imagerie par résonance magnétique) étaient des lésions de la substance blanche du corpus callosum, des lobes fronto-pariétaux et/ou des hémorragies intraparenchymateuses évoluant vers la cavitation ou l'atrophie

souscorticale (Gerardin, Barau et al. 2008). Des signes d'atteinte cardiaque, d'hypertrophie myocardique, de dysfonctionnement ventriculaire, d'épanchement péri-cardiaque et des dilatations des artères coronaires participaient à la clinique. Cette transmission verticale durant la période du péri-partum dont le taux a été évalué à 50%, résulte du passage de sang virémique maternel à la faveur des contractions utérines lors du travail (Gerardin, Barau et al. 2008). Après 16 à 24 mois d'évolution, des séquelles essentiellement neurologiques sont observées, à type de retard de langage, de paralysie, d'ataxie, de convulsions. Le suivi de deux cohortes de femmes enceintes, l'une ayant contracté le CHIKV pendant la grossesse et l'autre pas, a montré que le CHIKV, en dehors du taux d'hospitalisation, n'a eu aucune influence sur l'évolution de la grossesse ; c'est-à-dire sur les paramètres suivants : césarienne, hémorragies, prématurité, mort-nés, poids de naissance, malformations congénitales, hospitalisation du nouveau-né (Fritel, Rollot et al.).

#### V.5.2 Caractéristiques cliniques en pédiatrie :

Bien que les enfants présentent généralement des formes moins graves, l'étude réunionnaise pédiatrique d'Ernould *et al.* rapporte des atteintes digestives plus fréquentes, pouvant entraîner des déshydratations, des éruptions vésiculeuses ainsi que des atteintes neurologiques sévères (Ernould, Walters et al. 2008). Les cas de complications neurologiques rapportés dans la littérature étaient jusque là rares (Chastel 1963; Chatterjee, Chakravarti et al. 1965; Nimmannitya, Halstead et al. 1969).

Robin *et al* ont observé que les manifestations neurologiques étaient à l'origine de 24% des motifs d'hospitalisations pédiatriques. Ils ont décrit plusieurs atteintes graves à type d'encéphalites, de convulsions fébriles de méningites et d'encéphalopathies ainsi que quelques décès (Robin, Ramful et al. 2008). Les garçons étaient plus concernés (sex ratio 3/1) et

l'imagerie (IRM) montrait des anomalies des régions sous-corticales, des hémorragies dans les zones supratemporelles et cérébelleuses chez les patients ayant une issue fatale ou présentant des séquelles (Robin, Ramful et al. 2008). Ces formes neurologiques sont aussi rapportées par Lewthwaite (Lewthwaite, Vasanthapuram et al. 2009). Le pronostic à long terme de ces formes reste néanmoins globalement bon.

L'équipe pédiatrique réunionnaise a aussi rapporté la première description d'éruption bulleuse sévère rare à type d'épidermolyse bulleuse (Robin, Ramful et al.). Ces atteintes, avec d'importants décollements cutanés et associées à des atteintes muqueuses (aphtes, ulcérations), sont décrites chez le nourrisson de moins de six mois, préférentiellement de sexe masculin. L'analyse histologique des bulles montre un clivage intra-épidermique; le CHIKV a été isolé des biopsies cutanées, parfois à des taux à plus de 20 fois supérieurs à la virémie du patient (Robin, Ramful et al.). Ces formes ont nécessité pour la plupart une hospitalisation en soins intensifs ou dans le service des grands brûlés. Aucun décès n'est survenu, mais le pronostic cutané pour certains patients était compromis par d'importantes séquelles d'ordre esthétique. De rares atteintes cardiaques à type de myocardite et de coronarite d'évolution favorable ont été aussi rapportées (Ernould, Walters et al. 2008).

## **V.6 Diagnostic au laboratoire**

### V.6.1 Mise en évidence du virus :

La mise en évidence du virus par isolement sur cellules Vero ou C6/36 d'*Ae. albopictus* ou par RT-PCR ciblant une protéine structurale (Pastorino, Bessaud et al. 2005) ou non structurale (Osiak, Utermohlen et al.) n'est réalisable que pendant la phase virémique, du 1<sup>e</sup> au 7<sup>e</sup> jour de la maladie (Rezza, Nicoletti et al. 2007). L'effet cytopathogène (ECP) est observé après 2 à 3 jours

de culture (Pastorino, Muyembe-Tamfum et al. 2004). Cette virémie peut atteindre des taux élevés à  $10^{10}$  copies d'ARN/ml (Grivard, Le Roux et al. 2007 ; Panning, Grywna et al. 2008). La technique de RT-PCR a permis également de mettre en évidence des taux élevés d'ARN du CHIKV en phase aiguë de la maladie dans de multiples tissus tels que le foie, la rate, le cerveau et LCR (Grivard, Le Roux et al. 2007). Dans les formes bulleuses, CHIKV peut être détecté à des taux supérieurs à ceux mesurés dans le sang pour un même individu (Robin, Ramful et al. 2010). CHIKV est présent dans les urines, les larmes mais pas dans le liquide séminal, le lait ou encore les lavages broncho-alvéolaires (Grivard, Le Roux et al. 2007). La détection par amplification moléculaire serait probablement positive 24h avant l'apparition des signes cliniques. En effet, l'analyse systématique des donneurs de plaquettes à partir de 2006 à La Réunion par notre laboratoire a permis d'écarter un donneur avec une RT-PCR positive au moment du don, avant qu'il ne développe la maladie. De manière intéressante, la virémie est beaucoup plus importante chez les personnes âgées (>45 ans) avec des taux allant de  $10^5$  copies d'ARN à plus de  $10^9$ /ml pour les patients de plus de 70 ans (Laurent, Le Roux et al. 2007). Cette observation est à corréliser avec la démonstration expérimentale chez le macaque que des doses importantes de virus vont induire une pathologie sévère avec des séquelles neurologiques (Labadie, Larcher et al. 2010).

#### V.6.2 Sérologie :

La mise en évidence des anticorps (Ac) débute par celle des IgM détectables à partir du 4<sup>e</sup> ou 5<sup>e</sup> jour, puis est poursuivie par la séroconversion avec l'apparition des IgG vers le 10<sup>e</sup> jour (Panning, Grywna et al. 2008). Les IgM sont présents en moyenne 8 à 12 semaines, mais peuvent être encore détectés plusieurs mois après le début de la maladie (Panning, Grywna et al. 2008). Les anticorps essentiels pour la guérison interagissent essentiellement avec les glycoprotéines E1, E2 et la capsid des alphavirus exprimées à la surface cellulaire (Griffin

1995). Des études *in vivo* suggèrent que ces Ac vont permettre d'éliminer le virus de façon synergique avec l'IFN de type I (Griffin 1995 ; Couderc, Khandoudi et al. 2009). Le diagnostic d'une infection aiguë est confirmé par la séroconversion ou l'augmentation significative du taux des IgG sur deux sérums réalisés à deux semaines d'intervalle. Des réactions croisées avec d'autres alphavirus, en particulier ONNV, sont rapportées (Calisher, el-Kafrawi et al. 1986 ; Johnson 1988). Par ailleurs, des faux-positifs en IgM par stimulation polyclonale sont observés, en particulier avec les flavivirus tels que la dengue. Les IgM persistantes (persistance et maintien des titres IgM et des IgG et sur les deux sérums) peuvent se voir chez des sujets asymptomatiques et en bonne santé (Suhrbier and La Linn 2004). Néanmoins, plusieurs études s'accordent sur le fait que la persistance des IgM chez des sujets souffrant d'arthrite post-CHIK serait liée à la persistance de matériel viral dans des gîtes sanctuaires (Kuno 2001 ; Malvy, Ezzedine et al. 2009)}.

## V.7 Traitements

### V.7.1 Traitements symptomatiques

Il n'existe à ce jour aucun médicament spécifique pour traiter l'infection. La thérapie reste essentiellement symptomatique. La prise en charge thérapeutique d'une forme classique repose sur la prescription d'antalgiques (AINS, paracétamol), d'antipyrétiques. Le traitement des formes graves (neurologiques, hépatiques, dermatologiques) associé à ces médicaments, le maintien des fonctions essentielles. L'aspirine est contre-indiquée en raison de l'aggravation potentielle des manifestations hémorragiques (thrombopénie, purpura, hémorragies conjonctivales...) (Simon, Parola et al. 2007).

Les corticoïdes à doses rapidement dégressives ont été utilisés dans des formes chroniques invalidantes. La chloroquine qui montrait *in vitro* une certaine activité antivirale (Sourisseau, Schilte et al. 2007) et semblait être prometteuse dans le traitement des arthrites chroniques (Brighton 1984) n'a pas fait la preuve de son efficacité (De Lamballerie, Boisson et al. 2008). L'utilisation de méthotrexate reste un recours efficace dans les formes d'arthrites chroniques sévères.

Chez la souris, l'INF $\alpha$  semble protéger de l'infection à condition d'avoir été donné avant l'infection, rendant son application difficile en clinique (Gardner, Anraku et al. 2010).



## V.7.2 Immunothérapie

### V.7.2.1 *Immunothérapie passive*

L'utilisation d'IgG polyvalentes purifiées isolées à partir de plasma de sujets immunisés suscite un intérêt, en particulier chez le nouveau-né dont la mère serait virémique, ainsi que chez certains sujets à risque (Couderc, Khandoudi et al. 2009).

### V.7.2.2 *Les pistes vaccinales*

Plusieurs essais vaccinaux à base de souches virales inactivées ou atténuées ont été testés chez l'homme et l'animal avec des succès variés (Harrison, Eckels et al. 1971; Levitt, Ramsburg et al. 1986; Edelman, Tacket et al. 2000; Muthumani, Lankaraman et al. 2008). Le vaccin vivant atténué (TSI-GSD-218) développé à partir d'une souche thaïlandaise des années 60 par la Walter Reed Institute, présentait une bonne immunogénicité, une relative bonne tolérance avec quelques douleurs comme effets secondaires (Edelman, Tacket et al. 2000). Mais ces essais n'ont pu être poursuivis, en raison d'un manque de moyen financier et du potentiel commercial limité.

Plus récemment, d'autres types de vaccins, ADN synthétique ou virus chimérique, ont été testés chez la souris et semblent être prometteurs (Muthumani, Lankaraman et al. 2008; Wang, Volkova et al. 2008). Des essais complémentaires chez le NHP seront nécessaires afin de déterminer la dose efficace ainsi que la durée de l'immunisation. Plus récemment, Gardner et al ont montré que la vaccination contre RRV chez la souris protégerait du CHIK (Gardner, Anraku et al. 2010). Une autre piste est celle des vaccins contre des épitopes de protéines virales dont le principe consiste à identifier des épitopes dominants 1) stimulant les cellules B et représentant la cible des Ac neutralisants 2) stimulant les cellules T et représentant la cible des cellules T cytotoxiques, ou reconnus par les cellules T CD4+ Helper et optimisant ainsi la production d'Ac (Welsh and Fujinami 2007).

De nouvelles approches vaccinales utilisant l'ARN interférent (ARNi) qui agit au niveau transcriptionnel, pourraient interférer au niveau de la réplication virale en dégradant les ARN ayant une séquence similaire à l'ARN double brin (Bernstein, Denli et al. 2001; Caplen, Zheng et al. 2002; O'Brien 2007). Des premiers résultats utilisant du siRNA (small interfering RNA) ciblant les gènes NsP3 et E1 montrent des effets inhibiteurs, mais limités dans le temps, probablement dus au potentiel de réplication rapide des alphavirus (Dash, Tiwari et al. 2008).

## **V.8 Mesures de prévention**

Le contrôle vectoriel constitue la pierre d'angle de prévention et de contrôle de la maladie. La stratégie de contrôle d' *Ae. albopictus* comprend deux niveaux, individuel et collectif. Au niveau individuel, il s'agit essentiellement de suivre une prophylaxie d'exposition afin d'éviter la piqûre : utilisation de moustiquaires traitées par l'insecticide, répulsifs, port de vêtements à longues manches et de pantalons qui peuvent être imprégnés d'insecticides (perméthrine), chaussures fermées, diffuseurs d'insecticides...

L'utilisation des répulsifs est recommandée, avec des précautions à respecter, chez la femme enceinte et l'enfant de moins de 12 ans. Chez le nouveau-né de moins de trois mois, il convient de ne pas utiliser de produit répulsif et de privilégier l'emploi de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes (perméthrine, deltaméthrine). En raison de la très forte virémie pendant la maladie, il faut également insister sur la nécessité d'isoler les malades (confinement à domicile, répulsifs...), afin de limiter la dissémination du virus.

Au niveau collectif, la lutte anti-vectorielle est mécanique, chimique et biologique. A la Réunion, différentes actions de lutte ont été menées par les autorités sanitaires et les professionnels afin de sensibiliser et de mobiliser la population pour réduire le nombre de gîtes larvaires par une suppression systématique de toutes les réserves d'eau stagnante à proximité des maisons

(Opération « Kass'Moustik » (Dehecq JS 2008). La difficulté de cette lutte anti-vectorielle relève de l'éducation et du maintien de la sensibilisation de la population, ce qui nécessite régulièrement des rappels (Dehecq JS 2008). En zone infectée et en période épidémique, la lutte contre le vecteur adulte se fait par épandages aériens nocturnes d'insecticides à base de pyréthriinoïdes ou d'organophosphorés. Certains insecticides organophosphorés, méthylpyrimiphos, théméphos, féniltrothion, en raison de leur impact sur l'écologie, ont été remplacés à la Réunion par le BTI (toxine de *Bacillus thuringiensis israeliensis*) qui est larvicide.

Néanmoins, comparé à *Ae. Aegypti* urbain, la lutte anti-vectorielle contre *Ae. albopictus* qui, lui, est sub-urbain, rural et forestier, est plus difficile et son éradication presque impossible (Her, Kam et al. 2009). Des stratégies alternatives sont en cours d'étude et misent sur son contrôle biologique (utilisation d'organismes larvivores ou de bioinsecticides) et génétique par le relargage d'insectes stériles ou de moustiques génétiquement modifiés qui seront incapables de transmettre les maladies à l'homme.

Malgré tous ces moyens, le contrôle vectoriel est difficile à mettre en œuvre et peu efficace. Ces échecs sont généralement attribués au manque de connaissance de la bio-écologie de l'insecte vecteur et de la stratégie inappropriée du contrôle vectoriel. Le contrôle vectoriel doit tenir compte du niveau socio-culturel, de l'éco-épidémiologie local ainsi que des changements climatiques.

## **VI. Réponse immunitaire protectrice contre l'infection par les alphavirus**

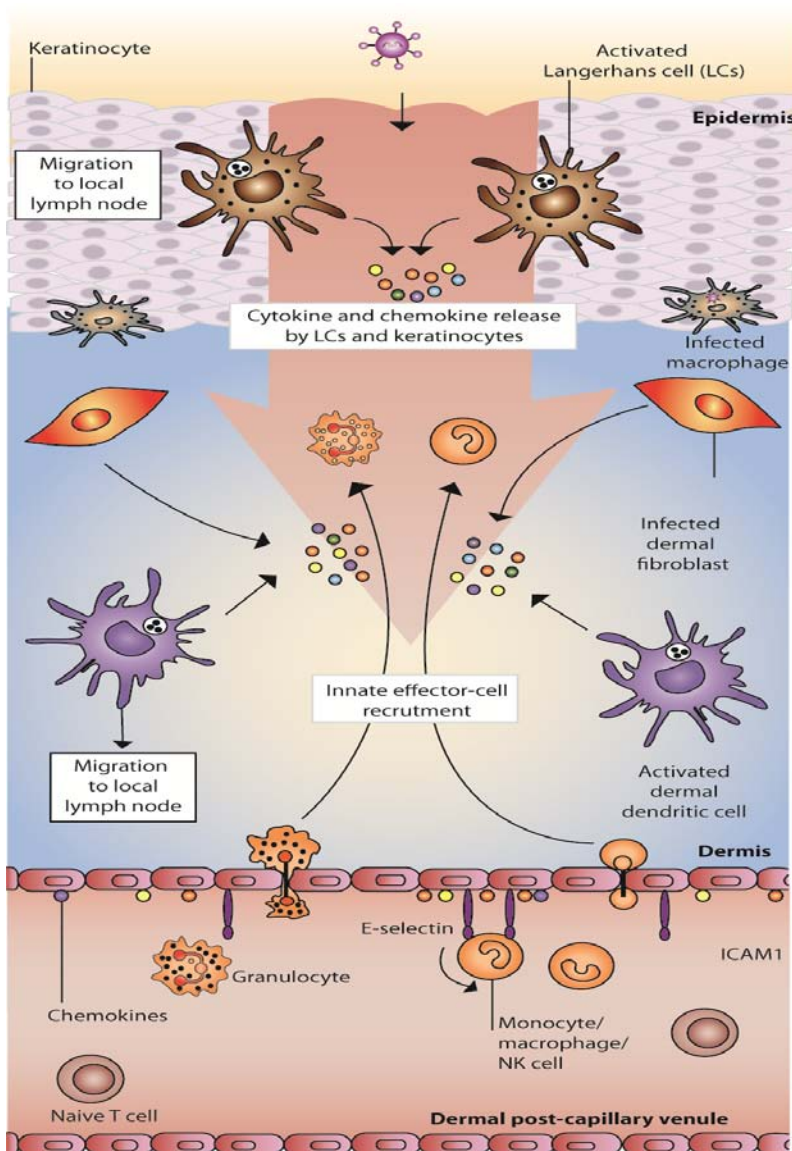
### **VI.1 Scénario probable de l'initiation de la réponse immunitaire**

Suite à l'inoculation intradermale par des femelles moustiques infectées, la réplication du virus débute au site d'inoculation. Différents types de cellules résidentes sont présentes, dont les kératinocytes, les cellules dendritiques dermales (DCs), les cellules de Langerhans (LCs) et les macrophages (Kupper and Fuhlbrigge 2004). Les fibroblastes semblent être les principales cellules susceptibles à l'infection CHIKV (Sourisseau, Schilte et al. 2007), bien que les macrophages du derme pourraient également répliquer CHIKV, puisqu'il a été montré que les macrophages humains mais pas les DCs en culture sont sensibles à l'infection (Sourisseau, Schilte et al. 2007 ; Labadie, Larcher et al. 2010) (**Figure 6**).

*In vitro*, les DCs humaines et murines sont résistantes à l'infection et ne produisent pas d' IFN de type I lorsqu'elles sont mises en présence de forte multiplicité d'infection (MOI) de CHIKV (Sourisseau, Schilte et al. 2007; Gardner, Burke et al. 2008; Labadie, Larcher et al. 2010). Il s'ensuit probablement un afflux de macrophages, de neutrophiles, de DCs, et de cellules NK, comme cela a été décrit chez l'homme et dans les modèles expérimentaux (Fourie and Morrison 1979; Gardner, Anraku et al. 2010; Labadie, Larcher et al. 2010). Ces cellules de l'immunité innée peuvent sécréter différentes cytokines et des chimiokines ainsi que de l'IFN- $\alpha$  ayant des propriétés anti-virales. Cette réponse serait essentielle pour contenir le virus au niveau de la peau et limiter sa propagation sans la stopper totalement (Schilte, Couderc et al. 2010). Le virus pourrait se propager via des cellules immunes migratrices (qui restent à identifier) ou sous sa

forme libre et gagnerait la circulation sanguine et les ganglions lymphatiques. Ces événements permettraient la mise en place des premiers éléments de la réponse immune adaptative.

**Figure 6.** La réponse immune localisée au niveau du site infectieux contre les alphavirus.



Une fois dans le sang, le virus peut atteindre tous les organes y compris les articulations et le cerveau. Il reste à déterminer si le virus est produit continuellement dans le sang, dans les

ganglions ou d'autres tissus, sachant que les PBMCs ne sont pas ou très peu infectés (Sourisseau, Schilte et al. 2007 ; Her, Malleret et al. 2010).

Comprendre les mécanismes moléculaires de la détection du CHIKV ainsi que les cascades de réactions de la signalisation intracellulaire menant à la production de cytokines et à l'activation des cellules T/B est extrêmement important pour mieux comprendre la physiopathologie du CHIKV mais également le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

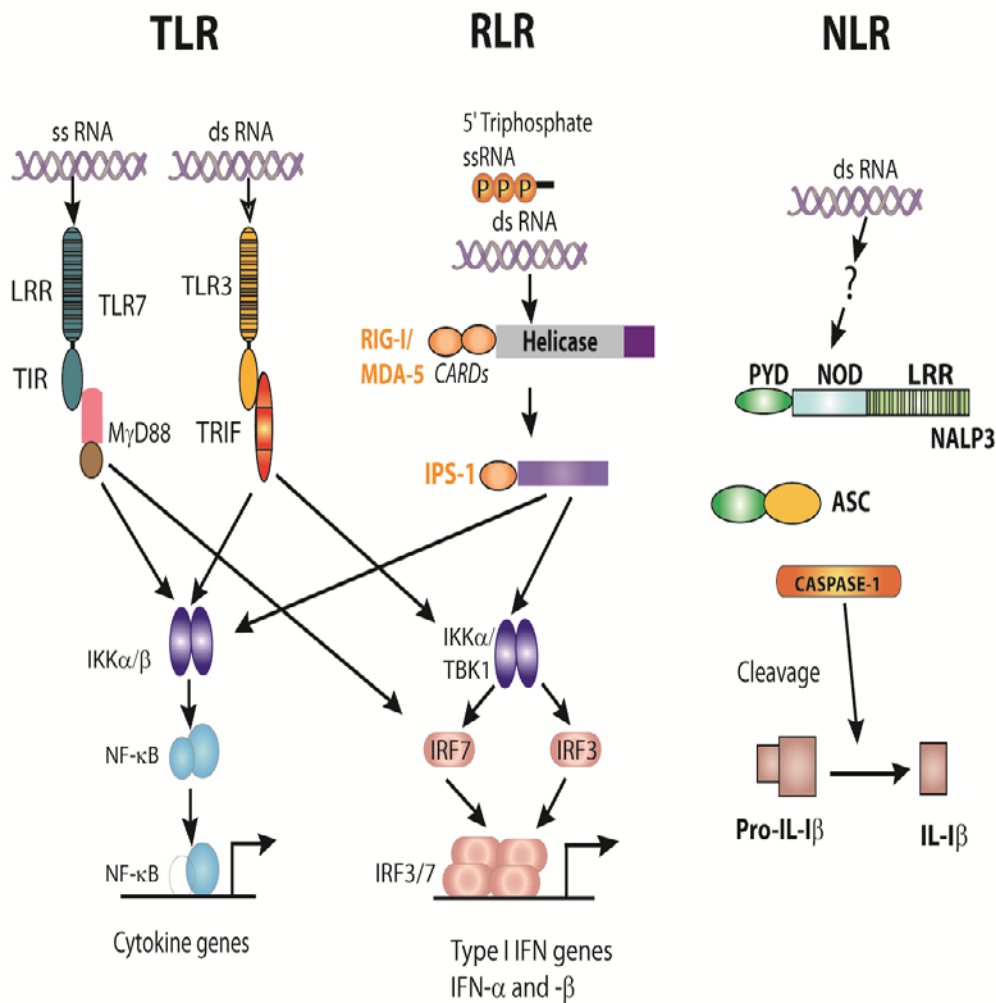
## **VI.2 Les molécules permettant d'engager la réponse immunitaire innée**

### VI.2.1 La réponse immune innée

L'immunité innée intervient dans les minutes suivant l'infection virale et repose essentiellement sur la production des interférons (IFN) de type 1 (Isaacs and Lindenmann 1957). Ces IFNs sont produits par les cellules infectées et entraînent la synthèse de protéines antivirales. Les pathogènes expriment divers antigènes ou motifs moléculaires (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), essentiels pour leur survie. Ces PAMPs sont reconnus par les récepteurs des cellules immunitaires dénommés pattern-recognition receptors (PPRs) (Janeway and Medzhitov 2002; Akira, Uematsu et al. 2006 ). Plusieurs familles de PPRs (agissant comme des senseurs) sont actuellement identifiées dans la reconnaissance des virus (**Figure 7**): les Toll-like récepteurs (TLRs) et les RIG-I-like récepteurs (RLRs). Des travaux récents décrivent une autre famille de PPRs, les NOD-like récepteurs (NLRs) qui sont connus pour leur rôle dans la reconnaissance de structures bactériennes et qui seraient aussi impliqués dans la reconnaissance cytoplasmique de certains virus (Allen, Scull et al. 2009).

Le schéma proposé actuellement pour la reconnaissance des alphavirus indique que la réponse immune innée serait engagée via les voies TLR3/TRIF (via l'ARN double brin (db) issu de la réplication) et/ou TLR7/TLR8 (via l'ARN simple brin (sb) viral) impliquant l'adaptateur MyD88 (Myeloid differentiation factor 88) ou encore via la voie des RLR (RIG et/ou MDA5 (Melanoma differentiation associated antigen 5) impliquant la protéine mitochondriale IPS-1 (IFN- $\beta$  promoter stimulator-1) (Unterholzner and Bowie 2008).

**Figure 7.** Les trois familles de récepteurs (TLR, RLR et NLR) de l'immunité innée impliquées dans la reconnaissance et la réponse contre les virus.



Chaque récepteur 'senseur' active des facteurs de transcription tels que NFkB (nuclear factor kB), ou des IRFs (IFN regulating factor) par le biais des voies de signalisation différentes (**Figure 7**). Les IFN de type 1 ainsi produits, activent par la suite la voie de signalisation intracellulaire via le récepteur IFNAR. La modulation de l'expression de gènes induits par l'IFN, conduit à la production de protéines antivirales, dont la protéine kinase R (PKR), la 2'5'-oligoadenylate synthétase (OAS) ou les ISGs (IFN-stimulated genes). Ces protéines vont permettre l'élimination du virus, en déclenchant une apoptose des cellules infectées et en conférant une résistance à l'infection virale des cellules non-infectées (voir ci-dessous). Les IFNs de type 1 ne sont pas produits uniquement par les cellules professionnelles de l'immunité innée, telles que les DCs et les macrophages, mais aussi par les cellules non-professionnelles, telles que les fibroblastes.

Les données récentes publiées par Schilte *et al* en 2010 soulignent que la réponse innée engagée par les fibroblastes au travers d'une production d'IFN- $\alpha$  et  $\beta$  et d'ISG contribue à limiter l'infection par le virus CHIK dans le modèle des souris C57BL6 (Schilte, Couderc et al. 2010). Cette réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense contre les alphavirus, mais contribue également à l'installation de l'immunité spécifique secondaire par les lymphocytes B et T (Takeuchi and Akira 2009). Néanmoins, il faut noter que l'infection par RRV de souris RAG-1<sup>-/-</sup>, qui n'ont pas de lymphocytes T et B, est identique à celle des souris sauvages, suggérant ainsi que la réponse immunitaire acquise ne jouerait pas un rôle important dans le contrôle de l'infection (Morrison, Whitmore et al. 2006). Des données encore non-publiées indiquent que ce serait également le cas pour le virus CHIKV (point discuté par O. Schwartz *et al.* (Schwartz and Albert 2010)).



## VI.2.2 Les TLRs impliqués dans la lutte antivirale

### VI.2.2.1 Structure et localisation des TLRs

Les récepteurs de type Toll sont nommés ainsi à cause de leur ressemblance avec le récepteur Toll de la drosophile qui fut découvert d'abord pour son rôle important dans le développement précoce de la mouche, puis pour sa contribution à l'immunité innée chez les mouches adultes. Aujourd'hui, 10 TLRs ont été identifiés chez l'homme, et 13 chez la souris (Janeway and Medzhitov 2002; Akira, Uematsu et al. 2006). Ce sont des glycoprotéines transmembranaires de type I ayant une structure trimodulaire et elles sont localisées à la surface cellulaire ou au niveau endosomal. Le domaine extracellulaire N-terminal comprend 16 à 28 régions riches en leucine (LRRs) et chaque LRR comprend 20 à 30 acides aminés avec un motif très conservé. Le domaine C-terminal intracellulaire porte une région conservée TIR (Toll interleukin-1 receptor) qui présente des homologies avec le récepteur de l'IL-1 (Janeway and Medzhitov 2002; Akira, Uematsu et al. 2006; Beutler 2009).

### VI.2.2.2 PAMPs des alphavirus reconnus par les TLR

Les virus à ARN sb (simple brin) produisent des ARN db durant leur réplication. Ces ARN db sont reconnus par les TLR3 localisés dans les endosomes. De même, l'analogue synthétique de l'ARN db, le Poly (IC), est un immunostimulant utilisé comme adjuvant de vaccin et qui est reconnu par TLR3. Les ARN sb sont reconnus par les TLR7/8 des endosomes, ainsi que les molécules imidazoquinoline-like, analogues de la guanosine, comme la loxoribine.

### VI.2.2.3 Activation des TLRs

Les TLRs des mammifères utilisent deux voies de signalisation importantes qui sont contrôlées par deux adaptateurs moléculaires différents, MyD88 (Myeloid Differentiation factor 88) et TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon  $\beta$ ) qui contiennent des domaines TIR (**Figure 7**). Après liaison du ligand à l'ectodomaine riche en leucine (LRR) du TLR, les TLRs se

dimérisent, permettant le recrutement des protéines adaptatrices. Pour TLR7 et TLR8, la protéine adaptatrice est MyD88. Pour TLR3, il s'agit exclusivement de TRIF (O'Neill and Bowie 2007). L'activation induite par la fixation des protéines adaptatrices entraîne une cascade de phosphorylation qui active le facteur nucléaire kappa B (NFkB), la protéine activatrice 1 (AP-1) et les facteurs de régulation de l'IFN (IRFs), aboutissant à une production de cytokines pro-inflammatoires (via NFkB) et d'IFN de type 1 (via les IRF3 et 7) (Bonjardim, Ferreira et al. 2009) (**Figure 7**). Le rôle de l'activation de la voie de signalisation des TLRs en réponse à l'ARN s'appuie sur les études de souris KO pour un TLR ou MyD88. Ces souris montrent une baisse de la protection face aux infections virales en raison d'une absence de réponses immunes innée et adaptative adaptées (Browne and Littman 2009).

NF-kB est un facteur de transcription qui appartient à la famille des protéines contenant un domaine Rel-homology. C'est un hétérodimère composé de 2 sous-unités p65 et p50 et présent dans la plupart des cellules. Dans les cellules non stimulées, NF-kB est séquestré dans le cytoplasme sous forme inactive en interaction avec l'inhibiteur de NF-kB (IkB).

Après stimulation, IkB est phosphorylé par le complexe IkK (IkB kinase) comprenant les protéines kinases IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  et la molécule régulatrice, IKKg/Nemo, ce qui permet la libération de NF-kB dans le noyau et sa liaison au site promoteur des gènes codant pour des cytokines (**Figure 7**).

Par ailleurs, IRF3 et IRF7 phosphorylés par TBK1 (TANK binding kinase 1, ou T2K ou NAK) et IkKi (inducible IkB kinase), sont transférés dans le noyau où elles stimulent la transcription des gènes d'IFN de type 1.

Les TLR 7 et TLR8 sont exprimées plus spécifiquement par les macrophages et les DCs. A la différence des autres DCs, les DC plasmacytoïdes (pDCs) expriment de façon constitutive de grandes quantités d'IRF7, en plus d'IRF3, et l'utilisent pour coupler les ligands à la production d'IFN $\alpha$  par l'intermédiaire de MyD88. Les pDCs n'ont pas besoin des ARN hélicases ni de

stimulation par l'IFN $\beta$  pour produire de grandes quantités d'IFN- $\alpha$ , en partie parce qu'elles peuvent retenir longtemps les acides nucléiques ingérés dans les endosomes. Chez la souris, l'infection à WNV active la voie de TLR7 (Town, Bai et al. 2009).

### VI.2.3 Les hélicases RLRs impliquées dans la lutte anti-virale

La stimulation des TLRs n'explique pas toutes les réponses anti-virales innées. En effet, une induction des molécules de costimulation CD80 et CD86 à la surface des DCs a été observée en réponse au Poly (IC) chez des double-mutants MyD88 KO et TRIF KO pour lesquels toute stimulation via les TLRs était abolie. De plus, la localisation des TLR 3, 7 et 8 au niveau des endosomes rend improbable la détection de certains intermédiaires de réplication virale, comme l'ARN db, localisé au niveau cytoplasmique. Ces données ont permis de suggérer l'existence de détecteurs ou senseurs intracellulaires d'ARN db dont l'activation, indépendante des TLRs, aboutit également à la production d'IFN de type 1 et de cytokines.

Par une approche fonctionnelle, via la recherche d'ADNc (ADN complémentaire) capables d'activer un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un promoteur inductible par les IFN de type 1, la protéine RIG-I (retinoic acid inducible gene) a été identifiée (Yoneyama, Kikuchi et al. 2004). RIG-1 appartient à la famille des RLR (retinoic acid-inducible like receptors), qui sont des PPRs cytoplasmiques d'acides nucléiques viraux, comme MDA-5 (melanoma differentiation-associated gene 5) et LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2) (**Figure 8**).

#### VI.2.3.1 Caractérisation de RIG-I et de MDA-5

RIG-I (connu aussi sous la terminologie DDX58) ainsi que MDA-5 (Helicard ou IFIH1) sont des senseurs viraux exprimés de façon ubiquitaire dans le cytoplasme (Barral, Sarkar et al. 2009). En 2004, l'activité antivirale de RIG-I a été démontrée en analysant l'expression d'une librairie

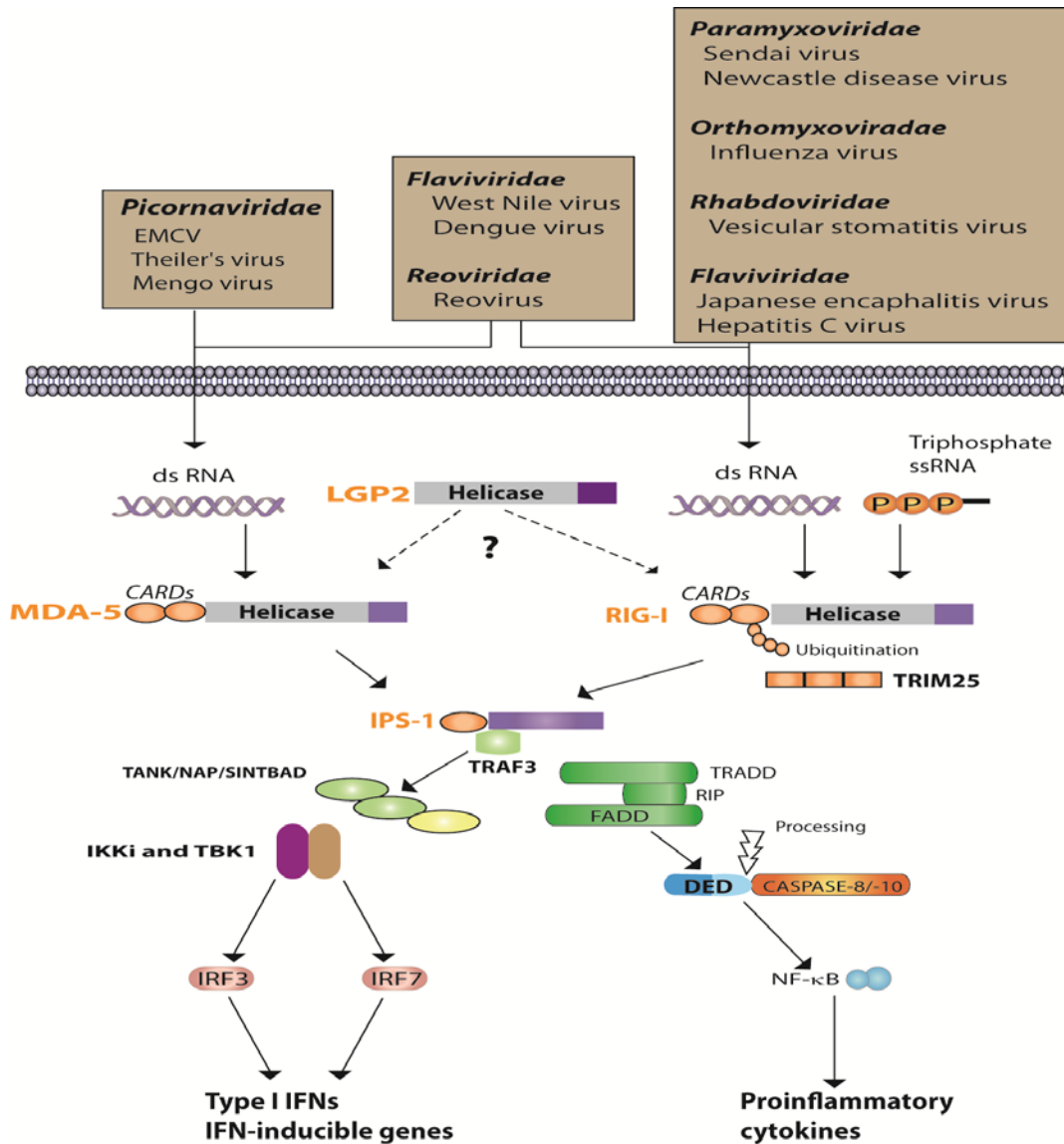
d'ADNc obtenue après traitement de cellules par l'IFN  $\beta$  (Yoneyama, Kikuchi et al. 2004). La surexpression de RIG-I permet aux cellules infectées par le VSV (virus de la stomatite vésiculeuse) de résister à des doses plus élevées de virus. Ces résultats ont été confirmés en utilisant des fibroblastes isolés de souris dans lesquelles le gène RIG-I était inactivé (Yoneyama, Kikuchi et al. 2004) : ces cellules deviennent plus susceptibles à une infection par le VSV et ne produisent pas d'IFN de type 1 après infection au virus Sendai (SeV).

La recherche, dans les banques de données, d'autres protéines possédant un domaine hélicase a permis d'identifier MDA-5. La surexpression de cette protéine en culture cellulaire, après activation croisée d'IRF-3 et de la voie NF- $\kappa$ B, protège les cellules d'une infection virale.

Un autre facteur à domaine hélicase, LGP2, présente une activité dominant-négative. RIG-I reconnaît de façon spécifique l'ARN db produit durant la réplication des virus à ARN ainsi que le Poly I :C (Yoneyama, Kikuchi et al. 2004). Néanmoins, l'interaction de RIG-I avec son ligand ARN n'est pas suffisante pour induire la production d'IFN. En effet, le changement d'acide aminé du site de liaison de l'ATP bloque l'induction d'IFN, mais pas la liaison à l'ARN db (Yoneyama, Kikuchi et al. 2004). MDA-5 reconnaît aussi le Poly (IC) mais avec moins d'affinité que RIG-I (Kang, Gopalkrishnan et al. 2002 ; Yoneyama, Kikuchi et al. 2005). RIG-I reconnaît les molécules d'ARN sb triphosphatées en 5', comme dans les infections à paramyxovirus et orthomyxovirus qui ne produisent pas d'ARN db durant leur réplication (Pichlmair and Reis e Sousa 2007 ; Plumet, Herschke et al. 2007) (**Figure 8**). L'ARN des picornavirus n'étant pas phosphaté, ces virus ne sont pas reconnus par RIG-I mais par MDA-5. Si on enlève l'extrémité 5'phosphatée, la liaison de l'ARN à RIG-I n'est pas affectée, mais la production d'IFN est supprimée. Les ARNs cellulaires n'ont pas d'extrémité triphosphatée en 5', elle est soit supprimée soit remplacée par une structure 5'cap. Cela explique que les ARNs du 'soi' ne peuvent pas activer RIG-I. RIG-I serait à priori impliqué dans la reconnaissance des flavivirus, influenzae et paramyxovirus (Kato, Takeuchi et al. 2006) alors que les picornavirus engagent la

voie MDA-5 (**Figure 8**). Il existe des virus tels que la dengue ou le WNV dont la production d'IFN de type 1 fait intervenir à la fois MDA-5 et RIG-I (Fredericksen, 2008) (Kato, 2006) (Loo, 2008).

**Figure 8.** Reconnaissance des virus par les RLRs et voies de signalisation



### *VI.2.3.2 Domaines fonctionnels :*

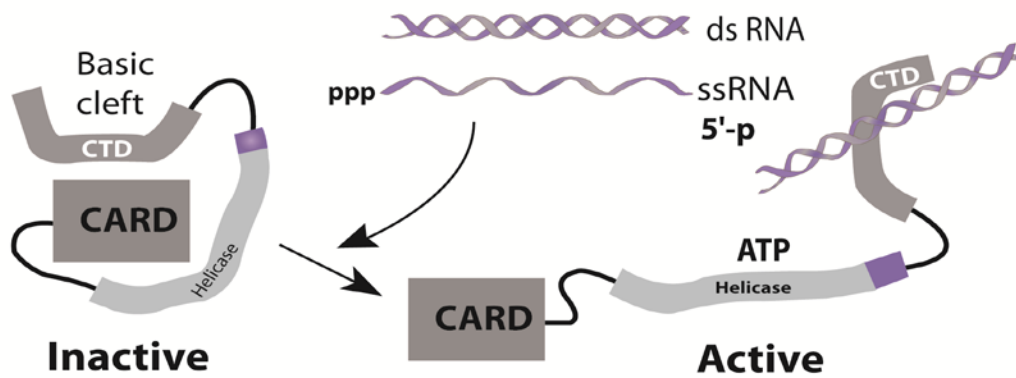
RIG-I et MDA-5 sont des hélicases, qui possèdent 2 domaines CARD (caspase activating recruitment domain) à leur extrémité N-terminale, un domaine central hélicase ATP-dépendant et un domaine terminal appelé RD (repressor domain) (**Figure 9**). LGP2 possède seulement le domaine hélicase, pas de domaine CARD (Takeuchi and Akira 2007 ; Yoneyama and Fujita 2008). RIG-I et MDA-5 partagent environ 25% d'homologie dans le domaine CARD et 40% dans le domaine hélicase.

CARD est le domaine effecteur qui traduit le signal lorsque la molécule est activée. La surexpression de CARD entraîne une activation constitutive indépendante de l'infection virale (Yoneyama, Kikuchi et al. 2004). Un domaine C-terminal (CTD) a été récemment décrit, qui chevauche le domaine RD. À partir d'études fonctionnelles et structurales, un modèle d'activation a été proposé pour RIG-I. En l'absence de son ligand, RIG-I est sous sa forme inactivée, repliée avec le domaine CARD caché par le CTD. La liaison avec l'ARN db ou l'ARN 5'ppp au CTD entraîne un changement conformationnel de RIG-I, qui en présence d'ATP va se retrouver exposé et pourra donc interagir avec la protéine adaptatrice IPS-1 et traduire le signal (Takahashi, Yoneyama et al. 2008).

### *VI.2.3.3 Modulation de la reconnaissance par RIG-I*

La signalisation engagée par RIG-I est contrôlée positivement et négativement par l'ubiquitination de RIG-I par TRIM 25 (tripartite motif 25), une ubiquitine E3 ligase. Cette ubiquitination est nécessaire pour une activation efficace de la voie de signalisation de RIG-I. En effet, les cellules TRIM25<sup>-/-</sup> montrent une production altérée d'IFN de type 1 en réponse à l'infection virale (Ozato, Shin et al. 2008).

**Figure 9.** Changement de conformation et activation du domaine de CARD (Caspase activation recruitment domain)



#### VI.2.4 Activation de la voie de signalisation IPS-1 et production de cytokines :

RIG-I et MDA-5 interagissent avec une protéine adaptatrice contenant un domaine CARD N-terminal en réponse à la liaison au ligand, IPS-1, aussi appelé virus-induced signaling adapter (VISA), ou CARD adapter inducing IFN- $\beta$  (CARDIF), ou mitochondrial antiviral signaling (MAVS) (Kawai, Takahashi et al. 2005). Les souris déficientes IPS-1 sont susceptibles à l'infection par divers virus à ARN (Kumar, Kawai et al. 2006). IPS-1 joue donc un rôle essentiel dans la signalisation de RIG-I et de MDA-5.

IPS-1 activé est présente dans la membrane externe mitochondriale. La protéine TNFR-associated death domain (TRADD) est recrutée, elle forme un complexe avec Fas-associated death domain-containing protein (FADD), et le domaine de mort d'une kinase, receptor-interacting protein 1 (RIP1), d'une part, et d'autre part avec TNF-receptor associated factor 3 (TRAF3), une ligase ubiquitine E3 (Yoneyama and Fujita 2009).

En aval de TRAF3, deux I $\kappa$ B kinases, TBK1 (TANK-binding kinase 1) et IKK-i (inducible I $\kappa$ B kinase), sont activées et vont phosphoryler IRF3 et IRF7 (Hemmi, Takeuchi et al. 2004). La phosphorylation d'IRF3/7 par ces kinases entraîne la formation d'homo et d'hétérodimères. Puis, ces homo et hétérodimères d'IRF3/7 subissent une translocation nucléaire et se lient aux ISREs (IFN-stimulated response elements), entraînant l'expression des gènes d'IFN de type 1, essentiellement IFN $\beta$  et des ISG (**Figure 8**). Les cellules déficientes en IRF3 et IRF7 ne produisent pas d'IFNs de type 1. La voie de signalisation des RLR active aussi NF- $\kappa$ B, pour l'expression des gènes proinflammatoires. Cette voie fait intervenir IPS-1, TRADD et FADD. FADD interagit aussi avec caspase 8/10, dont l'activité catalytique est essentielle pour la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B (**Figure 8**) (Takahashi, Kawai et al. 2006).

#### VI.2.5 Les récepteurs NLRs et infection virale

Les NLRs (nucleotide oligomerisation domain NOD-like receptors) comprennent trois molécules apparentées, NOD1, NOD2 et la cryopyrine (ou NALP3), jusqu'ici reconnues pour la détection du peptidoglycane des bactéries en activant les voies NF $\kappa$ B et MAPK (Chen, Shaw et al. 2009). NOD2 qui possède un domaine CARD, serait impliqué dans la réponse à l'ARN sb viral en activant IPS-1 et IRF3, entraînant ainsi une production d'IFN $\beta$  dans l'infection par le virus VRS chez la souris (Sabbah, Chang et al. 2009) (**Figure 7 et 8**)

#### VI.2.6 La diversité de la réponse cellulaire par une distribution différente des senseurs :

La distribution des senseurs viraux dans les types cellulaires et les tissus doit être un mécanisme pour différencier leurs actions. Les DCs conventionnelles (cDCs) sont spécialisées dans la détection de pathogènes et dans la présentation de l'antigène (McCartney and Colonna 2009). Les pDCs sont spécialisées dans la sécrétion d'IFNs de type I (Colonna, Trinchieri et al. 2004). Chez l'homme, les cDCs expriment TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, et TLR8, alors



que les pDCs expriment préférentiellement TLR7 et TLR9. Les cDCs sont capables d'exprimer de grandes quantités de RIG-I et de MDA-5, alors que les pDCs expriment aussi ces senseurs cytoplasmiques, mais, de façon paradoxale, les senseurs ne semblent pas fonctionnels (Coccia, Severa et al. 2004). Les pDCs, n'ayant pas de TLR3, utilisent TLR7 et TLR9 et le haut niveau d'expression d'IRF7 les prépare à une production d'IFN- $\alpha$  (Honda, Yanai et al. 2005).

Dans les tissus, les cellules du stroma expriment RIG-I et MDA-5 alors que l'expression des TLRs est plus limitée. Cette différence d'expression des senseurs viraux expliquerait que leur implication et leur importance soient très variable au cours des différentes infections virales (McCartney and Colonna 2009).

Peu de données existent permettant de définir le rôle des TLRs ou encore des RLRs lors d'une infection par les alphavirus. Les données très récentes publiées par Schilte *et al* en 2010 soulignent le rôle clef de la voie IPS-1 dans la réponse IFN- $\alpha$  et - $\beta$  des fibroblastes lors d'une infection par le CHIKV. Ces données sont encore préliminaires car elles n'ont pas permis de caractériser le ou les senseur(s) impliqué(s) dans cette réponse à savoir RIG et/ou MDA5. De plus, ces données contredisent celles obtenues par Burke *et al.* (voir tableau II) (Burke, Gardner et al. 2009). Le rôle d'une voie MyD88-dépendante dans la réponse systémique a également été proposé. Les expériences de transfert de cellules souches hématopoïétiques IFNAR  $+/+$  chez des souris irradiées IFNAR  $-/-$  n'ont pas permis de contrôler l'infection virale par le CHIKV, soulignant ainsi le rôle clef de la réponse IFN de type I au niveau des cellules du stroma (Schilte, Couderc et al. 2010).

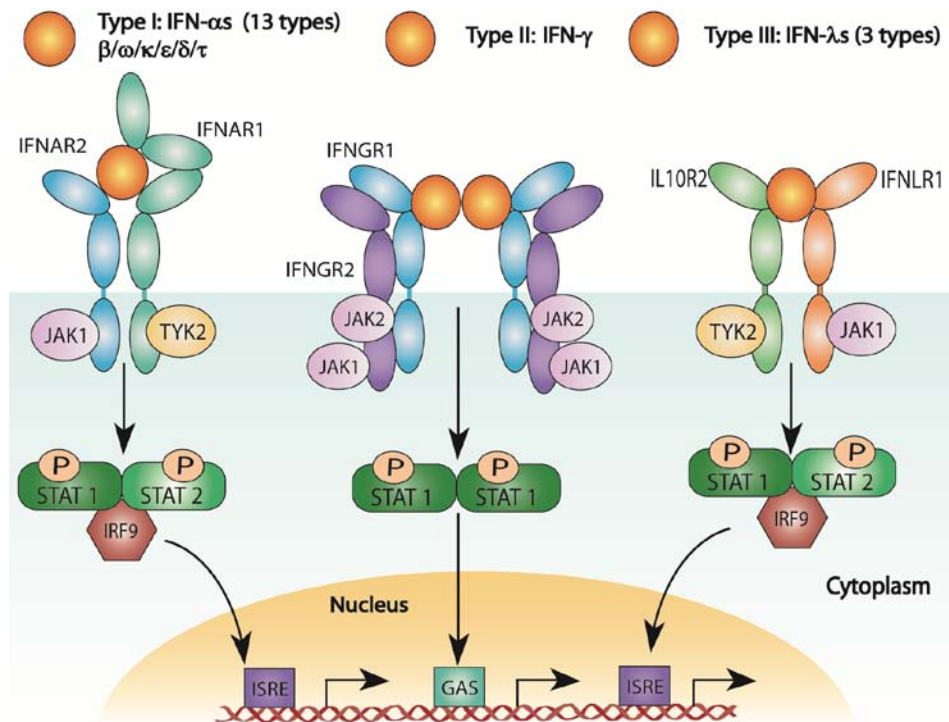
### VI.2.7 Les interférons (IFN) et leurs récepteurs

Découverts en 1957 par Isaac et Lindermann (Isaacs and Lindenmann 1957), les IFNs jouent un rôle fondamental dans les réponses de l'immunité innée et adaptative, comme l'a démontré

Fauconnier dès 1970 en injectant des anticorps anti-IFN- $\alpha$  (Fauconnier 1970). On distingue trois types d'IFNs. Les IFNs de type I, le plus grand groupe, comprenant les IFN- $\alpha$  et l'IFN- $\beta$ . Ils sont codés par un cluster de gènes situés sur le bras court du chromosome 9 chez l'homme, ne comprenant aucun intron, et sont tous génétiquement et structurellement très similaires (Pestka, Krause et al. 2004). Les IFNs de type I transmettent les signaux intracellulaires par le récepteur commun IFNAR1 (Novick, Cohen et al. 1994). Les IFNs de type II n'ont qu'un représentant, l'IFN- $\gamma$ , synthétisé par les lymphocytes T activés et les cellules NK. Bien qu'il exerce aussi une certaine activité antivirale, l'IFN- $\gamma$  est essentiellement considéré comme une cytokine immunomodulatrice puissante. Une nouvelle sous-famille a été récemment identifiée, les IFNs de type III ou IFN- $\lambda$ , comprenant 3 membres et connus en tant qu'IL-29, IL-28A et IL-28B (Sheppard, Kindsvogel et al. 2003). Le récepteur cellulaire spécifique est composé du récepteur  $\beta$  de l'IL-10 et de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-28. Les IFNs de type III partagent avec les autres types d'IFNs la capacité de contrôler la prolifération cellulaire et d'interférer avec la réplication virale (Onoguchi, Yoneyama et al. 2007). Les IFNs de type III seraient l'ancêtre du système antiviral des vertébrés (Levraud, Boudinot et al. 2007) (**Figure 10**). Les IFNs de type I constituent une vaste famille regroupant les IFN $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ,  $\epsilon/\tau$ ,  $\kappa$  et la limitine (Mamane, Heylbroeck et al. 1999). Les deux molécules les plus influentes sont les IFN- $\alpha$  (IFN de type I leucocytaire) et IFN- $\beta$  (IFN de type I fibroblastique). L'interaction entre les IFNs et les récepteurs IFNRs activent la voie Jak-STAT (Janus kinase-signal transducers and activators of transcription) ce qui entraîne une activation par les tyrosines kinases de la famille Jak qui phosphorylent les facteurs de transcription cytoplasmiques STAT1, STAT2, p48, ces derniers formant l'ISGF3 (IFN-stimulated genes factor 3) (**Figure 10**). Ces facteurs activés vont alors transloquer dans le noyau et se lier via IRF9 à des séquences nucléotidiques spécifiques (ISRE) dans les promoteurs de nombreux gènes de stimulation de l'IFN (ISGs). Parmi ces centaine de gènes, on distingue PKR (dsRNA-dépendant protein kinase), 2'-5'-oligoadenylatesynthétase, la

protéine Mx (myxovirus) guanosine triphosphate et les ISG15, 20, 54, 56 (Sadler and Williams 2008).

**Figure 10.** Les différents types d'interférons et leurs récepteurs couplés à des kinases.

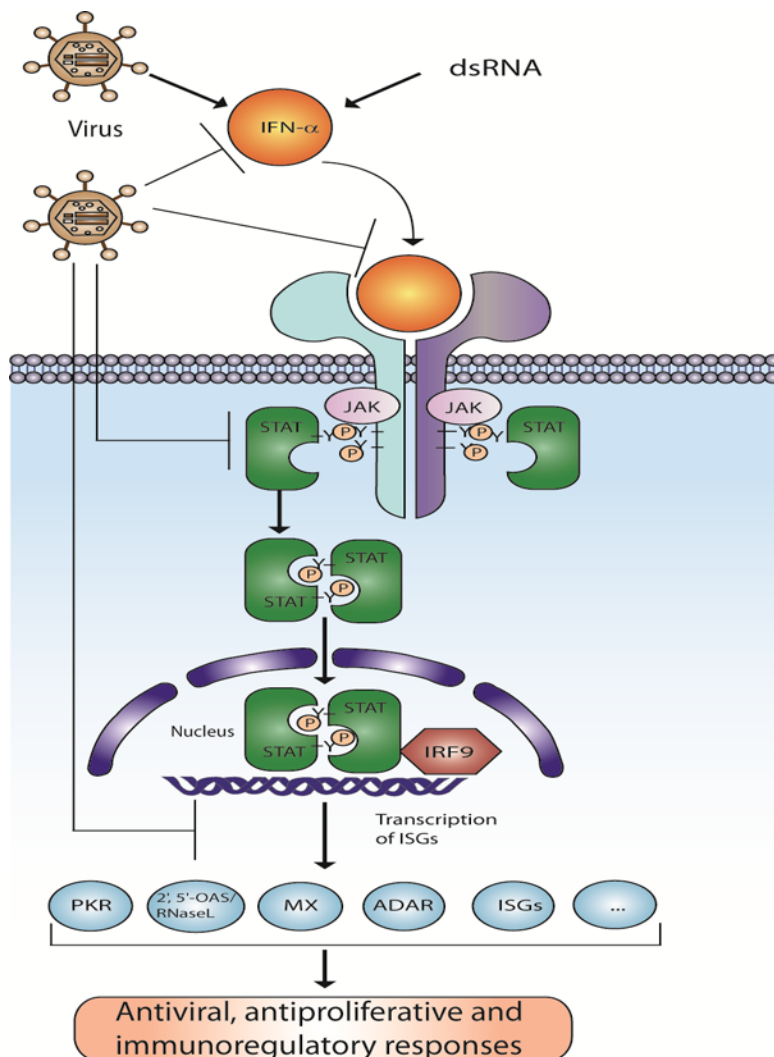


Bien que le rôle physiologique de la plupart des ISGs ne soit pas clairement identifié, les ISGs montrent collectivement une activité antivirale puissante dans les cellules. Certaines d'entre elles diminuent *in vitro* la virulence du SINV (viperine, ZAP), d'autres diminuent la réplication virale (ISG20, ZAP) (Zhang, Burke et al. 2007). Certains ISG comportant une séquence ISRE dans leur promoteur sont également inducibles par l'ARNdb viral formé à la suite de la réplication ou de la transcription du génome viral, et joueraient le rôle d'inducteur au cours de l'infection (Jacobs and Langland 1996).

## VI.2.8 Les protéines antivirales :

Les IFN  $\alpha$  et  $\beta$  produits par les cellules infectées ou par les cellules immunitaires agissent sur les cellules avoisinantes pour inhiber la réplication virale par de nombreux mécanismes visant tous les stades du cycle viral, depuis la pénétration, en passant par la transcription et la traduction, jusqu'à l'assemblage du virion. Trois de ces protéines et leurs mécanismes d'action sont bien décrits : PKR, OAS et les protéines Mx. Alors que les IFN de type 1 induisent les trois réponses, l'IFN  $\gamma$  n'induit que PKR.

**Figure 11.** La réponse interféron de type I permet d'induire de multiples protéines antivirales (PKR, Mx, OAS...). Cette réponse peut cependant être contrôlée à tous les niveaux par différentes protéine virales pour échapper ainsi au système immunitaire innée.



### *VI.2.8.1 PKR (dsRNA dependant protein kinase) :*

PKR est une protéine à activité sérine-thréonine kinase qui utilise un domaine amino-terminal dupliqué liant l'ARN pour distinguer les nombreux ARNdb viraux des ARNdb cellulaires tels que l'ARNt (ARN de transfert) (Meurs, Chong et al. 1990). PKR est exprimée à un niveau faible dans de nombreux types cellulaires où elle peut avoir d'autres fonctions dans la réponse au stress, mais ce n'est qu'après induction par le signal IFN que la concentration de PKR devient suffisante pour interférer avec la réplication virale. Elle est impliquée dans le contrôle de la transcription et de la traduction (Clemens and Elia 1997). Au contact d'ARNdb, la PKR est activée, s'autophosphoryle et se dimérise; sa cible principale est un composant crucial de la machinerie de traduction de l'ARNm en protéines, le facteur d'initiation de la traduction eIF2a qu'elle inhibe par phosphorylation. Il s'ensuit un blocage de la synthèse de toutes les protéines, cellulaires et virales, ce qui entraîne en plus de l'arrêt de la réplication, la mort de la cellule par apoptose (Gil and Esteban 2000). La propagation des virus est diminuée par la mort cellulaire par apoptose de la cellule infectée. Si les niveaux de PKR sont élevés dans les cellules qui répondent à l'IFN, PKR doit encore lier l'ARN db pour être active, ce qui garantit que seules les cellules infectées arrêtent la synthèse protéique. La protéine PKR est aussi capable d'activer le facteur de transcription NFkB par phosphorylation de l'inhibiteur Ikb (Lenardo, Fan et al. 1989). En réponse à l'infection alphavirale SFV, PKR renforce la réponse IFN de type 1 et contribue à éliminer le SFV du cerveau infecté chez la souris (Barry, Breakwell et al. 2009). Elle pourrait aussi participer à l'induction transcriptionnelle des gènes d'IFN en jouant le rôle de senseur d'ARN db intracellulaire. Il semble cependant que cette fonction ne soit pas aussi importante que celle de RIG-1 ou de MDA5.

### VI.2.8.2 2'5'-oligoadénylate synthétases (OAS)

De la même façon, le signal des récepteurs de l'IFN induit l'expression des enzymes 2'5'-oligoadénylate synthétases (OAS), qui ne synthétisent leur molécule de signalisation qu'après avoir rencontré l'ARN db. L'oligoadénylate synthétisée active alors une RNase cellulaire, la RNase L, qui dégrade les ARNm et les ARNt, ce qui bloque la synthèse des protéines dans la cellule (Kerr and Brown 1978; Jordanov, Paranjape et al. 2000). Comme PKR, ces enzymes ne sont activées que dans les cellules infectées par le virus. De même, la RNase L pourrait limiter la propagation des virus en favorisant l'apoptose des cellules infectées (Diaz-Guerra, Rivas et al. 1997). De manière intéressante, il a récemment été montré *in vitro* que CHIKV induit la production d'OAS qui agit sur la phase intracellulaire de la réplication virale (Brehin, Casademont et al. 2009).

### VI.2.8.3 Protéines Mx

La famille de protéines appelées Mx (MxA et MxB chez l'homme et Mx1 et Mx2 chez la souris) sont des GTPases apparentées à la dynamine (Haller and Kochs 2002), qui s'assemblent en structures multimériques. Leur fonctionnement exact n'est pas encore élucidé, mais certaines se trouvent dans le noyau et pourraient y bloquer la transcription, alors que d'autres dans le cytoplasme, auraient des effets sur la réplication virale, notamment dans la dégradation des nucléocapsides et donc dans l'assemblage des particules virales. La séquestration cytoplasmique par MxA de protéines virales a été mise en évidence pour le virus de la vallée du Rift (Diaz-Guerra, Rivas et al. 1997)

#### VI.2.8.4 Les autres protéines anti-virales

La protéine ADAR (dsRNA-dépendant adenosine deaminase) qui reconnaît l'ARN ds comme un substrat, le déroule et remplace toutes les adénosines en inosines ; ce mécanisme conduit à un effet antiviral par mutagenèse (Polson and Bass 1994 ; Zhou, Paranjape et al. 1999).

Parmi les ISGs, certains sont transcrits très tôt tels que les ISG54, ISG56 et RANTES (Paz, Sun et al. 2006). Au cours de l'infection cérébrale par LCMV (lymphocytic choriomeningitidis virus) ou WNV chez la souris, plusieurs ISGs (ISG49, ISG54 et ISG56) sécrétées plus particulièrement par les neurones sont augmentées en réponse à l'IFN (Wacher, Muller et al. 2007). ISG20 est une exonucléase 3'-5' capable de dégrader l'ARN ds et de retarder la réplication virale. ISG20 exerce une activité antivirale envers le VSV, EMCV (virus de l'encéphalomyocardite), les virus influenzae et le VIH (Nguyen, Espert et al. 2001; Espert, Degols et al. 2003 ). Elle apparaît être dotée d'une activité anti-alphavirale des plus puissantes (Ryman and Klimstra 2008). La protéine ISG15 (ubiquitin-like) a été identifiée comme ayant une activité antivirale contre SINV (Lenschow, Lai et al. 2007 ; Zhang, Burke et al. 2007). Le rôle antiviral de la plupart des ISGs contre l'infection CHIKV reste inconnu.

#### VI.2.9 Les chimiokines et les cytokines inflammatoires :

Les chimiokines sont des cytokines dont le rôle principal est l'activation cellulaire et la stimulation de la migration des leucocytes sur le site inflammatoire, processus dénommé écotaxie ou «homing» (Samson 1999). Elles sont impliquées dans la régulation de nombreux processus biologiques tels que l'apoptose, la prolifération, l'angiogénèse, l'hématopoïèse ou l'organogénèse (Burteau C 2007). Le recrutement des cellules immunitaires aux sites d'infection est réalisé par l'intermédiaire de récepteurs exprimés à la surface cellulaire et couplés aux

protéines G. Les cytokines pro-inflammatoires (ou «inductibles») sont produites au niveau du site de l'inflammation par des cellules du stroma ou des leucocytes infiltrés. L'IL-1 $\alpha$  ou  $\beta$ , le TNF $\alpha$  et les IFN $\alpha$ /  $\beta$  et  $\gamma$  sont les ~~écoules~~ <sup>facteurs</sup> responsables de l'induction de la plupart des chimiokines (Moser and Willimann 2004).

MCP-1 (CCL2) est produite dans la plupart des types cellulaires. MCP-1 augmente la synthèse d'intégrines par les cellules endothéliales, favorisant ainsi l'attachement des monocytes circulants aux cellules des parois vasculaires (Luster 1998) ; il est également chimiotactique pour les cellules NK et les lymphocytes T (Baggiolini, Dewald et al. 1997). L'IL-8 (CXCL8) augmente la perméabilité vasculaire et stimule la diapédèse des leucocytes activés (Luster 1998). Ces deux processus aboutissent à l'infiltration des leucocytes sur le site inflammatoire. RANTES (CCL5) est la chimiokine particulièrement active pour permettre le recrutement des lymphocytes T (LTs) CD8<sup>+</sup> (Baggiolini, Dewald et al. 1997). Les LTs mémoires migrent en réponse à RANTES et MCP-1 (Rollins 1997). Dans le cadre de la pathologie CHIKV, il est intéressant de noter que la plupart de ces cytokines et chimiokines sont produites au cours de la phase aiguë de la pathologie pour permettre la migration et l'activation des cellules immunes innées (Gardner, Anraku et al. 2010; Labadie, Larcher et al. 2010). MCP-1, l'interleukine 12 et l'IFN-gamma produits à des taux très élevés seraient particulièrement importants pour l'activation des monocytes/macrophages et des cellules NKs.

## **VI.3 Les cellules de l'immunité innée et infection par les alphavirus**

### VI.3.1 Les cellules dendritiques et les monocytes-macrophages

Les DCs immatures tissulaires et les macrophages représentent les cellules sentinelles ubiquitaires du système immunitaire, programmées pour détecter la présence de PAMPs à l'aide



des PPRs ou des récepteurs « éboueurs » ( scavenger receptor). La détection du pathogène déclenche la sécrétion de cytokines par les DCs qui se différencient, deviennent matures et migrent vers les tissus lymphoïdes périphériques. Il existe plusieurs types de DCs, les deux plus importantes sont les DCs myéloïdes (mDCs) qui sont les cellules présentatrices d'antigène (APCs) et les DCs plasmacytoïdes (pDCs). Les mDCs présentent les antigènes associés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) pour qu'ils soient reconnus par les lymphocytes T naïfs et activent leur différenciation en cellules effectrices. Les pDCs sont de loin les plus fortes productrices d'IFN $\alpha$  en réponse à l'infection virale. Ces cellules n'ont pas d'activité phagocytaire importante et n'internalisent pas les cellules apoptotiques, mais elles capturent les virions apparemment par macropinocytose ou par endocytose dépendante des récepteurs. Contrairement aux autres cellules dendritiques, ces cellules ne résident pas dans les tissus, mais circulent dans le sang où, au contact des virus, elles produisent de grandes quantités d'IFN $\alpha$ . (De Franco 2009).

L'IFN  $\alpha/\beta$  possède un effet antiviral direct sur les DCs, augmente l'internalisation et la présentation des antigènes, stimule le «switch» des cellules B, et régule la réponse T helper.

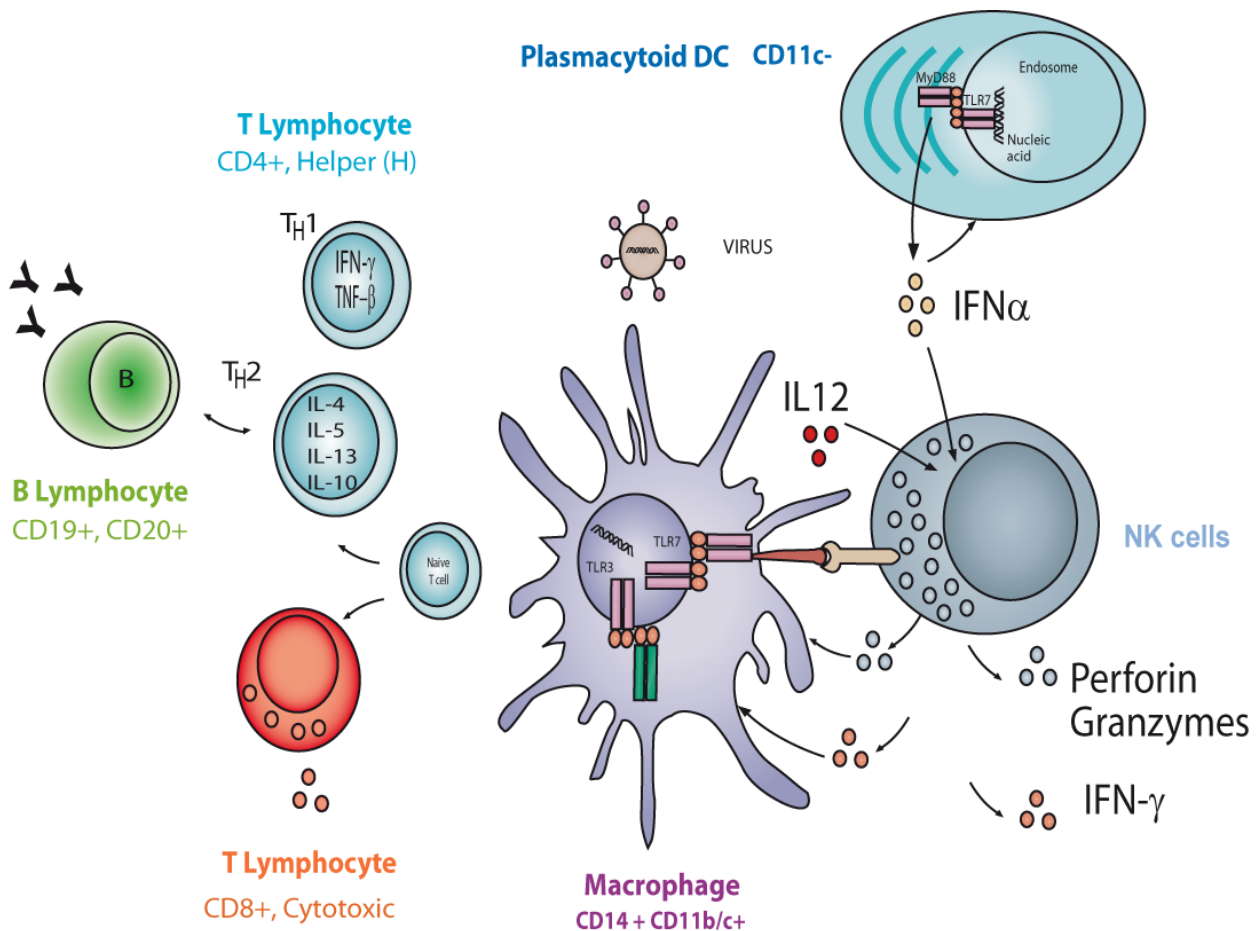
Une étude a permis de conclure que l'induction de l'IFN $\alpha/\beta$  par le SINV dans les cultures de DCs est indépendante de MYD88, mais dépend d'IRF3 (Hidmark, McInerney et al. 2005). Par ailleurs, l'induction d'IFN $\alpha/\beta$  qui n'est que peu altérée chez le macrophage MDA5  $-/-$  infecté par SINV, suggère que cette molécule n'est pas vitale pour la réponse immunitaire de ces cellules (Ryman and Klimstra 2008). En ce qui concerne le CHIKV, plusieurs études ont montré que les cellules DCs ne sont ni infectées ni stimulées par ce virus même à de fortes MOI (Sourisseau, Schilte et al. 2007; Labadie, Larcher et al. 2010; Schilte, Couderc et al. 2010). En revanche, les macrophages peuvent être infectés par le CHIKV, le taux de réplication reste beaucoup plus faible que celui obtenu avec des fibroblastes et ne concerne qu'une partie des cellules pour des raisons encore obscures (Sourisseau, Schilte et al. 2007 ; Gardner, Anraku et al. 2010; Labadie,

Larcher et al. 2010). L'activation des macrophages par le CHIKV n'a jamais été décrite mais il semble néanmoins que cette infection induit une apoptose des cellules par des mécanismes qui restent à être identifiés (Gardner, Anraku et al. 2010). D'autres alphavirus tels que RRV sont connus pour infecter les macrophages via le mécanisme de l'ADE (antibody-dependent enhancement) et qui conduit à la polarisation des cellules vers un profil anti-inflammatoire (IL-10) et avec une production latente de virus (Linn, Aaskov et al. 1996).

### VI.3.2 Les cellules NK

Les cellules NK répondent à l'infection dans les heures et les jours qui suivent et assurent une protection précoce contre les pathogènes intracellulaires, en particulier contre les virus (Trinchieri, Granato et al. 1981 ; Moretta, Bottino et al. 2002). Issues des mêmes cellules progénitrices que les lymphocytes T (LT), elles ont deux fonctions très importantes en commun avec les T CD8<sup>+</sup>: elles sont cytotoxiques et sécrètent de l'IFN $\gamma$ . Contrairement aux LTs, les cellules NK n'ont pas de récepteurs aux antigènes viraux, elles migrent directement dans le sang (sans passer par le thymus) où elles assurent une défense immunitaire innée, dite de cytotoxicité naturelle. L'activation de l'action cytotoxique des cellules NK dépend de l'équilibre entre signaux activateurs et inhibiteurs exprimés à leur surface. Les cellules NK tuent les cellules infectées par des virus qui ont réduit le nombre de CMH de classe I du 'soi' à leur surface (état de «missing-self») ou qui ont augmenté le nombre de cibles des récepteurs activateurs et antigènes codés par le virus (Moretta, Bottino et al. 2002; Andoniou, van Dommelen et al. 2005 ). Elles peuvent aussi être recrutées plus tard par les Ac de l'immunité acquise, pour tuer les cellules par le mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC). Les IFN de type 1 (IFN $\alpha/\beta$ ), l'IL-15 et l'IL-12 sont particulièrement importantes dans l'activation des NKs (**Figure 12**).

**Figure 12.** Cellules de l'immunité innée engagées dans la réponse antivirale (IFN- $\alpha$ , perforine, granzyme) avec la production de cytokines permettant d'initier la réponse immune acquise (CD4/CD8 et la production d'anticorps neutralisants)



D'autres cytokines au niveau du foyer infectieux (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, TNF  $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) amplifient la réponse des cellules NK. La sécrétion d'IFN $\gamma$  active également les macrophages et facilite la différenciation des LTs en cellules TH1. La sécrétion d'IFN $\gamma$  est régulée de façon négative par le TGF- $\beta$  (transforming growth factor) en réponse à l'inflammation.

Le rôle effectif des cellules NK reste à être démontré au cours des infections à alphavirus. Ces cellules semblent à la fois être impliquées dans la réponse antivirale en phase aiguë, mais elles

pourraient également contribuer à des mécanismes immuno-pathologiques (cytotoxicité) comme cela a été décrit dans l'infection par SINV chez la souris (Hirsch 1981; Aaskov, Dalglisch et al. 1987; Alsharifi, Lobigs et al. 2006).

### VI.3.3 Le fibroblaste

Le fibroblaste (CD90/Thy-1 +, vimentine +) des tissus conjonctifs est la cellule cible du CHIKV dans laquelle il se multiplie (Sourisseau, Schilte et al. 2007). Les derniers travaux de Schilte *et al* confirme le rôle de cette cellule en tant que cellule immunitaire «non professionnelle» dans la lutte contre l'infection. En effet, CHIKV ne stimule pas directement la production d'IFN de type 1 par les cellules immunes hématopoiétiques. Ce sont les fibroblastes infectés qui sont à l'origine de la production de l'IFN, en particulier de l'IFN $\beta$  et qui contrôlent donc la réponse immune (Schilte, Couderc et al.). Chez les souris sauvages, la production locale d'IFN empêche la dissémination du virus. Des taux élevés d'IFN $\alpha/\beta$  ont été également associés *in vitro* à une réplication de SINV et de VEEV (Ryman, Klimstra et al. 2000; Charles, Trgovcich et al. 2001 ). Le rôle des voies de détection RIG-1, MDA5 et PKR reste à être clarifié mais il est fort probable que plusieurs 'senseurs' sont impliqués comme cela a été décrit pour d'autres virus (Fredericksen, Keller et al. 2008). L'implication d'autres senseurs, tels que les NLRs ne serait pas exclue (Schilte, Couderc et al.). Pour CHIKV, si la signalisation via IPS-1 (voie des RLRs) joue un rôle important dans la réponse immune, la détection par MyD88 (voie des TLRs) serait nécessaire pour prévenir la dissémination virale (Schilte, Couderc et al.).

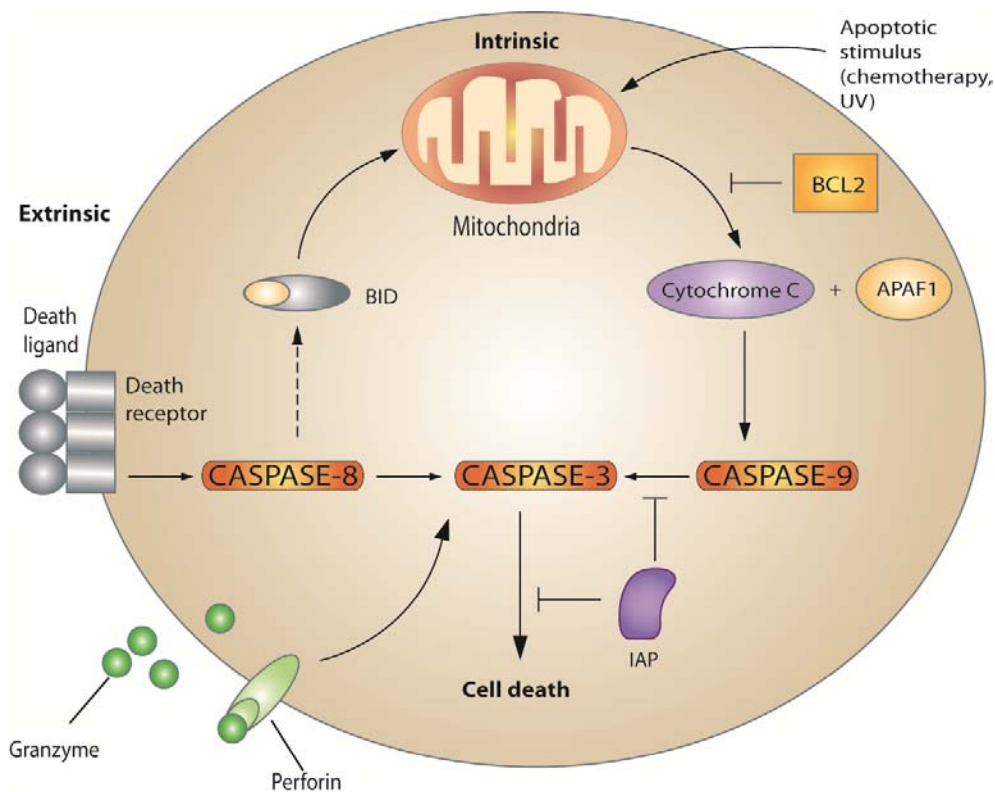
## VI.4 L'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée, fait partie de la réponse innée contre les virus (Clouston and Kerr 1985; Everett and McFadden 1999 ). Lors de l'infection virale, il est

essentiel que le système immunitaire élimine par apoptose les cellules infectées par le virus, qui représentent alors sa machine de synthèse et son réservoir dans l'organisme (Griffin and Hardwick 1997). Hormis l'intrusion du virus, plusieurs signaux peuvent déclencher l'apoptose tels que les signaux de mort, l'absence de facteurs de croissance ou les lésions cellulaires. Ce mécanisme d'auto-élimination est une conséquence de l'activation des gènes de mort qui aboutit à la condensation de la chromatine et la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques qui seront éliminés par phagocytose sans causer d'inflammation (Savill, Dransfield et al. 2002).

L'apoptose est déclenchée par deux voies distinctes : la voie intrinsèque de la mitochondrie et la voie extrinsèque d'activation par les récepteurs de mort (Gougeon 2003). La voie intrinsèque est déclenchée par des lésions cellulaires induisant les protéines de surveillance de la cellule (p53) qui activent les protéines Bax et Bak permettant le relargage du cytochrome c de la mitochondrie (de l'espace inter-membranaire dans le cytoplasme); ce dernier se combine avec Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) et la caspase 9 (apoptosome) pour activer la caspase 3, protéine effectrice de l'apoptose (**Figure 13**). La voie extrinsèque est induite par l'interaction entre les récepteurs de mort (Fas, TNF-R1 'TNF-receptor-1') et leurs ligands synthétisés par les cellules immunes. Dans le cas de Fas, en présence de son ligand FasL (Fas ligand), Fas s'agglomère en trimère et recrute, par son domaine cytoplasmique DD (Death Domain), l'adaptateur FADD (Fas-associated death domain containing protein) par une interaction DD-DD. Ceci aboutit à la formation du DISC (Death-inducing signaling complex) qui mène au clivage de la caspase 8 initiatrice. Cette dernière permet l'activation de la caspase 3 soit directement soit par la voie mitochondriale par l'intermédiaire de tBid (t-Bcl2-interacting domain death agonist) (**Figure 13**).

**Figure 13.** Les différentes voies de l'apoptose (extrinsèque et intrinsèque)



Parmi les caspases impliquées dans l'apoptose, on distingue les caspases initiatrices (2, 8, 9 et 10) responsables du déclenchement des cascades d'activation et les caspases effectrices (3, 6 et 7) qui dégradent les protéines nucléaires telles que PARP (Poly-(ADP-ribose) polymerase) ou encore la lamin-A (Nagata 2000 ; Danial and Korsmeyer 2004).

L'apoptose est décrite dans l'infection par SFV (Glasgow, McGee et al. 1998), en particulier dans les oligodendrocytes chez la souris infectée par voie intracrânienne chez qui il a été observé un effet bystander avec l'apparition d'apoptose dans les cellules adjacentes apparemment non infectées (Fazakerley, Cotterill et al. 2006). Ce phénomène d'apoptose serait dû au stress du réticulum endoplasmique provoqué par SFV (Barry, Breakwell et al.). CHIKV pourrait également induire une apoptose comme par exemple dans le modèle HeLa (voir tableau IV), mais par des mécanismes cellulaires qui restent à être identifiés (Sourisseau, Schilte et al. 2007).

## **VI.5 La réponse immune acquise après une infection par les alphavirus**

### VI.5.1 Les cellules T cytotoxiques (LTc, CD8+) :

L'activation des LTs CD8+ en réponse à une infection virale entraîne une expansion massive des cellules spécifiques d'antigènes, qui peut concerner une cellule T CD8 sur trois ou quatre quand la réponse virale est à son maximum. Cette expansion s'accompagne d'une différenciation en cellules T CD8 effectrices cytotoxiques qui sécrètent des cytokines (IFN $\gamma$  et TNF  $-\alpha$ ). Les deux principaux mécanismes par lesquels les LTs CD8+ détruisent leurs cibles impliquent l'apoptose. Le plus important et le plus rapide agit en libérant la perforine et les granzymes contenus dans des granules cytoplasmiques. L'autre mécanisme fait intervenir le ligand de récepteur de mort, FasL, qui est induit au contact de la cellule infectée. Une petite proportion des cellules CD8 persistent sous la forme de cellules mémoires.

Les LTcs sont connus pour jouer un rôle clef dans l'élimination des cellules infectées par des alphavirus (Linn, Mateo et al. 1998) mais cette même fonction, si elle n'est pas contrôlée, peut conduire à des lésions tissulaires comme cela a été démontré dans le modèle SFV de neuroinfection (Subak-Sharpe, Dyson et al. 1993). Néanmoins, les expériences réalisées chez les souris RAG KO semblent indiquer que l'absence d'immunité acquise T/B dépendante et donc des LTcs peut être compensée par d'autres mécanismes faisant intervenir la réponse immune innée.

### VI.5.2 Les cellules T Helper ou auxiliaires (LTh, CD4+) :

Les LTh CD4+ restreints au CMH de classe II reconnaissent l'antigène à la surface de la cellule dendritique. Les cellules T auxiliaires activent les autres cellules du système immunitaire, y compris les LB en libérant des cytokines (IFN- $\gamma$ ). Des sous-populations distinctes de cellules CD4 libèrent des différentes cytokines pour engager des réponses en fonction du pathogène. Les deux sous-populations les mieux connues sont les cellules Th1, qui recrutent et activent les cellules phagocytaires dans les tissus, et les cellules Th2, qui recrutent les éosinophiles, les basophiles, les mastocytes et les macrophages pour la protection des barrières épithéliales. Au cours de l'infection CHIK, c'est essentiellement une réponse Th1 qui semble être engagée (Gardner, Anraku et al. 2010).

### VI.5.3 Les cellules B et la réponse anticorps (Ac) :

Les Ac sont importants pour prévenir une réinfection par le virus. Les modes d'action des Ac pour contrôler l'infection virale comprennent la neutralisation des particules virales et la cytolysse des cellules infectées recouvertes d'Ac par les cellules NK. L'élimination des cellules infectées peut aussi se faire par l'activation du complément au complexe Ag-Ac par la voie classique. Les cellules B effectrices du système immunitaire acquis ne sont en moyenne efficaces qu'après cinq jours, délai nécessaire à l'apprêtement de l'antigène, à la maturation et à la migration des cellules dendritiques, puis à l'expansion clonale et la migration des cellules T vers les sites infectieux. L'immunité précoce est assurée par les anticorps neutralisants. Les anticorps neutralisants sont en général dirigés contre des protéines de surface du virion.



Les IgM anti-CHIK sont détectés à partir du 5-7<sup>e</sup> jour de l'infection et leur détection est utilisée pour le diagnostic de l'infection, après la première semaine, lorsque la RT-PCR devient négative. Les IgG apparaissent vers le 8-10<sup>e</sup> jour, garantissent une immunité durable et préviennent toute ré-infection et/ou multiplication chez les sujets ré-infestés. La capacité des Ac anti-CHIKV à neutraliser le virus a été démontré par Ross (Ross 1956) et plus récemment par Couderc *et al.* (Couderc, Khandoudi et al. 2009). Les Ac neutralisants se lient aux particules virales libres et peuvent : 1) bloquer l'entrée du virus en empêchant la fixation du virus sur son récepteur, 2) agglutiner les virions, et 3) favoriser la phagocytose par les macrophages et les neutrophiles.

## **VI.6 Stratégies d'évasion des alphavirus**

En réponse à la réaction immunitaire de l'hôte, le virus développe des mécanismes élaborés afin d'éviter, de contrecarrer et de détourner les mécanismes de détection, les voies d'activation ainsi que les différentes fonctions effectrices. Cet équilibre peut tourner à l'avantage du pathogène et contribuer à l'infection chronique et à la persistance virale. Pour ce faire, le virus doit répondre à deux conditions : sa capacité à co-exister dans la cellule hôte de façon non lytique et être capable de développer des stratégies d'évasion qui lui permettent de ne pas être reconnu par le système immunitaire de l'hôte. Le virus ne doit pas exposer ses antigènes pour échapper à sa reconnaissance par les cellules de l'hôte, et/ou se déguiser afin d'être reconnu comme faisant partie de soi (Oldstone 1998). A tous les niveaux de la réaction immunitaire développée par l'hôte, le virus a développé des stratégies afin de la contrecarrer.

### VI.6.1 Interférence dans les mécanismes de détection :

Des protéines virales peuvent interférer au niveau de la reconnaissance du PAMP par le senseur cellulaire PPR. Ainsi, la protéase NS3-4A du virus de l'hépatite C (VHC) clive IPS-1, ce qui cause sa délocalisation de la membrane mitochondriale et empêche la signalisation de RIG-1 (Sklan, Charuorn et al. 2009). Par ailleurs, cette protéase inactiverait aussi l'adaptateur TRIF. Un autre exemple est l'inhibition de la PKR par le virus influenzae. Ce virus est capable d'empêcher la dissociation entre la PKR et son inhibiteur cellulaire (la protéine p58IPK) empêchant ainsi l'activation par l'ARN db (Melville, Hansen et al. 1997). Le VHC code également pour une protéine qui se lie directement à la PKR et inhibe ainsi sa fonction (Francois, Duverlie et al. 2000).

### VI.6.2 Inhibition de la production et de la voie de signalisation de l'IFN

L'infection *in vitro* de lignées de fibroblastes murins par SINV montre la suppression de la réponse IFN par NsP2, probablement par l'arrêt de la synthèse cellulaire (Frolova, Fayzulín et al. 2002). Pour le EEEV, c'est la capsid qui inhibe l'expression de gènes d'IFN de la cellule (Aguilar, Weaver et al. 2007). Par ailleurs, le virus de la dengue bloque la réponse IFN $\alpha$  en diminuant l'expression de STAT-2 (Jones, Davidson et al. 2005). Le VEEV bloque la phosphorylation de la tyrosine ainsi que la translocation nucléaire du facteur de transcription STAT-1 en réponse aux IFNs de type 1 et 2 (Simmons, White et al. 2009). Des données récentes publiées par Fros *et al.* montrent que la protéine nsP2 du CHIKV serait également capable de bloquer la phosphorylation et la translocation nucléaire de STAT-1 (Fros, Liu et al. 2010).

### VI.6.3 Modulation de l'apoptose

L'apoptose qui surviendrait avant que la réplication virale ne soit achevée serait désastreuse pour le virus; par conséquent, des virus ont développé des moyens de déjouer ce mécanisme antiviral (Griffin and Hardwick 1997; Teodoro and Branton 1997; Galluzzi, Brenner et al. 2008). Certains virus expriment des protéines qui bloquent l'apoptose, telle que la protéine E2 du SINV (Everett and McFadden 1999). Pour inhiber la voie intrinsèque, des virus élaborent diverses protéines, les v-Bcl-2, qui sont capables d'inhiber l'oligomérisation de bax et de bak. D'autres virus activent la transcription de Bcl-2 ou réprime celle de bax (Sarid, Sato et al. 1997). Certains virus peuvent inhiber les récepteurs de mort en synthétisant des virokines, ou encore bloquer l'interaction entre les protéines adaptatrices et la procaspase 8 en synthétisant des v-FLIPs, comme cela a été décrit pour SINV (Sarid, Ben-Moshe et al. 2001).

Il est intéressant de noter que si les alphavirus causent une infection lytique apoptotique dans la plupart des cellules de mammifères, ils sont à l'origine d'une infection persistante sans apoptose avec peu d'effets cytopathiques dans les cellules de moustiques qui continuent à sécréter du virus (Wang, Volkova et al. 2008).

## VII. Immunopathologie des atteintes articulaires à alphavirus

Le CHIKV, tout comme d'autres alphavirus de l'Ancien Monde, tels que le virus Ockelbo scandinave du groupe SINV, ONNV, MAYV et les virus australiens Barmah Forest et RRV, est reconnu être à l'origine d'épidémies d'arthralgies aiguës et chroniques pouvant évoluer vers des arthrites (Tesh and Gubler 1975; Flexman, Smith et al. 1998; Harley, Sleight et al. 2001; Jacups, Whelan et al. 2008; Toivanen 2008). Il est généralement considéré que les arthrites post-CHIKV

ont beaucoup de similitude avec celles du RRV et impliqueraient des mécanismes pathologiques identiques.

## **VII.1 Atteintes articulaires après une infection alphavirale**

Le RRV transmis par les moustiques du genre *Aedes* est endémique de l'Australie et de la Nouvelle Guinée et est à l'origine de la polyarthrite épidémique, avec 4 000 à 5 000 cas par an en Australie. La symptomatologie de la primo-infection est comparable à celle du CHIKV. 50% des patients guérissent dans les 6 premiers mois, 95% des patients sont guéris dans les 4 années post-infection. Mais, dans quelques cas, les symptômes persistent au-delà de 3 ans (Fraser 1986 ; Rulli, Melton et al. 2007). Les enfants présentent des formes plus bénignes, probablement en raison d'une production moindre de cytokines arthritogéniques (TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ) sur la base des observations faites chez la souris jeune (Ordemann, Hutchinson et al. 2002). Ils sont par conséquent moins susceptibles aux phénomènes immunopathologiques et autoimmuns tels que la polyarthrite rhumatoïde liés à ces cytokines.

### VII.1.1 Le modèle souris de l'arthrite/arthralgie à RRV :

Les premières études chez la souris nouveau-né ont mis en évidence une réplication du virus dans de nombreux tissus, en particulier le muscle squelettique, le périoste et la graisse brune (Mims, Murphy et al. 1973; Murphy, Taylor et al. 1973). L'utilisation de souris plus âgées (14 à 21 jours) a permis d'étudier l'atteinte articulaire. Ce modèle souris présente beaucoup de caractéristiques communes avec les arthrites/arthralgies induites par les alphavirus chez l'homme, avec une incapacité des membres arrières, une faiblesse musculaire, une amyotrophie voire la perte fonctionnelle complète du membre (Lidbury, Simeonovic et al. 2000 ; Morrison,

Whitmore et al. 2006). Des infiltrats mononuclées (cellules NK et macrophages) ont été observés dans le muscle squelettique strié (Morrison, Whitmore et al. 2006). Une augmentation du nombre des lymphocytes T CD4+ et CD8+ était aussi observée. Le virus était détectable dans les tissus de l'articulation dont les ligaments, le périostum ainsi que le muscle squelettique. Les cellules infectées par le RRV étaient également retrouvées dans la cavité synoviale. L'amélioration fonctionnelle était corrélée avec la résolution de l'inflammation, et notamment après l'administration d'agents toxiques pour les macrophages (Lidbury, Simeonovic et al. 2000). Ce modèle a ainsi permis d'identifier le rôle important du macrophage dans l'inflammation et les lésions tissulaires induites par RRV.

#### VII.1.2 La pathologie arthrite/arthralgie à RRV chez l'homme :

Au cours de l'arthrite épidémique à RRV, une réaction de type mononuclée, avec des monocytes, des macrophages vacuolés, des cellules B et T, et quelques cellules NK est détectée dans le liquide synovial des articulations de patients infectés (Clarris, Doherty et al. 1975; Fraser, Cunningham et al. 1981). Les rares cellules CD8+ seraient responsables de l'élimination des cellules infectées par cytolysse et aussi par production de facteurs antiviraux (Hazelton, Hughes et al. 1985). On ne retrouve pas de polynucléaires ni de complexes immuns ce qui différencie cette arthrite post-infectieuse de la polyarthrite rhumatoïde. Du matériel viral a été détecté dans les monocytes et les macrophages, sans que l'on ait pu néanmoins isoler le virus en culture cellulaire (Fraser, Cunningham et al. 1981). Cependant, Soden *et al* ont montré la présence d'ARN de RRV dans le tissu synovial de patients atteints de polyarthrite épidémique un mois après l'épisode aigu, mettant en évidence la persistance de l'infection virale (Soden, Vasudevan et al. 2000). HLA-DR B27 serait un facteur favorisant la chronicité (Colin de Verdiere and Molina 2007).

## VII.2 Rôle des macrophages dans l'inflammation chronique post-infectieuse

En utilisant le modèle souris, plusieurs travaux font état du rôle des macrophages dans les lésions tissulaires (Rulli, Melton et al. 2007; Gardner, Anraku et al. 2010). Les signes cliniques d'infection semblent être corrélés à l'afflux massif des macrophages dans le muscle et les articulations. L'infection des macrophages *in vitro* par SINV entraîne une réponse pro-inflammatoire (TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  et IL-6) responsable d'une expression de métalloprotéinases telles que MMP1 et MMP3 (matrix metalloproteinase 1 et 3) et qui seraient impliquées dans les lésions articulaires (Assuncao-Miranda, Bozza et al.). Les cellules macrophages murines en culture contiennent toujours du virus plus de 50 jours post-infection mais sans aucun signe d'effet cytophagène (Linn, Aaskov et al. 1996; Way, Lidbury et al. 2002).

## VII.3 Rôle des médiateurs solubles:

Mateo *et al* ont étudié l'expression des cytokines et des chemokines chez les fibroblastes de synoviale humaine infectés par le RRV ainsi que celle des macrophages de souris infectés *de novo* ou de façon chronique (Mateo, La Linn et al. 2000). Ils ont montré que les deux types cellulaires exprimaient fortement du MCP1/CCL2, de l'IL8/CXCL8 et du MIP-2 (macrophage inflammatory protein 2 ; CXCL1). Les fibroblastes synoviaux montrent une augmentation de l'expression de MCP1 et d'IL8, alors que les macrophages de souris infectés montrent une augmentation d'expression de MIP-2 et d'IL8 après une infection aiguë. Les macrophages infectés de façon chronique ont un taux plus élevé de MIP-2, d'IL8, de MCP1 et d'IP-10 (interferon inducible protein 10, CXCL10), comparés aux cellules contrôles non infectées. La plupart de ces chimiokines pourraient être impliquées dans le recrutement chronique des macrophages au site infectieux et ainsi perpétuer l'infection latente des macrophages et la

réponse inflammatoire chronique (Soden, Vasudevan et al. 2000). Ce scénario pourrait également se retrouver au niveau des muscles, mais le rôle des myoblastes dans la réponse inflammatoire locale n'a jamais été évaluée pour le RRV (Murphy, Taylor et al. 1973; Lidbury, Simeonovic et al. 2000).

L'IFN- $\gamma$ , sécrété par les cellules T spécifiques anti-RRV, a aussi été détecté dans le liquide synovial de patients malades (Rulli, Suhrbier et al. 2005). L'IFN- $\gamma$  est responsable de la différenciation des monocytes en macrophages, ainsi que de leur activation. Cette activation pourrait entraîner une augmentation de l'expression du récepteur liant le collagène IV ( $\alpha 1\beta 1$  intégrine) qui a été identifié comme un des récepteurs du RRV (Rulli, Suhrbier et al. 2005).

L'action du complément est controversée dans la pathologie post-infectieuse à alphavirus et les données restent parcellaires. Le complément n'interviendrait pas dans le phénomène de lyse cellulaire par les Acs. Néanmoins, il jouerait un rôle car la clairance virale par les Ac est retardée chez les souris déficientes en complément (Griffin 1995). Par ailleurs, le complément augmente la sévérité de la maladie à RRV chez la souris, les produits d'activation du complément sont détectés dans les tissus inflammatoires et le sérum. Les souris déficientes en C3 développent une maladie moins sévère, avec une destruction beaucoup moins importante des muscles squelettiques (Morrison, Fraser et al. 2007).

#### **VII.4 Rôle des cellules T :**

Les réponses des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> contribuent à la résolution de l'infection virale primaire. Une altération de l'activité des cellules CD8<sup>+</sup> a été associée à une clairance incomplète et à la persistance virale (Colin de Verdiere and Molina 2007). Concernant le RRV, on retrouve une prédominance de cellules CD8<sup>+</sup> dans la peau des patients qui guérissent rapidement de leur éruption. Par contre, les cellules CD4<sup>+</sup> sont plus nombreuses dans le liquide synovial des

patients chroniques (Fraser and Becker 1984). De façon intéressante, les cellules T CD8+ mobilisées suite à la vaccination par les protéines de capsid de RRV sont capables d'éliminer radicalement le virus des macrophages infectés (Linn, Mateo et al. 1998). Ceci suggère qu'une immunité à médiation cellulaire défaillante, pourrait être, en partie, responsable de la persistance virale et du développement des lésions chroniques chez les patients souffrant de polyarthrite épidémique à RRV (Fraser 1986). Ceci est illustré par la dérégulation observée chez les macrophages infectés par RRV *in vitro*. A la surface des macrophages, la molécule CD80 interagit avec la molécule CD28 des cellules Th et avec la molécule CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated-4) des LTcs. Cette interaction est cruciale pour la présentation de l'antigène et l'activation des LTcs (Fleischer, Soeth et al. 1996). Way et al, en travaillant sur des macrophages murins, ont montré que dans l'infection persistante, le niveau d'expression de CD80 de ces cellules chute à un niveau inférieur à celui des cellules non infectées. RRV altère donc la détection immune du virus ainsi que la réponse adaptative tout en conservant la propriété phagocytaire des macrophages (Way, Lidbury et al. 2002).

## **VII.5 Phénomène d'ADE et infections chroniques à alphavirus :**

Le RRV peut infecter les macrophages par l'intermédiaire d'une intégrine, mais aussi utiliser le mécanisme d'ADE pour augmenter son pouvoir infectieux. Linn *et al* ont montré *in vitro* qu'en présence de faibles concentrations neutralisantes d'Ac spécifiques, l'infection à RRV des macrophages était augmentée après contact des complexes virus-Ac avec les récepteurs Fc de la membrane cellulaire : c'est le phénomène de facilitation dépendante des anticorps décrit chez les alphavirus par Linn et al (1996), mais aussi chez d'autres virus comme la dengue (Chanas, Gould et al. 1982 ; Krilov, Anderson et al. 1989; Olsen, Corapi et al. 1992 ). Bien que ce phénomène ait été démontré essentiellement *in vitro*, il peut survenir *in vivo* (Halstead 1979).



Les immuns complexes peuvent être reconnus par le FcR (Ravetch and Clynes 1998), et ils peuvent aussi interagir avec les composés C1q ou C3 et ainsi engager les récepteurs du complément CR1 ou CR3. Ces complexes ciblent l'entrée du virus, ou la fusion de la membrane cellulaire, lorsque ces Ac ont induit un changement conformationnel des glycoprotéines d'enveloppe nécessaires au virus (Takada and Kawaoka 2003). L'ADE supprime l'activité de NF-kB, et d'ISG3 (hétérodimère de STAT) et par conséquent, altère la production des facteurs antiviraux tels que TNF- $\alpha$ , NOS2 (nitric oxide synthetase 2A), IFN- $\beta$  et favorise l'infection persistante des macrophages (Lidbury, Simeonovic et al. 2000; Mahalingam and Lidbury 2002). L'IL-10 est un puissant immunosuppresseur et sa synthèse est fortement augmentée en présence du phénomène d'ADE (Mahalingam and Lidbury 2002). Des taux élevés d'IL-10 ont été aussi observés dans l'infection à SINV et à VEEV chez la souris (Grieder, Davis et al. 1997; Rowell and Griffin 1999), ainsi que dans des formes graves fatales d'infections à Ebola et dengue (Green, Vaughn et al. 1999; Baize, Leroy et al. 2002). Par ailleurs, le niveau de production de la protéine MCP1 est significativement plus élevé au cours de l'infection avec ADE, comparé à l'infection sans ADE. Des études sur le virus de l'arthrite-encéphalite caprine chez la chèvre suggèrent un lien entre l'infection par l'ADE et la sévérité de la maladie (Ramshaw, Ramsay et al. 1997). Ce virus entraîne une arthrite incapacitante et les chèvres vaccinées contre ce virus développent une arthrite sévère (McGuire, Adams et al. 1986). Ces observations confortent le lien entre l'infection persistante, l'inflammation chronique et le phénomène d'ADE. Au regard de ces actions, le phénomène de l'ADE soulève des questions quant au développement des vaccins.

## **VII.6 Persistance virales et conséquences immunologiques :**

Plusieurs mécanismes sont envisagés afin d'expliquer la persistance virale : 1) la capacité du virus à inhiber l'activité antivirale par l'induction d'IL10 (cytokine immunosuppressive) des macrophages lorsque l'infection survient par la voie de l'ADE (Mahalingam and Lidbury 2002 ; Suhrbier and La Linn 2004); 2) la capacité des alphavirus à utiliser les corps apoptotiques comme 'cheval de Troie', car la phagocytose de ces vésicules par les macrophages permettrait au virus d'infecter et d'être à l'abri des anticorps neutralisants (Li and Stollar 2004) ; 3) la présence de particules virales localisées dans des vésicules intracellulaires (d'autophagie) ce qui empêcherait la reconnaissance par les senseurs cellulaires (RLR et TLR)(Way, Lidbury et al. 2002) ; 4) l'induction par le virus de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. C'est le cas du SINV qui induit l'expression de Bcl-2 dans les cellules gliales (Appel, Katzoff et al. 2000) ; et 5) le rôle de certaines protéines virales, telles que nsP2 qui interféreraient dans la réponse antivirale engagée par les interférons de type I (Frolov 2004).

Une importante question est de savoir dans quel état se trouve le génome viral au cours de l'infection persistante et pour répondre au potentiel répliatif du virus. Des études réalisées sur le virus de la chorioméningite lymphocytaire ont montré que l'infection persistante était liée à la présence d'ARN défectifs interférents. Ces génomes défectifs contiennent de courtes délétions ou des ajouts de nucléotides ; ils sont compétents pour la réplication mais pas pour la transcription (Meyer and Southern 1997).

## VIII. Objectifs et hypothèses de travail

Le virus Chikungunya est un alphavirus de l'Ancien Monde dit arthritogène, transmis par le moustique *Aedes albopictus*. La primo-infection, le plus souvent symptomatique se manifeste par un syndrome fébrile associant céphalées, douleurs articulaires et musculaires, et des éruptions cutanées qui guérissent généralement dans les 2 semaines (Pialoux, Gauzere et al. 2007). Chez un certain nombre de patients (Sissoko, Malvy et al. 2009), des arthralgies invalidantes peuvent persister plusieurs mois, voire des années. Ces manifestations aiguës et surtout chroniques, sont à l'origine de doléances de la part des patients, et ne peuvent bénéficier que de traitements symptomatiques, antalgiques et anti-inflammatoires. Plus rarement, devant l'inefficacité de ces derniers, des traitements plus invasifs, immunosuppresseurs (méthotrexate), voire anti-TNF alpha ont été utilisés de façon empirique chez des patients souffrant de rhumatismes post-CHIK. L'épidémie de CHIKV qui a sévi dans la région de l'Océan Indien, plus particulièrement à la Réunion en 2005-2006 nous a donné l'occasion d'étudier les mécanismes physiopathologiques de la maladie. En effet, jusqu'à présent, les épidémies survenant dans les pays d'Afrique et d'Asie, les données de la littérature font état essentiellement d'études sérologiques. Des études sur la souris ont certes apporté des éclairages (Couderc, Chretien et al. 2008) quant au rôle clef de la réponse IFN contre l'infection expérimentale mais essentiellement chez les nouveau-nés. C'est surtout celle récente de Gardner qui a décrit les lésions articulaires à long-terme ainsi que la présence virale dans les tissus articulaires (Gardner, Anraku et al. 2010).

Tout aussi récent, le modèle macaque, qui semble bien reproduire l'infection humaine, bien qu'il soit difficile d'attester de l'atteinte chronique, a contribué de façon majeure à la compréhension de la maladie en démontrant, plusieurs mois après l'infection la persistance du virus dans les macrophages du tissu conjonctif articulaire (Labadie, Larcher et al.).

L'objectif premier de la thèse a été de caractériser la réponse immune lors de la phase aiguë de l'infection CHIK tout en identifiant les différentes composantes cellulaires et moléculaires de cette réponse protectrice. En effet, bien que la virémie puisse atteindre des taux très élevés (plus de  $10^{10}$  vRNA/ml), elle chute et disparaît rapidement au bout de quelques jours.

Le second objectif a été de déterminer les facteurs et les mécanismes responsables de la pathologie chronique invalidante de type arthritique post-CHIK. Les deux hypothèses de travail qui peuvent être proposées concernent soit une forte réponse inflammatoire chronique ou une persistance du virus dans les articulations, les deux événements n'étant pas nécessairement exclusifs mais contribueraient aux lésions tissulaires et fonctionnelles décrites par les patients 6-24 mois après l'épidémie.

Nous avons réalisé un premier état des lieux trois ans après l'épidémie, sur les aspects épidémiologiques, cliniques, de l'expérimentation cellulaire et animale (souris, macaque), ainsi que sur la réponse cellulaire et moléculaire de la réponse immunitaire systémique et locale en lien avec l'arthrite chronique post-CHIKV (**Article 1, premier auteur**).

Cet état des lieux a été complété par la seconde revue qui a abordé la transmission néo-natale, les formes pédiatriques ainsi que les formes graves, atypiques et l'arthrite post-CHIKV de l'adulte. L'aspect thérapeutique et préventif a aussi été traité avec la description des moyens de traitement symptomatique, des stratégies vaccinales et des moyens de lutte anti-vectorielle (**Article 2, premier auteur**)

L'obtention d'un PHRC en Septembre 2006 au cours de l'épidémie de chikungunya qui a marqué l'île de la Réunion en 2005-2006 nous a permis de mener et de débiter des études immunologiques chez l'homme. L'inclusion des patients en phase aiguë, et leur suivi, en particulier celui des patients évoluant vers l'arthrite chronique, nous a permis d'une part le recueil des données cliniques, et d'autre part la constitution d'une bibliothèque complète comprenant sérum, plasma, ADN, cellules et virus au cours des différentes consultations du

suivi. Grâce à la collaboration des cliniciens des trois hôpitaux, à l'ouest, les Dr Philippe Morbidelli (Service des Urgences) et Gérard Martigny (Laboratoire) du CH Gabriel Martin, à l'est le Dr François Binois au CH de Saint-Benoît, et au nord, les Dr Anne Ribera (Service de rhumatologie), Marie-Pierre Moiton (Service d'Infectiologie), des patients de l'est, du nord et de l'est ont été inclus. Ce PHRC nous a permis de consolider les liens avec l'Université de la Réunion en m'intégrant au Groupe de Recherche sur l'Immunopathologie et les maladies infectieuses (GRI) du Pr Philippe Gasque, et de mettre en place des partenariats métropolitains, avec le Pr Brigitte Autran et le Pr Patrice Debré (INSERM U543/945, Paris) pour la partie immunologie (immunophénotypages, Elispot), le Pr Hugues Tolou de l'IMTSSA (Pharo, Marseille) pour la partie virologique, le Dr Philippe Desprès pour la partie génétique, et avec le Pr Jet Marty de la Walter Read pour l'étude du transcriptome.

Tout en assurant la coordination du PHRC (inclusions, suivi clinique et biologique), j'ai participé avec le Dr Jean-Jacques Hoarau à l'application des différentes techniques : cultures virale et cellulaire, Western-blot, RT-PCR, ELISA, immunomarquages. Nous avons déterminé le phénotypage des populations leucocytaires lors de l'infection aiguë et lors des rechutes (patients décrivant à nouveau des arthralgies des mois après la primo-infection). Nous avons recherché par RT-PCR la présence du CHIKV et suivi la réponse immune acquise par la sérologie CHIKV. Nous avons étudié au niveau traductionnel la réponse immune innée en dosant par ELISA et micro-array les cytokines et chemokines, et au niveau transcriptionnel par RT-PCR. Nous avons analysé par Western-blot la réponse anticorps et l'apoptose. Des immunomarquages ont été réalisés sur des biopsies de synoviales pour étudier l'infection, les cellules impliquées, la réponse immune locale ainsi que l'apoptose. Nous avons pu comparer les réponses lors de la phase aiguë et pendant les rechutes, de patients guéris et de patients chroniques jusqu'à 12-18 mois de suivi. Par ailleurs, nous avons étudié la sensibilité des plusieurs lignées cellulaires, de fibroblastes primaires humains au CHIKV. Les résultats obtenus contribuent à une meilleure connaissance

des mécanismes physiopathologiques de la maladie : en définissant des facteurs prédictifs d'évolution vers la chronicité (âge > 60 ans, charge virale initiale élevée), en décrivant une réponse immune persistante (IL12, ARNm IFN $\alpha$ ) chez les patients chroniques, en identifiant du matériel viral dans les macrophages synoviaux. Ces résultats permettront d'avoir une réflexion sur l'orientation du traitement, puisque nous avons mis en évidence en particulier lors des rechutes peu de paramètres de l'inflammation, en l'occurrence l'absence de TNF $\alpha$  (**Publication 3 : co-premier auteur ; (Hoarau, Jaffar Bandjee et al.)**).

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus de défense permettant de contrôler la production et la dissémination virale (Griffin and Hardwick 1997). Dans la Publication 3, l'analyse des coupes biopsiques de synoviale du patient atteint d'arthrite post-CHIK nous a révélé une forte activité apoptotique. Nous avons étudié par conséquent l'apoptose au cours de l'infection CHIKV en utilisant la lignée cellulaire Hela ainsi que des fibroblastes primaires. Nous avons ainsi démontré que CHIKV utilise les deux voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose sans signe d'inflammation, bien que les facteurs déclenchant la voie extrinsèque et de la voie intrinsèque ne soient pas identifiés. Des cellules non infectées peuvent entrer en apoptose par un effet 'bystander' caspase 8 dépendant. Les corps apoptotiques renfermant du virus infectent les cellules avoisinantes ainsi que les macrophages, ces derniers étant réfractaires à l'infection par du virus seul (surnageant de culture filtré). Il s'agit probablement d'un mécanisme d'évasion permettant au virus d'échapper à la réponse anti-virale, et donc de persister. (**Publication 4 acceptée sous réserve de modifications mineures dans FASEB Journal**)

## IX. Résultats

*Article 1: Chikungunya virus takes centre stage in virally-induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis.*

Revue sur invitation et je suis le premier auteur de cet article de synthèse publié dans *Microbes and infection* en 2009.

Cette revue nous a permis de faire un point sur plusieurs aspects de l'infection CHIKV, trois ans après l'épidémie 2004-2006 qui a débuté au Kenya, et à la lumière de nos premiers résultats, proposer un début d'explication aux mécanismes cellulaires et moléculaires de la physiopathologie de l'arthrite chronique post-CHIKV.

Points importants soulignés de cette revue :

1 – Aspects épidémiologiques et pathologiques chez l'homme :

En 2004, la réémergence du CHIKV au Kenya, à l'origine de la vague épidémique qui s'est déployée tout autour de la zone de l'Océan Indien, touchant les îles de l'Océan Indien, puis l'Inde, avec des cas importés de ces régions dans nombre de pays. Le risque épidémique est toujours présent en raison de taux d'attaque élevés, de virémies très élevées chez les malades et de la distribution mondiale du vecteur, *Ae albopictus*, qui s'est adapté et disséminé dans de nombreuses régions (Charrel, de Lamballerie et al. 2007).

Concernant le virus CHIKV, il est intéressant de noter l'acquisition de la mutation A226V sur la glycoprotéine E1, observé sur plus de 90% des souches réunionnaises isolées en septembre 2005, alors qu'elle était absente au début de l'épidémie en avril 2005 (Schuffenecker, Iteman et al. 2006). Ce phénomène témoigne du pouvoir d'adaptation du virus au moustique (Tsetsarkin, Vanlandingham et al. 2007).

Au cours de l'épidémie réunionnaise qui a concerné le tiers de la population (plus de 270 000 cas), il a été rapporté pour la première fois, des formes cliniques sévères, en particulier chez les nouveau-nés et les sujets âgés, ainsi que des décès (1/1 000 cas) (Economopoulou, Dominguez et al. 2009). La triade du tableau classique associe fièvre, polyarthralgies et éruption maculopapulaire. Les formes asymptomatiques représentent 5% des cas à la Réunion.

Le diagnostic est réalisé par la mise en évidence d'ARN viral par RT-PCR ou la sérologie, bien que les IgM peuvent durer plusieurs mois (nos résultats) (Laurent, Le Roux et al. 2007). La persistance des IgM anti-CHIKV serait un marqueur de la persistance de matériel viral, déjà décrit pour d'autres alphavirus (Kuno 2001), et pourrait expliquer les pathologies chroniques, et ce, malgré la réponse immune adaptative solide. L'arthrite post-CHIKV est caractérisée par une ténosynovite et une entésopathie (nos observations) sans érosions osseuses, à la différence de la polyarthrite rhumatoïde. Bien que des auteurs indiens (Chopra, Anuradha et al. 2008) retrouvent chez leurs patients des marqueurs d'auto-immunité (facteur rhumatoïde, anticorps anti peptides citrullinés), nous ne les avons pas retrouvés chez nos patients.

L'atteinte neurologique du CHIKV, déjà décrite, a été retrouvée dans les dernières épidémies, incluant des atteintes périventriculaires, méningo-encéphaliques, polyradiculonévritiques (Syndrome de Guillain-Barré) ainsi que des décès.



## 2 – Les modèles expérimentaux qui reproduisent certains aspects de la pathologie humaine

Les études *in vitro* du tropisme tissulaire et des mécanismes pathogéniques :

CHIKV infecte et se réplique dans de nombreux modèles de fibroblastes (L929 murin, MRC5 humain), de cellules épithéliales (Vero, Hela, Hep-2, bronchique BEAS-2B), hépatocytes (HUH7 humain), lignée cellulaire de neuroblastome (SH-SY5Y) et de mélanocytes (SKMEL humain) ; ces résultats corroborent avec les données publiées (Sourisseau, Schilte et al. 2007 ; Solignat, Gay et al. 2009). L'infection CHIKV des cellules endothéliales dépend de leur origine, celles provenant de la moelle osseuse répliquent le virus, contrairement à celles provenant du cerveau et du cordon ombilical (nos résultats non publiés) (Sourisseau, Schilte et al. 2007). De la même façon, la détection du CHIKV a été décrite seulement dans certains micro-vaisseaux chez le macaque (Labadie, Larcher et al. 2010) et la souris (Sourisseau, Schilte et al. 2007). Contrairement au RRV et au VEEV, les cellules immunes ne sont pas infectées par le CHIKV libre mais sans que l'on ait testé le rôle de l'ADE ou encore des corps apoptotiques dans un modèle d'infection indirecte. Les macrophages primaires sont infectés de façon variable en fonction du donneur, mais avec une faible répllication virale.

Les modèles souris :

Plusieurs lignées de souris outbred (CD1, ICR, NIH Swiss) (Wang, Volkova et al. 2008; Ziegler, Lu et al. 2008 ) ou inbred (Balb/c, C57B16, 129) (Powers and Logue 2007 ; Couderc, Chretien et al. 2008 ; Gardner, Anraku et al. 2010) ont été infectées par le CHIKV (souche Ross ou réunionnaise LR 2006-OPY1) en utilisant plusieurs voies (sous-cutanée, intranasale ou intra-péritonéale). En fonction du modèle, l'infection entraîne une répllication virale importante dans le sang et les tissus mais qui dure tout au plus une dizaine de jours avec la disparition du virus dans le sang et dans les tissus. La souris CD1 reproduit la pathologie humaine avec en particulier

l'atteinte des membres (Ziegler, Lu et al. 2008). Les jeunes souris (1-2 jours) sont plus sensibles que les plus âgées. L'infection intranasale de souris Balb/c entraîne une infection neuronale et une nécrose du lobe olfactif antérieur (Powers and Logue 2007). L'atteinte du cerveau montre une atteinte multifocale avec nécrose du cortex cérébral (Powers and Logue 2007 ; Ziegler, Lu et al. 2008). L'analyse immunohistologique montre une infection des neurones avec une apoptose, et rappelle l'atteinte neurologique rapportée chez des patients âgés par Ganesan *et al.* (Ganesan, Diwan et al. 2008). Chez les souris KO-IFNAR, la neuroinfection est sévère avec des lésions de la substance blanche sous-ventriculaire, retrouvées dans des atteintes encéphalitiques chez des nouveau-nés (Robin, Ramful et al. 2008). Nos études préliminaires transcriptomiques sur la lignée astrocytaire de souris CLTT montre que ces cellules sont infectées par CHIKV, et cette infection s'accompagne d'une réaction inflammatoire et la mort des cellules par apoptose.

Le modèle macaque (primate non humain, NHP) :

La première infection expérimentale CHIKV de NHP date de 1967 et a reproduit les épisodes fébriles quelques jours après l'inoculation (Binn, Harrison et al. 1967). Plus récemment, l'infection de macaque *Cynomolgus* par une souche réunionnaise a reproduit plusieurs aspects de la maladie humaine par les aspects virologiques (charge virale), immunologiques (réponse antivirale IFN- $\alpha/\beta$ , attraction et activation des cellules immunes IFN- $\gamma$ , MCP-1), et biologiques (leucopénie, thrombopénie) (Labadie, Larcher et al. 2010). Chez les animaux infectés avec un fort inoculum, l'atteinte neurologique a pu être reproduite avec la présence de CHIKV dans le liquide céphalo-rachidien ayant entraîné la mort de l'animal, rappelant les formes graves de certains nouveau-nés (Ramful, Carbonnier et al. 2007). Du virus répliquatif a été isolé dans le foie, la rate et les muscles trois mois après l'infection, argumentant la persistance du virus dans les macrophages des gîtes tissulaires sanctuaires (Labadie, Larcher et al. 2010).

### 3 – Etude de la réponse cellulaire et moléculaire de la réponse immune :

La réponse IFN de type 1 induite par CHIKV semble protectrice *in vitro* seulement après prétraitement des cellules par l'IFN, probablement en induisant l'expression de gènes stimulés par l'IFN, les ISGs et l'oligoadénylate synthétase OAS (Sourisseau, Schilte et al. 2007). L'OAS serait active contre la réplication du CHIKV dans les cellules Hela (Brehin, Casademont et al. 2009).

### 4 – Rôle de la persistance du CHIKV dans les gîtes sanctuaires afin d'expliquer les manifestations rhumathologiques post-CHIKV :

Une conjonction d'arguments afflue au fait que la persistance des manifestations articulaires soit liée à la persistance virale au cours des alphavirus arthritogènes (Tesh 1982; Rulli, Melton et al. 2007). Nous avons montré que le sujet infecté par le CHIKV mobilise rapidement une réponse immune innée avec les cellules NK qui sont très actives les premiers jours et conduisent à une réponse CD4/CD8. L'IFN- $\alpha$  et l'IL-12 qui agissent de façon synergique afin de promouvoir l'activation des cellules immunes sont augmentés chez les patients souffrant de CHIKV à la fois en phase aiguë et chronique. La persistance du CHIKV pourrait être liée à un défaut de détection et/ou de neutralisation du virus par les cellules immunes telles que les DCs, cellules NK et CD8. En effet, la rareté des cellules T CD8 dans les biopsies synoviales d'un patient chronique pourrait expliquer la persistance virale. Le virus caché dans les niches sanctuaires des articulations contribuerait aux lésions tissulaires, via l'apoptose induite (détection de PARP clivé dans les cellules CHIKV +), et la forte expression de métalloprotéases MMP2 et sans nécessairement impliquer une réaction inflammatoire toxique comme cela a été observée pour RRV (Lidbury, Rulli et al. 2008).

La survenue de l'épidémie de CHIKV dans une région bénéficiant de plateaux techniques (clinique, biologique et radiologique) performants a permis de contribuer à une meilleure

compréhension de la pathologie, en particulier en décrivant le rôle central du macrophage qui en hébergeant du matériel viral développe une certaine réponse immune et entretient le processus pouvant évoluer vers des lésions tissulaires.

Forum

## Chikungunya virus takes centre stage in virally induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis

Marie Christine Jaffar-Bandjee<sup>a,b</sup>, Trina Das<sup>a</sup>, Jean Jacques Hoarau<sup>a</sup>, Pascale Krejbich Trotot<sup>a</sup>,  
Mélanie Denizot<sup>a</sup>, Anne Ribera<sup>a,c</sup>, Pierre Roques<sup>d</sup>, Philippe Gasque<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Infection Research Grouping (IRG, GRI), University of la Réunion, St Denis, Ile de la Réunion

<sup>b</sup> Virology laboratory, CHR Félix Guyon of la Réunion, St Denis, Ile de la Réunion

<sup>c</sup> Rheumatology, CHR Félix Guyon of la Réunion, St Denis, Ile de la Réunion

<sup>d</sup> CEA, DSV/IMETI/Service d'Immuno-virologie, Fontenay-aux-Roses, France

Received 30 September 2009; accepted 5 October 2009

Available online 14 October 2009

### Abstract

Chikungunya virus (CHIKV) causes an acute symptomatic illness with fever, skin rash (hypersensitivity vasculitis), incapacitating arthralgia which can evolve to chronic arthritis in elderly patients. Clinical observations from cohort studies have been corroborated with data from experimental infection in several mouse and non-human primate models as discussed herein.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Virus; Arthritis; Immunology

### 1. Chikungunya and epidemic arthritis

CHIKV is an *Alphavirus* of the *Togaviridae* family transmitted by mosquitoes of the *Aedes* (*Ae*) genus [1]. The *Alphavirus* group comprises 29 viruses, six of which can cause human joint disorders (arthralgia evolving to arthritis), namely CHIKV,

o'nyong-nyong virus (ONNV), Semliki forest virus (SFV) (Africa, Asia, Europe), Ross River virus (RRV) (Australia and the Pacific), Sindbis virus (SINV) (cosmopolitan), and Mayaro virus (MAYV) (South America, French Guyana) [1]. These are the so-called 'Old-World' *Alphaviruses* and distinguishable from the 'New World' *Alphaviruses* such as the Eastern equine encephalitis virus (EEEV) and Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) which are best known for their prominent encephalitogenic activities. It has been proposed that the *Alphaviruses* originated from the New World and was introduced into the Old World through migratory animal reservoir.

The CHIKV genome is approximately 11 Kb and consists of a single-stand of positive-sense RNA with two open reading frames (ORF). The 5' ORF encodes the virus non-structural proteins (nsp) 1–4. The nsps are multifunctional and together form the virus replicase. The 3' ORF encodes the virus structural proteins, the capsid and the envelope glycoproteins E1 and E2. E3 is a secreted polypeptide of unknown functions [2]. Interestingly, a mutation at residue 226 of the membrane fusion glycoprotein E1 (E1-A226 V), was absent from the strains isolated during the first months of the outbreak in La Réunion, but

**Abbreviations:** APAF-1, apoptotic protease activating factor 1; CHIKV, chikungunya virus; CNS, central nervous system; FADD, Fas-associated death domain; IAP, inhibitor of apoptosis; IFN- $\alpha/\beta$ , type I interferons; IFNAR, interferon receptor, A chain; ISG-15, IFN-stimulated genes (ISGs), of 15 kDa; IPS-1, IFN- $\beta$  promoter stimulator-1 (also known as MAVS, CARDIF and VISA); IRF, interferon (IFN)-regulatory factor; MDA-5, melanoma differentiation-associated gene 5; Mx, myxovirus resistance protein; NF $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B; OAS, oligoadenylate synthetase; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; PKR, IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase; PRR, pattern recognition receptors; RIG-I, retinoic acid inducible gene I; RIP1, receptor-interacting protein 1; RNaseL, ribonuclease L; STAT1, signal transducer and activator of transcription; SVZ, subventricular zone; TLR, toll-like receptors (TLRs); TRADD, tumour-necrosis factor receptor-associated via death domain.

\* Corresponding author. Tel.: +262 262938836; fax: +262 262 938801.

E-mail address: gasque@univ-reunion.fr (P. Gasque).

was found in more than 90% of isolates after September 2005 [3]. This type of change originally described in another close alphavirus, SFV, could be related to virus adaptation to the mosquito vector species as recently described [4,5]. Other CHIKV isolates are currently being sequenced to provide spatiotemporal data on the viruses isolated from different locations and to find out whether any molecular signatures could be associated with unusual clinical forms [6].

The vast scale and sudden emergence of the la Réunion outbreak underlines how little we knew of the biology and pathology of CHIKV. Overall, 270,000 cases (1/3rd of the population) were reported and this outbreak was the first time that a number of severe clinical manifestations, particularly following infections of newborns and elderly (see below), and rare mortality (estimated at 1:1000 of cases) were reported to be associated with CHIKV [3,7–13]. Very similar figures were obtained in India with attack rates reaching 45% in some areas [14]. Classically, infected people adopt a characteristic stooped walking position which is the hallmark of the disease and from which it derives its name 'chikungunya', meaning 'to walk bent over', in the Kimakonde language of Mozambique. The classic clinical symptoms after infection by CHIKV are abrupt febrile illness (temperature usually >38.9 °C), polyarthralgia (over 90% of cases) and maculopapular rash (a form of micro-vasculitis, more than 1/3rd of cases). The pain can be excruciating and is usually symmetrical and involved more than one joint. Fingers, wrists, elbows, toes, ankles and knees are most commonly affected as described for most of the alphaviruses [15]. Previously injured joints are especially susceptible. Paresthesia (numbness and tingling) in the skin covering affected joints has also been described while the joints are often swollen but there are usually no other signs of inflammation [16]. The other symptoms include myalgia (muscle pain), headache, edema of the extremities, and gastrointestinal complaints [16,17]. The incubation period for CHIKV ranges from 3 to 7 days, in agreement with data from other alphaviruses [18] and as few as 5% of asymptomatic CHIKV cases were generally reported.

The viremic phase (as much as  $10^9$ – $10^{12}$  virus/ml) lasts for 7–12 days (see Fig. 1) after onset of the symptoms while the levels of IgG (and surprisingly IgM) can last for months [19]. High viremia is more likely to be detected in newborns and elderly CHIKV disease patients requiring hospitalization (our unpublished observations) and Ref. [20]. The persistence of anti-alphavirus IgM antibodies was already reported by Calisher et al., particularly for CHIKV, and this could be an indicator of virus and/or viral antigenic persistence with continuing stimulation of the humoral response but yet by ill-characterized mechanisms [18,21]. High levels of IgM anti-SINV (from 6 months after infection in over 30% of the patients and up to 4 years) were also reported in more recent cohort studies of patients with Pogosta/Ockelbo-diseases and some were also positive for autoimmune rheumatoid factor (RF) [18,22]. A comprehensive review by Goro Kuno in 2001 highlighted that the persistence of alphaviruses (viral particles or viral antigens) and antiviral antibodies (IgM) in different vertebrates (human, rodents, birds) has long been established

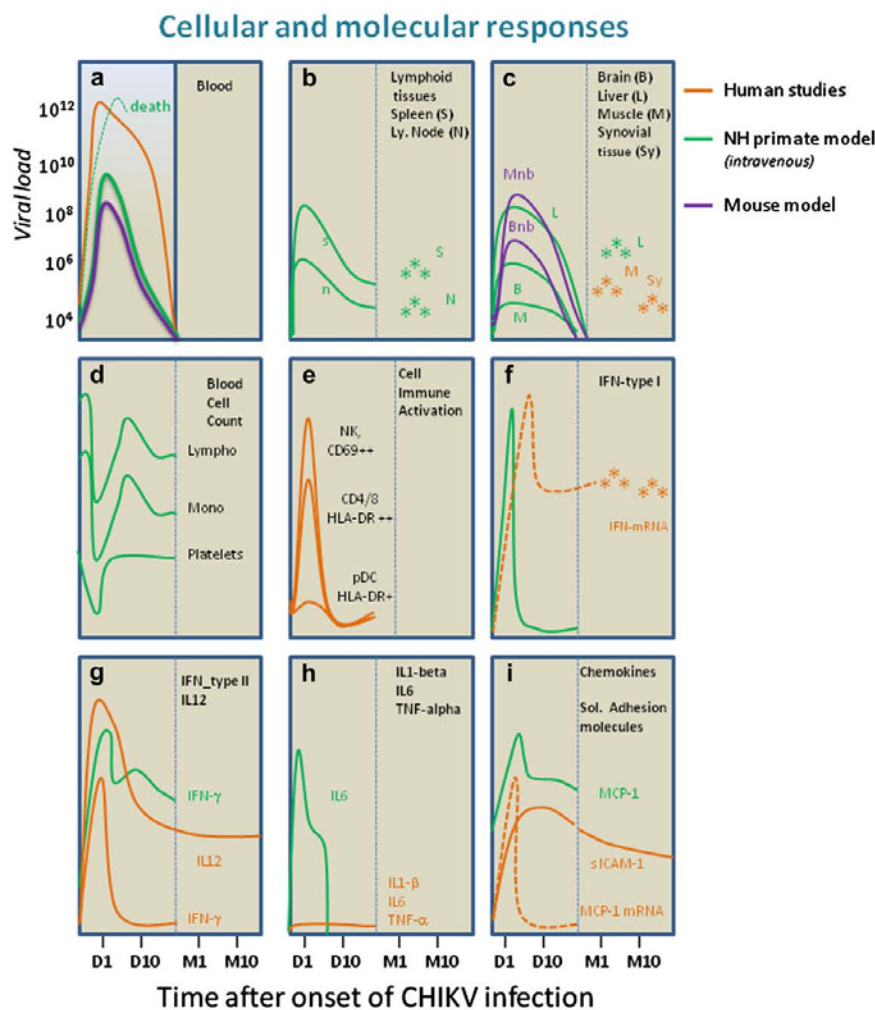
although its meaning has been under appreciated [23]. Critically, this is an important observation to take into consideration to explain the long-term sequelae and chronic pathologies which could indeed be associated with the persistence of alphaviruses in tissue sanctuaries (as discussed below). Interestingly, and in contrast to dengue virus (DV), the apparition of IgG anti-CHIKV was detected in the first week (even at day 2 in some patients) following infection and illustrating the rapid seroconversion and robust adaptive immune response [24]. Remarkably and in analogy to other alphaviruses, clinical biological laboratory parameters (e.g. acute phase proteins such as CRP, complement) remained largely within the normal ranges, although major lymphopenia and moderate thrombocytopenia characterized the acute infectious phase of CHIKV fever [16].

The acute signs and symptoms usually resolve in less than 2 weeks, but arthralgia may linger for weeks, months or even years and this is a clinical sign that may distinguish CHIKV from DV infection [25]. Typically, the joint symptoms occurred in a fluctuating manner but did not change anatomical location. Chronic incapacitating arthritis has already been described for several alphaviruses [15,26–31] and rheumatic manifestations in 10–20% of the CHIKV patients typically consisted of a febrile arthritis mainly affecting the extremities (ankles, wrists, phalanges) [32–36]. Pain within or around tendons was also a common trait and evolving to tenosynovitis/enthesopathy but rarely to joint synovitis. Inflammation of the periosteum, a dense membrane composed of fibrous connective tissue that closely wraps bone was evidenced in several patients with tenosynovitis (see Fig. 2).

More recently, Chopra et al. reported high levels of CHIKV IgM antibodies in a cohort of Indian patients with post-CHIKV rheumatoid arthritis (RA)-like illnesses [37]. These patients were clearly naïve for musculoskeletal disorders prior to CHIKV infection. Over 90 down to 60% of the patients were IgM+ in a period of 30–180 days post-infection and, interestingly, 5–10% of patients with arthritis were also positive for RF and anti-cyclic citrullinated peptide (CCP). Tenosynovitis/enthesopathy rather than synovitis was evidenced by ultrasonography in several cases and these unique observations are in agreement with our X ray imaging of enthesitis in post-CHIK RA-patients in la Réunion (see Fig. 2, Ribera's observations). Chopra's and our ongoing cohort studies did not reveal any major RA classic erosions of the cartilage and bones and hence the post-CHIK RA is reminiscent of but distinguishable from autoimmune RA. Nevertheless some inflammatory processes were suggested in the Indian's study by high levels of CRP (in over 70% of the cohort) and necessitating effective treatment regimes such as hydroxychloroquine, methotrexate, sulfasalazine and some corticoids for a period of up to six months.

Skin lesions were also reported and included vesiculobullous lesions with desquamation, aphthous-like ulcers and vasculitis lesions [9,12] as well as unusual complications such as hepatitis, pneumonia, mild hemorrhage, pre-renal failure, cardiologic manifestations (heart failure, myocarditis) and neurologic diseases. Of critical note, these severe cases





**Fig. 1. Cellular and molecular responses in CHIKV infection during the acute (day 1–10) and chronic (months 1–10) phases.** Time course events are depicted from data obtained in recent human studies in la Réunion and elsewhere, and correlating these clinical observations with experimental infection observations in mouse and non-human primate. a, viral load in blood (of note, high viremia is linked to deaths); b,c, viremia in tissues and detection of viral antigens and/or RNA as an indication of viral persistence (stars); d, blood cell count; e, immune cell activation; f, detection of soluble type I interferon in serum and expression of IFN- $\alpha$  mRNA in PBMCs from infected patients with chronic arthralgia (dashed line with stars); g, levels of IFN- $\gamma$  and IL12 in blood; h, Low levels of proinflammatory cytokines (IL1 $\beta$ , IL6, TNF- $\alpha$ ) in the acute phase of CHIKV; i, levels of MCP-1 (CCL2) (mRNA in PBMC as a dashed line), soluble ICAM-1 (surrogate marker of leukocyte trafficking through activated endothelial cells). In summary, the innate and adaptive immune responses against CHIKV are robust but yet do not protect from viral persistence in tissue sanctuaries.

were reported from hospitalized cohorts of patients and may be related to several underlying medical conditions; most commonly with hypertension, respiratory conditions and diabetes mellitus [16,36]. In a recent study from India, age >85 years was the only risk factor for mortality although the possibility of co-infection by DV (and other pathogens such as the respiratory syncytial or influenza viruses) may be contributing factors to be considered [38,39].

Muscle biopsies from two CHIKV-infected patients with a myositis syndrome were shown to contain viral antigens, located exclusively inside skeletal muscle progenitor cells [40]. Therefore, susceptibility of muscle stem cells to CHIKV infection might be crucial in the physiopathology of the virus, as persistent infection (up to 3 months post-infection with relapsing fever, arthralgia) might be involved in chronic myalgia (illustrated in Fig. 1c). Some inflammatory T cells

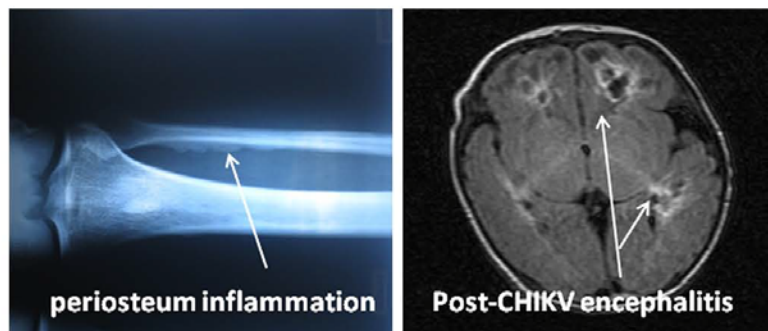


Fig. 2. Arthritis in elderly and encephalitis in newborns caused by CHIKV infection. a. Inflammation of the periosteum (enthesopathy) is clearly depicted in this X-ray picture of this elderly patient and indicative of the connective tissue (fibroblast) reaction to the CHIKV infection. b. T2 MRI pictures of a newborn with CHIKV CNS infection and arrows point to perivascular areas with inflammation.

(CD4 and CD8) constitute the main infiltrating cells in acute infectious settings and this response is amplified in the chronic phase with a robust recruitment and activation of macrophages (CD68+), CD3 T cells, and few CD8 T cells, NK cells (CD56+) and B cells (CD20+) [40]. The contribution of these immune cells to either antiviral responses or bystander tissue injury remains to be defined.

CHIKV infection was first reported to affect the nervous system in the 1960–1970s [41–47]. It was found to be associated with seizures, meningoencephalopathy, myelitis, and choroiditis. The same clinical hallmarks were reported in recent outbreaks but also included periventricular encephalitis (see MRI images, Fig. 2), meningoencephalitis and deaths in neonates hospitalized with severe CHIKV [7,8,10,11,13,38,48]. Neurological manifestations described in adults requiring hospitalization (incidence of 15–25%) involved cases of encephalopathy frequently associated with the presence of IgM anti-CHIKV in the CSF, encephalitis, Guillain Barre, encephalomyeloradiculitis and rare deaths [7,13,49–53]. The viral load in the CSF was generally lower than in blood, brain biopsies were found positive for CHIKV by RT-PCR and these data seem to indicate that CHIKV infection may also affect brain functions [19,20]. In Ganesan's case studies it was found that CHIKV neuroinfection in adults was associated to bilateral frontoparietal white matter lesions with restricted diffusion, which is described as an early sign of viral encephalitis [51,54]. Focal perivascular lymphocytic infiltrates were also present in area of active demyelination and some degree of microglial activation was also noted in the gray matter which may contribute to bystander neuronal loss. Although data are still scarce, the number of cases with CNS involvement appears to support the neuroinfectious activity of CHIKV.

Overall, the recent cohort studies indicated that CHIKV is a major burden affecting several tissues such as joints, muscles, skin, brain and to a less extent the liver and kidneys. This acute infection is likely to contribute to severe pathogenesis particularly in newborns and elderly patients with extremely high viral load. Moreover, the chronic phase seems to be associated with the persistence of specific IgM and chronic arthralgia/myalgia

which may be linked to the capacity of the virus to hide into tissue sanctuaries by ill-characterized mechanisms.

## 2. What can the experimental *in vitro* and *in vivo* models tell us about CHIKV-induced pathological mechanisms?

### 2.1. *In vitro* studies

Importantly, studies of CHIKV tissue tropism and pathogenic mechanisms could be further addressed *in vitro*. CHIKV infection and replication were evidenced in several cell culture models of fibroblasts (chick embryo fibroblast-like cells, mouse L929, human MRC5), epithelial cells (Vero cells, HeLa, Hep-2 cells, bronchial epithelial BEAS-2B), hepatocytes (human HUH7), neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) and melanocytes (human SKMEL) and corroborating the tissue tropism described above [55–58]. In some instances, it was shown that CHIKV could bind but not replicate in cells such as the pneumocyte A549 cells highlighting possible robust antiviral mechanisms. CHIKV infection and activation of platelets and endothelial cells have been reported and these events could be linked to thrombocytopenia and micro-vasculitis (rash) reported in acute infectious settings [57,59]. A great heterogeneity in CHIKV infection of endothelial cells has been observed by several groups and showing that those derived from bone marrow but not from brain/umbilical cord tissues could support replication (Ref. [57] and our unpublished observations). This observation is to be corroborated with the detection of CHIKV in some but not all microvessels in the non-human primate (NHP) and mouse CHIK models (see below) [60]. Early studies by Rinaldo et al. [61] showed that immune cells were non-permissive to infection and this has been confirmed in several more recent experiments using lymphocytes, monocytes, dendritic cells (Dc), natural killer (NK) cells and including human cell lines, Raji, Daudi, Jurkat, THP1, U937. This is in sharp contrast to RRV and VEEV which were shown to infect and stimulate immune cells such as monocytes, CD4 cells and Dc [62,63]. Primary macrophages can be infected by CHIKV (5–50% of cells depending



on the donors) but allowing only low viral replication and release of viral particles possibly non-infectious [57,58]. When CHIKV enters the cells through a receptor yet to be characterized, it will rapidly replicate at extremely high levels and induce cytopathic activities. There is a rapid shut-off of host cell transcription and translation followed by apoptotic death as assessed by the presence of numerous active caspase-3 and CHIKV double-positive HeLa cells [57]. The events leading to apoptosis remain to be fully determined although our data clearly indicate that both, intrinsic (mitochondrial) and extrinsic (Fas/TRAIL-like) apoptosis, pathways are involved consequently to CHIKV infection (pathways illustrated in Fig. 2). The intrinsic apoptosis pathway is engaged by cytochrome c released by the mitochondria to activate caspase 9 and sub-sequentially caspase-3. The extrinsic caspase 8-dependent pathway also seems to contribute to apoptosis given that several death receptors and ligands are up-regulated in CHIKV-infected HeLa cells (Krejchich-Trotot's unpublished observations) but the precise contribution of a death ligand (in analogy to TRAIL or FasL) to initiate the FADD death receptor (DR) pathway remains to be identified. More importantly, we found that apoptosis and the apoptosis machinery was subverted by CHIKV through the release of viral progeny shielded into membrane vesicles (i.e. apoptotic blebs) and, remarkably, engulfment of these CHIKV-apoptotic blebs promote the infection of macrophages (Krejchich-Trotot et al. 2009, unpublished data). CHIKV-infected macrophages appear to be poor producers of viral progeny (our data and Ref. [57]) but, more critically, they failed to respond to viral invasion by switching toward a proinflammatory phenotype (Fig. 3). The role of macrophages in perpetuating chronic arthralgia/arthritis will be further discussed below.

## 2.2. Mouse models of CHIKV infection

Experimental infections with CHIKV clinical isolates (LR 2006-OPY1 or Ross strain), were carried out in outbred (CD1, ICR, NIH Swiss) [64,65] or inbred mice (*Balb/c*, C57Bl6) [6,60] whether they were either inoculated (subcutaneously (sc), intranasally (in) or intraperitoneally (ip)). Regardless of the model and the routes of injection used, the infection led to rapid and robust viral replication ( $10^6$ – $10^8$  PFU/ml in 48 h) in blood and tissues. Interestingly, infected CD1 mice showed signs of illness suggestive of human clinical pathology such as loss of balance, difficulty of walking, dragging of the hind limbs, skin lesions and some deaths. In general, younger mice (1–3 day old) were more susceptible to disease than older mice (week old). The acute infection seemed to be tightly controlled by ill-characterized antiviral mechanisms given that the viral titer was reduced to basal levels at day 10 post-infection as described in humans [64]. In a more recent report [6], Powers and Logue reported that intranasal CHIKV infection in *Balb/c* mice led to neuronal infection and tissue necrosis in the anterior olfactory lobe. A model reported recently by Weaver and colleagues used intranasal injection of CHIKV Ross strain selected because of its excessive mouse passage history and which may have increased its virulence

[65]. Interestingly, 5-week-old C57BL/6 mice developed encephalitis 7 days post-infection with severe multifocal infection and liquefactive necrosis in the cerebral cortex. Immunohistochemistry techniques revealed that neurons were infected and induced to programmed cell death while a prominent microgliosis and perivascular cuffs were distributed throughout the parenchyma. These observations bear resemblance to the anatomopathological hallmarks of elderly patients with CHIKV neuroinfection reported by Ganesan et al. (see below) [51]. Moreover, the authors reported neuronal degeneration in the hippocampus and multifocal lymphocytic leptomeningitis. In inbred mice deficient in the IFN- $\alpha$  signaling pathway (KO for the IFNA receptor), CHIKV neuroinfection was particularly severe and targeting the leptomeninges, the choroid plexus and ependymal cells lining the subventricular zone (SVZ) also known as the neural stem cell niche [66,67]. This unique CNS infection illustrated by subventricular white matter lesions (see Fig. 2b) and intraparenchymal hemorrhages has been described already experimentally and in clinical settings for other alphaviruses such as SFV, RRV, EEV and SINV [68–71]. In the Ziegler's study [64], glial cells and neurons rarely stained for CHIKV were nevertheless found to be affected plausibly as a consequence of the robust antiviral innate immune and inflammatory responses as described for many alphaviruses [72–76]. Gene profiling studies have clearly indicated that alphavirus CNS infection is accompanied by an upregulation of multiple proinflammatory molecules including inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumour-necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), and several cytokines and chemokines which ultimately would have direct or indirect neurotoxic activities [75,77]. The innate immune and inflammatory cascade is an attempt by resident cells to eliminate the challenge imposed on the brain, clear the dead neurons, and rescues the normal functioning of the tissue. However, during the process of microglial/astroglial activation, the proinflammatory molecules may exert certain detrimental effects and neurons/neural stem cells are likely to be affected [78].

## 2.3. Non-human primate (NHP) model of CHIKV infection

NHP has been used extensively for studies of virus-induced pathology and evaluation of drugs and vaccines in a number of diseases [79–82]. Similar models have been extremely invaluable to explore the chronicle of CHIKV interactions with the host in acute as well as chronic conditions. Very early in the history of the CHIKV disease description it was found that NHP was susceptible to infection and were probably part of the natural reservoir in Africa and Asia [83,84]. In field epidemiological studies in Central African Republic (CAR), *Cercopithecus* and baboon monkeys have been used as sentinels to assess for the presence of the virus in mosquito vectors [85]. African green monkeys and macaques were also used as control of vector efficacy of different mosquito species and allowed the demonstration of the major relevance for *Aedes* species in the epidemic outbreaks. The last studies on CHIKV





and humans, CHIKV was also detected into cerebrospinal fluid sampled during acute phase. In our NHP model (adult but not elderly animals) it is likely that encephalopathy was associated with non-specific inflammation particularly in animals infected with high viral inoculums and leading to deaths as described in human newborns. Remarkably, replicating CHIKV was isolated from liver and spleen in surviving infected macaques up to 3 months post-infection arguing for the persistence of the virus in tissue sanctuaries (Fig. 1) (Labadie et al. unpublished observations).

### 3. Studies of the cellular and molecular immune response in CHIKV pathology. Why does CHIKV persist in spite of a robust innate and adaptive immune response?

Alphaviruses are the most abundant pathogens (extremely high viremia) that the host innate immune system is challenged and also when they hide into a privileged niche [88]. Alphaviruses like many other RNA viruses are known to persist in tissue sanctuaries but our understanding of the mechanisms involved is still in its infancy [27,89,90]. In most tissues, the loss of infected cells preferably by apoptosis is accompanied by enhanced cell division to replenish the cell population but this may not be achievable in tissues with little capacity for renewal, such as the CNS. The balance would be to favor non-cytolytic clearance of the virus to preserve neuronal connections even if this could promote latent viral infection [91]. A robust and rapid innate immune response needs to be mobilized to limit viral replication. In general, viral infection rapidly results in the induction of expression of the type I interferons (IFNs) IFN $\alpha$  and IFN $\beta$ , and of proinflammatory cytokines by resident cells (for comprehensive review see Ref. [92]) (Fig. 3). Type I IFNs are essential for the antiviral CHIKV response as demonstrated *in vitro* and *in vivo* [57, 60, 63, 93]. Accumulating evidence indicates that several key cytoplasmic cellular detection systems, also known as pattern recognition receptors such as (RIG-I, MDA-5), are involved in innate immune sensing of RNA viruses [94,95] to initiate the protective IFN response (Fig. 3). RIG-I and MDA-5 activate IPS-1 (IFN- $\beta$  promoter stimulator-1, also known as MAVS, CARDIF and VISA), a protein located on the surface of mitochondria. Downstream this would result in translocation of the transcription factors IRF3 and NF $\kappa$ B to promote innate immunity but this could also lead to apoptosis through the recruitment of the (TRADD, tumour-necrosis factor receptor-associated via death domain; RIP1, receptor-interacting protein 1 and FADD, Fas-associated death domain) complex linked to caspase 8 (Fig. 3) [96–99]. To what extent these PRRs are controlling CHIKV infection remains largely unknown and experiments along these lines are highly warranted. RNA viruses can also activate TLR-7 and TLR-8 localized into endosomes together with TLR3 and TLR9. This activation step is dependent on the acidification of the endosomes which is blocked by chloroquine [100,101], a drug that was tested for the treatment of CHIKV allegedly to protect from infection [102–105]. The CHIKV-induced type I interferon response seems to be protective *in vitro* only by pre-treating the cells possibly to induce the expression of restriction

factors such as interferon stimulated genes (ISGs) and oligoadenylate synthetase (OAS) [57]. OAS has recently been shown to be active against CHIKV replication in HeLa cells and its role in other cell types will need to be further established [106].

In patients and in the NHP model, the secreted IFN- $\alpha$  response was very transient and dropped to basal level in a matter of 12–24 h while the peak of viremia persisted for several days (see Fig. 1). These data seem to suggest that CHIKV may be capable of controlling somehow the IFN response, perhaps in a manner reported previously for other alphaviruses and contributing to viral persistence [107,108].

### 4. Finding the culprit to explain the rheumatologic manifestations post-CHIKV: role of an advert immune response versus cell injuries engaged by the persistence of CHIKV in tissue sanctuaries

The host response to viral infection represents a complex orchestration of divergent pathways designed to eradicate the virus and benefit the host. However, many pathways that are involved in antiviral defense can also have untoward effects on the host, including natural killer cells (NK) and cytotoxic T-lymphocyte hyper-responses, cytokine/chemokine hyper-responses, and severe apoptosis, resulting in either dysfunction or death of infected or neighboring uninfected cells. Thus, the most effective defense response needs to be sufficiently lethal to rapidly kill invading pathogens, but it is essential, at the same time, to avoid collateral damage to the host by anti-inflammatory mechanisms which remain largely ill-characterized in CHIKV disease.

There is a strong body of evidence that persistent joint manifestations are linked with persistence of alphaviruses such as BFV, MAYV, RRV, ONNV and SINV infections, the so-called arthritogenic alphaviruses but by mechanisms largely ill-characterized [15,29,109,110]. The unique observations that CHIKV also frequently involves a chronic incapacitating arthralgia/arthritis that can persist for several months raise a number of critical questions as the reactivation of virus production, the evasion of the immune antiviral response, the role of an uncontrolled inflammation and perhaps mechanisms such as cross-reactivity with self-antigens, and/or a de-regulation of autoimmune mechanisms. These aspects are of general and great interest in persistent infections and to draw attention to the consequences of virus sanctuaries driving long term illnesses as reported for several RNA viruses [111]. Virus sanctuaries in certain tissues not only complicate virus elimination but they also enable reactivation during immune suppression (for example after organ transplantation) [112].

The court room is opened and all possible culprits who could be involved in CHIKV-induced chronic arthritis whether they are host-derived or engaged by the virus should be considered.

First and foremost, the data from human studies and the NHP model argue for a rather protective role of innate and adaptive immune cells to rapidly ward off the infectious challenge rather than contributing to chronic rheumatoid arthritis. CHIKVD is highly symptomatic in newborns and elderly patients given the extremely high viral load ( $10^9$ – $10^{12}$  virus/ml of blood) and the

first line of defense is mounted by a robust and rapid activation of NK cells, plasmacytoid Dc and T cell subsets (see Fig. 1e). The effectors' functions of the specific T cells need to be tested but ongoing ELISPOT analyses clearly indicated that CD4 and CD8 were highly capable of recognizing several CHIKV antigens and producing high levels of IFN- $\gamma$  (Hoarau et al., unpublished observations). The rapid clearance of the CHIKV in patients' sera is a testimony to the competent antiviral response. Interestingly, and in contrast to other arboviruses such as DV, CHIKV does not infect/affect Dc immune function [57]. The Th1 cytokine response is essential to promote immune cell activation but may also cause tissue injuries. Surprisingly, proinflammatory TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  and IL8 were poorly expressed in the acute phase of CHIKD and in sharp contrast to other RNA viral infections [113,114]. Anti-inflammatory IL4, IL6, IL10 and IL13 were expressed in very few CHIKVD patients. IFN- $\gamma$  and IL12 are known to act synergistically to promote innate immune cell activation and both were highly elevated in the majority of CHIKVD patients at the time of referral ([113] and unpublished data). Further studies will be essential to address the kinetics of the immune responses between the 'healthy, recovered' and the 'chronic' CHIKVD patients several years after the epidemic for instance in la Réunion.

Second, the persistence of CHIKV could be due to a failure to detect and/or neutralize the virus which can escape recognition by innate immune cells such as Dc, NK and CD8 cells. Indeed, the reported paucity of CD8 T cells in infected human muscle biopsies could explain CHIKV persistence associated with myositis [40]. The phenomenon of apparent deletion of virus-specific cytotoxic T cells as a result of clonal exhaustion has already been described and it remains to be ascertained whether this is also the case in CHIKV chronic disease [115]. In CHIKV+ biopsies (synovial tissue and fluid), we found gene expression of IFN- $\alpha$ , IL10 but not of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) (Hoarau et al., unpublished observations). These findings are in agreement with a canonical chronic immune response reminiscent of but distinct from rheumatoid arthritis (see Fig. 4). The absence of neutrophils in the synovial fluid and the paucity of proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL1 $\beta$  are important components to consider while selecting the best treatment regime for chronic CHIKVD.

Finally and significantly, it is plausible that CHIKV in immunoprivileged niches (called here sanctuaries) contributes directly to synovial tissue damage. Ross River virus (RRV) was shown to persist in synovial macrophages and it is interesting that this behavior can be extrapolated to CHIKV (for review, see Ref. [28]) and, in general, to many RNA viruses. There is an emerging paradigm that chronic infection of macrophages by some viruses reprograms their differentiation toward a so-called 'alternative phenotype' different from M1–M2 and contributing to tissue fibrosis [116,117]. It will be interesting to ascertain whether this is also true for CHIKV. We found that CHIKV has profound cytopathic effects and can induce apoptosis *in vitro* and in synovial tissues as assessed by the presence of numerous cleaved PARP-positive cells while high expression of MMP2 may contribute to chronic tissue lesions. It remains to be tested whether phagocytosis of apoptotic cells

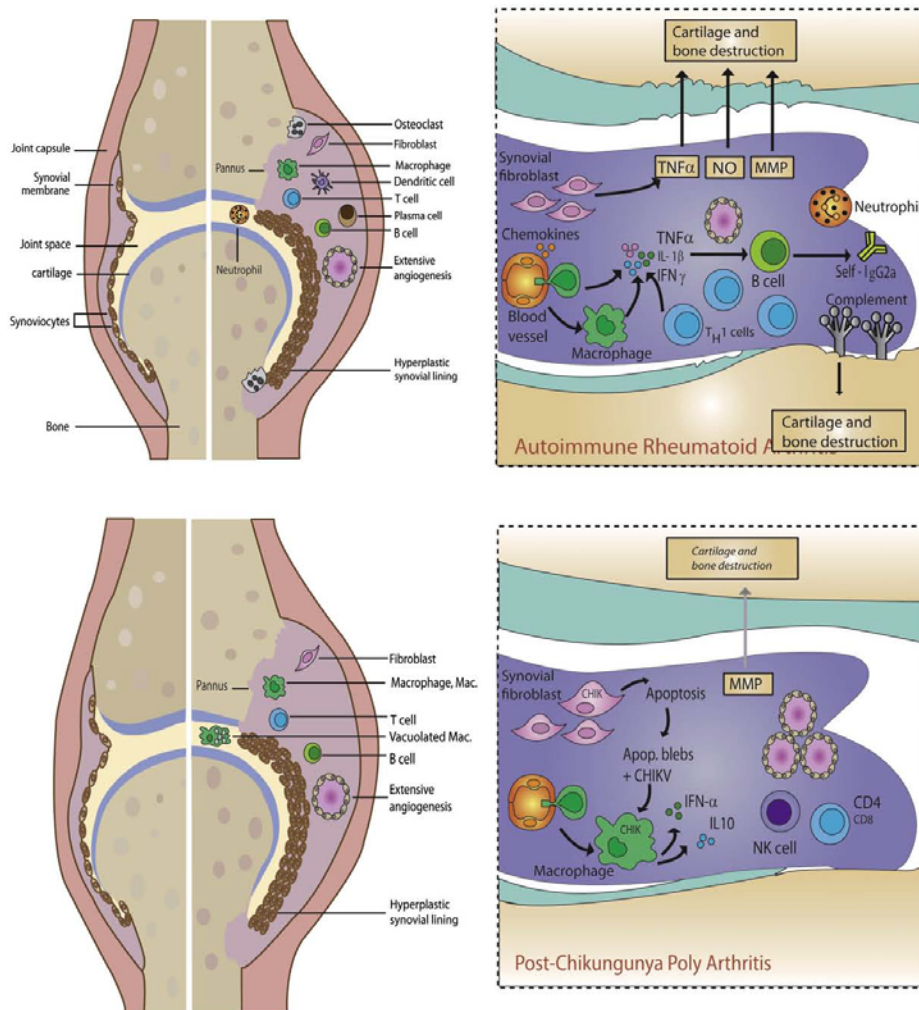
(containing or not remnants of CHIKV) by the neighboring macrophages may permit viral persistence in a non-phlogistic environment and whether novel strategies could be identified to curtail viral persistence in the macrophage reservoir.

##### **5. Conclusion: exploring novel antiviral therapies to fight against CHIKV infection**

A new and comprehensive description of CHIKV-induced arthritis and pathology has been gained from recent outbreaks in countries with efficient clinical facilities and including MRI scanning. Severe cases including deaths, chronic arthralgia and arthritis are clear testimonies of the severity of the disease particularly in elderly patients with other clinical cardiovascular or diabetes histories. Further investigations are required to define the possible etiologic role of alphaviruses in acute and chronic rheumatic diseases in general. The plausible role of mutated forms of CHIKV with high infection fitness needs to be more firmly addressed and making use of the several mouse and NHP models reproducing the disease and cDNA CHIKV infectious clones [6]. From a clinical standpoint it is critical that physicians are educated in recognizing acute cases and that diagnostic tool is available to perform discriminative screenings from other tropical diseases. Interestingly, several cases of CHIKV infection have been associated with coinfection (mainly DV and possibly West Nile) and which may explain some of the severe cases in recent outbreaks. Again, this concept will need to be tested in animal models. Further clinical and fundamental researches are warranted to have a better understanding of CHIKV-induced pathology and the long-term sequelae. The identification of biomarkers of persistent CHIKV infection needs to be sought although high levels of specific IgM seem to corroborate with chronic arthritis. Arboviruses have long been known to persist in infected tissues and driving chronic pathologies [23]. Hence, a better understanding of these persistent infections should translate into possible therapeutics such as antiviral drugs to limit long-term sequelae. This could be achieved by poly I:C (agonist of RIG-I and MDA-5) or TLR agonists to promote activation and innate antiviral response initiated by macrophages and fibroblasts. On the basis of unique PRR signaling pathways, the design of agonists allowing manipulation of the relative levels of IFN- $\alpha/\beta$  versus proinflammatory signals may be particularly useful in activating antiviral mechanisms, while minimizing pathology attributed to excessive inflammation response. PRR signaling discoveries are also relevant to understand chronic inflammation, as many PRR pathways can contribute to autoimmunity and inflammatory disease if they inappropriately sense host molecules. Finally, the viral proteins themselves, or derivatives of them, may have therapeutic uses in boosting or suppressing inappropriate PRR signaling in chronic arthritis.

The restriction of CHIKV diseases is undoubtedly through prevention measures such as vaccination. A live, attenuated vaccine was originally advanced through phase II clinical trials, but its development was halted because of its poor tolerance and certainly lack of demand. Ongoing studies will





**Fig. 4. CHIKV-induced chronic arthritis (bottom) is reminiscent of but distinguishable from the canonical autoimmune rheumatoid arthritis (RA) (top cartoon).** Top left, normal and RA joints are illustrated. In detail, RA has strong innate and adaptive immune components (acutely activated neutrophils, CD4 and B/plasma cells) to drive the autoimmune response and initiating complement activation through the classical pathway (C1q) to promote cytotoxic tissue injuries. Robust expression of a plethora of cytokines and chemokines will perpetuate the tissue injury and notably through the release of TNF- $\alpha$ , nitric oxide (NO) and matrix metalloprotease (MMP) contributing to major cartilage and bone destructions. The proliferation of synovial fibroblasts is assisted by a major angiogenesis. The majority of patients with RA will have high levels of anti-CCP and RF and methotrexate treatment will be used to control the proliferation of autoimmune cells and hyperplasia of fibroblasts. Bottom left and cartoon illustrate the paradigm that is emerging in post-chikungunya arthritis. Neutrophils, B and plasma cells are not involved and few T immune cells are present in the affected joints. Interestingly, CHIKV seems to persist at low levels in fibroblasts and macrophages while the inflammatory response is polarized with the production of IFN- $\alpha$  (marker of viral persistence) and IL10. Other inflammatory cytokines are absent from the joint that shows signs of tissue injuries (tenosynovitis and rare but progressive synovitis). The methotrexate treatment is also very effective and possibly targeting fibroblast hyperplasia and angiogenesis. This paradigm is now amenable to further investigation using the NHP model reproducing the chronic CHIKV infection. CHIKV is also found in large vacuolated macrophages present in synovial fluid. Post-CHIKV arthritis does not correlate with high levels of anti-CCP and RF in patients and, hence, does not have a classic autoimmune component.

help to delineate the immunogenicity of the different CHIKV proteins and to design a safer and more potent vaccination regime to protect from future outbreaks and life-threatening infection.

#### Acknowledgements

The authors' work is funded by the University of la Réunion, French Ministry of Health (PRHC 2006–2009), French

Overseas Ministry (MOM), National Agency for Research (ANR), Research Centre on Emerging Infectious Disease (CRVOI), the Regional council of la Réunion and Europe. PG is a fellow of INSERM 'contrat d'interface' with Pr. P Debre and Pr. B Autran (INSERM U945, Salpêtrière, Paris). The authors thank Mrs. Claudine Vitry for help in editorial's management of the paper and figure.

## References

- [1] J.H. Strauss, E.G. Strauss, The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* 58 (1994) 491–562.
- [2] C. Chevillon, L. Briant, F. Renaud, C. Devaux, The chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. *Trends Microbiol.* 16 (2008) 80–88.
- [3] I. Schuffenecker, I. Iteman, A. Michault, S. Murri, L. Frangeul, M.C. Vaney, R. Lavenir, N. Pardigon, J.M. Reynes, F. Pettinelli, L. Biscornet, L. Diancourt, S. Michel, S. Duquerroy, G. Guigon, M.P. Frenkiel, A.C. Brehin, N. Cubito, P. Despres, F. Kunst, F.A. Rey, H. Zeller, S. Brisse, Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* 3 (2006) e263.
- [4] K.A. Tssetsarkin, D.L. Vanlandingham, C.E. McGee, S. Higgs, A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 3 (2007) e201.
- [5] M. Vashishtha, T. Phalen, M.T. Marquardt, J.S. Ryu, A.C. Ng, M. Kielian, A single point mutation controls the cholesterol dependence of Semliki Forest virus entry and exit. *J. Cell Biol.* 140 (1998) 91–99.
- [6] A.M. Powers, C.H. Logue, Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J. Gen. Virol.* 88 (2007) 2363–2377.
- [7] A. Economopoulou, M. Dominguez, B. Helynick, D. Sissoko, O. Wichmann, P. Quenel, P. Germonneau, I. Quatresous, Atypical chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Reunion. *Epidemiol. Infect.* 137 (2009) 534–541.
- [8] P. Gerardin, G. Barau, A. Michault, M. Bintner, H. Randrianaivo, G. Choker, Y. Lenglet, Y. Touret, A. Bouveret, P. Grivard, K. Le Roux, S. Blanc, I. Schuffenecker, T. Couderc, F. Arenzana-Seisdedos, M. Lecuit, P.Y. Robillard, Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Reunion. *PLoS Med.* 5 (2008) e60.
- [9] G. Pialoux, B.A. Gauzere, S. Jaureguierry, M. Strobel, Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect. Dis.* 7 (2007) 319–327.
- [10] D. Ramful, M. Carbonnier, M. Pasquet, B. Bouhmani, J. Ghazouani, T. Noormahomed, G. Beullier, T. Attali, S. Samperiz, A. Fourmaintraux, J.L. Alessandri, Mother-to-child transmission of chikungunya virus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 26 (2007) 811–815.
- [11] S. Robin, D. Ramful, F. Le Seach, M.C. Jaffar-Bandjee, G. Rigou, J.L. Alessandri, Neurologic manifestations of pediatric chikungunya infection. *J. Child Neurol.* 23 (2008) 1028–1035.
- [12] S. Robin, D. Ramful, J. Zettor, L. Benhamou, M.C. Jaffar-Bandjee, J.P. Riviere, J. Marichy, K. Ezzedine, J.L. Alessandri, Severe bullous skin lesions associated with chikungunya virus infection in small infants. *Eur. J. Pediatr.* (2009).
- [13] J. Lemant, V. Boisson, A. Winer, L. Thibault, H. Andre, F. Tixier, M. Lemercier, E. Antok, M.P. Cresta, P. Grivard, M. Besnard, O. Rollet, F. Favier, M. Huerre, J.L. Campinos, A. Michault, Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the Reunion Island outbreak in 2005–2006. *Crit. Care Med.* 36 (2008) 2536–2541.
- [14] D. Mavalankar, P. Shastri, P. Raman, Chikungunya epidemic in India: a major public-health disaster. *Lancet Infect. Dis.* 7 (2007) 306–307.
- [15] R.B. Tesh, Arthritides caused by mosquito-borne viruses. *Annu. Rev. Med.* 33 (1982) 31–40.
- [16] G. Borgherini, P. Poubeau, F. Staikowsky, M. Lory, N. Le Moullec, J.P. Becquart, C. Wengling, A. Michault, F. Paganin, Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. *Clin. Infect. Dis.* 44 (2007) 1401–1407.
- [17] V. Lakshmi, M. Neeraja, M.V. Subbalaxmi, M.M. Parida, P.K. Dash, S.R. Santhosh, P.V. Rao, Clinical features and molecular diagnosis of chikungunya fever from South India. *Clin. Infect. Dis.* 46 (2008) 1436–1442.
- [18] S. Kurkela, T. Manni, J. Myllynen, A. Vaheri, O. Vapalahti, Clinical and laboratory manifestations of Sindbis virus infection: prospective study, Finland, 2002–2003. *J. Infect. Dis.* 191 (2005) 1820–1829.
- [19] P. Grivard, K. Le Roux, P. Laurent, A. Fianu, J. Perrau, J. Gigan, G. Hoarau, N. Grondin, F. Staikowsky, F. Favier, A. Michault, Molecular and serological diagnosis of chikungunya virus infection. *Pathol. Biol. (Paris)* 55 (2007) 490–494.
- [20] P. Laurent, K. Le Roux, P. Grivard, G. Bertil, F. Naze, M. Picard, F. Staikowsky, G. Barau, I. Schuffenecker, A. Michault, Development of a sensitive real-time reverse transcriptase PCR assay with an internal control to detect and quantify chikungunya virus. *Clin. Chem.* 53 (2007) 1408–1414.
- [21] C.H. Calisher, A.O. el-Kafrawi, M.I. Al-Deen Mahmud, A.P. Travassos da Rosa, C.R. Bartz, M. Brunner-Korvenkontio, S. Haksosusodo, W. Suharyono, Complex-specific immunoglobulin M antibody patterns in humans infected with alphaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 23 (1986) 155–159.
- [22] B. Niklasson, A. Espmark, J. Lundstrom, Occurrence of arthralgia and specific IgM antibodies three to four years after Ockelbo disease. *J. Infect. Dis.* 157 (1988) 832–835.
- [23] G. Kuno, Persistence of arboviruses and antiviral antibodies in vertebrate hosts: its occurrence and impacts. *Rev. Med. Virol.* 11 (2001) 165–190.
- [24] M. Panning, K. Grywna, M. van Esbroeck, P. Emmerich, C. Drosten, Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* 14 (2008) 416–422.
- [25] M.C. Robinson, An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–53. I. Clinical features. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 49 (1955) 28–32.
- [26] D. Harley, A. Sleight, S. Ritchie, Ross River virus transmission, infection, and disease: a cross-disciplinary review. *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (2001) 909–932 (table of contents).
- [27] B. Levine, J.M. Hardwick, D.E. Griffin, Persistence of alphaviruses in vertebrate hosts. *Trends Microbiol.* 2 (1994) 25–28.
- [28] A. Suhrbier, M. La Linn, Clinical and pathologic aspects of arthritis due to Ross River virus and other alphaviruses. *Curr. Opin. Rheumatol.* 16 (2004) 374–379.
- [29] A. Toivanen, Alphaviruses: an emerging cause of arthritis? *Curr. Opin. Rheumatol.* 20 (2008) 486–490.
- [30] B. Niklasson, A. Espmark, Ockelbo disease: arthralgia 3–4 years after infection with a Sindbis virus related agent. *Lancet* 1 (1986) 1039–1040.
- [31] M. Laine, R. Luukkainen, J. Jalava, J. Ilonen, P. Kuusisto, A. Toivanen, Prolonged arthritis associated with sindbis-related (Pogosta) virus infection. *Rheumatology (Oxford)* 39 (2000) 1272–1274.
- [32] S.W. Brighton, I.W. Simson, A destructive arthropathy following chikungunya virus arthritis—a possible association. *Clin. Rheumatol.* 3 (1984) 253–258.
- [33] E.D. Fourie, J.G. Morrison, Rheumatoid arthritic syndrome after chikungunya fever. *S. Afr. Med. J.* 56 (1979) 130–132.
- [34] F. Simon, P. Parola, M. Grandadam, S. Fourcade, M. Oliver, P. Brouqui, P. Hance, P. Kraemer, A. Ali Mohamed, X. de Lamballerie, R. Charrel, H. Tolou, Chikungunya infection: an emerging rheumatism among travelers returned from Indian Ocean islands. Report of 47 cases. *Medicine (Baltimore)* 86 (2007) 123–137.
- [35] D. Sissoko, D. Malvy, K. Ezzedine, P. Renault, F. Moschetti, M. Ledrans, V. Pierre, Post-epidemic chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3 (2009) e389.
- [36] G. Borgherini, P. Poubeau, A. Jossaume, A. Goux, L. Cotte, A. Michault, C. Arvin-Berod, F. Paganin, Persistent arthralgia associated with chikungunya virus: a study of 88 adult patients on Reunion Island. *Clin. Infect. Dis.* 47 (2008) 469–475.
- [37] A. Chopra, V. Anuradha, V. Lagoo-Joshi, V. Kanjir, S. Salvi, M. Saluja, Chikungunya virus aches and pains: an emerging challenge. *Arthritis Rheum.* 58 (2008) 2921–2922.

- [38] B.V. Tandale, P.S. Sathe, V.A. Arankalle, R.S. Wadia, R. Kulkarni, S.V. Shah, S.K. Shah, J.K. Sheth, A.B. Sudeep, A.S. Tripathy, A.C. Mishra, Systemic involvements and fatalities during chikungunya epidemic in India, 2006. *J. Clin. Virol.* (2009).
- [39] T. Sankari, S.L. Hoti, V. Govindaraj, P.K. Das, Chikungunya and respiratory viral infections. *Lancet Infect. Dis.* 8 (2008) 3–4.
- [40] S. Ozden, M. Huerre, J.P. Riviere, L.L. Coffey, P.V. Afonso, V. Mouly, J. de Monredon, J.C. Roger, M. El Amrani, J.L. Yvin, M.C. Jaffar, M.P. Frenkiel, M. Sourisseau, O. Schwartz, G. Butler-Browne, P. Despres, A. Gessain, P.E. Ceccaldi, Human muscle satellite cells as targets of chikungunya virus infection. *PLoS One* 2 (2007) e527.
- [41] W.M. Hammon, A. Rudnick, G.E. Sather, Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science* 131 (1960) 1102–1103.
- [42] C. Chastel, Human infections in Cambodia by the chikungunya virus or an apparently closely related agent. II. Experimental pathological anatomy. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 56 (1963) 915–924.
- [43] S.N. Chatterjee, S.K. Chakravarti, A.C. Mitra, J.K. Sarkar, Virological investigation of cases with neurological complications during the outbreak of haemorrhagic fever in Calcutta. *J. Indian Med. Assoc.* 45 (1965) 314–316.
- [44] M. Jadhav, M. Nambodripad, R.H. Carman, D.E. Carey, R.M. Myers, Chikungunya disease in infants and children in Vellore: a report of clinical and haematological features of virologically proved cases. *Indian J. Med. Res.* 53 (1965) 764–776.
- [45] K.V. Thiruvengadam, V. Kalyanasundaram, J. Rajgopal, Clinical and pathological studies on chikungunya fever in Madras city. *Indian J. Med. Res.* 53 (1965) 729–744.
- [46] D.E. Carey, R.M. Myers, C.M. DeRanitz, M. Jadhav, R. Reuben, The 1964 chikungunya epidemic at Vellore, South India, including observations on concurrent dengue. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 63 (1969) 434–445.
- [47] S. Nimmannitya, S.B. Halstead, S.N. Cohen, M.R. Margiotta, Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962–1964. I. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18 (1969) 954–971.
- [48] P. Lewthwaite, R. Vasanthapuram, J.C. Osborne, A. Begum, J.L. Plank, M.V. Shankar, R. Hewson, A. Desai, N.J. Beeching, R. Ravikumar, T. Solomon, Chikungunya virus and central nervous system infections in children, India. *Emerg. Infect. Dis.* 15 (2009) 329–331.
- [49] G. Lebrun, K. Chadda, A.H. Reboux, O. Martinet, B.A. Gauzere, Guillain–Barre syndrome after chikungunya infection. *Emerg. Infect. Dis.* 15 (2009) 495–496.
- [50] A.C. Wielanek, J.D. Monredon, M.E. Amrani, J.C. Roger, J.P. Serveaux, Guillain–Barre syndrome complicating a Chikungunya virus infection. *Neurology* 69 (2007) 2105–2107.
- [51] K. Ganesan, A. Diwan, S.K. Shankar, S.B. Desai, G.S. Sainani, S.M. Katak, Chikungunya encephalomyeloradiculitis: report of 2 cases with neuroimaging and 1 case with autopsy findings. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 29 (2008) 1636–1637.
- [52] N.H. Chandak, R.S. Kashyap, D. Kabra, P. Karandikar, S.S. Saha, S.H. Morey, H.J. Purohit, G.M. Taori, H.F. Dagainawala, Neurological complications of chikungunya virus infection. *Neurol. India* 57 (2009) 177–180.
- [53] P. Tournebise, C. Charlin, M. Lagrange, Neurological manifestations in chikungunya: about 23 cases collected in Reunion Island. *Rev. Neurol. (Paris)* 165 (2009) 48–51.
- [54] R.K. Nouranifar, M. Ali, J. Nath, The earliest manifestation of focal encephalitis on diffusion-weighted MRI. *Clin. Imaging* 27 (2003) 316–320.
- [55] N. Hahon, W.D. Zimmerman, Chikungunya virus infection of cell monolayers by cell-to-cell and extracellular transmission. *Appl. Microbiol.* 19 (1970) 389–391.
- [56] B. Simizu, K. Yamamoto, K. Hashimoto, T. Ogata, Structural proteins of chikungunya virus. *J. Virol.* 51 (1984) 254–258.
- [57] M. Sourisseau, C. Schilte, N. Casartelli, C. Trouillet, F. Guivel-Benhassine, D. Rudnicka, N. Sol-Foulon, K. Le Roux, M.C. Prevost, H. Fsihi, M.P. Frenkiel, F. Blanchet, P.V. Afonso, P.E. Ceccaldi, S. Ozden, A. Gessain, I. Schuffenecker, B. Verhasselt, A. Zamborini, A. Saib, F.A. Rey, F. Arenzana-Seisdedos, P. Despres, A. Michault, M.L. Albert, O. Schwartz, Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog.* 3 (2007) e89.
- [58] M. Solignat, B. Gay, S. Higgs, L. Briant, C. Devaux, Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. *Virology* (2009).
- [59] M.A. Chernesky, R.P. Larke, Contrasting effects of rabbit and human platelets on chikungunya virus infectivity. *Can. J. Microbiol.* 23 (1977) 1237–1244.
- [60] T. Couderc, F. Chretien, C. Schilte, O. Disson, M. Brigitte, F. Guivel-Benhassine, Y. Touret, G. Barau, N. Cayet, I. Schuffenecker, P. Despres, F. Arenzana-Seisdedos, A. Michault, M.L. Albert, M. Lecuit, A mouse model for chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathog.* 4 (2008) e29.
- [61] C.R. Rinaldo Jr., J.C. Overall Jr., L.A. Glasgow, Viral replication and interferon production in fetal and adult ovine leukocytes and spleen cells. *Infect. Immun.* 12 (1975) 1070–1077.
- [62] R.S. Shabman, T.E. Morrison, C. Moore, L. White, M.S. Suthar, L. Hueston, N. Rulli, B. Lidbury, J.P. Ting, S. Mahalingam, M.T. Heise, Differential induction of type I interferon responses in myeloid dendritic cells by mosquito and mammalian-cell-derived alphaviruses. *J. Virol.* 81 (2007) 237–247.
- [63] C.L. Gardner, C.W. Burke, M.Z. Tesfay, P.J. Glass, W.B. Klimstra, K. D. Ryman, Eastern and Venezuelan equine encephalitis viruses differ in their ability to infect dendritic cells and macrophages: impact of altered cell tropism on pathogenesis. *J. Virol.* 82 (2008) 10634–10646.
- [64] S.A. Ziegler, L. Lu, A.P. da Rosa, S.Y. Xiao, R.B. Tesh, An animal model for studying the pathogenesis of chikungunya virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79 (2008) 133–139.
- [65] E. Wang, E. Volkova, A.P. Adams, N. Forrester, S.Y. Xiao, I. Frolov, S.C. Weaver, Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya. *Vaccine* 26 (2008) 5030–5039.
- [66] M. Hauwel, E. Furon, C. Canova, M. Griffiths, J. Neal, P. Gasque, Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, “protective” glial stem cells and stromal ependymal cells. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 48 (2005) 220–233.
- [67] M. Hauwel, E. Furon, P. Gasque, Molecular and cellular insights into the coxsackie-adenovirus receptor: role in cellular interactions in the stem cell niche. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 48 (2005) 265–272.
- [68] A.C. Jackson, T.R. Moench, D.E. Griffin, R.T. Johnson, The pathogenesis of spinal cord involvement in the encephalomyelitis of mice caused by neuroadapted Sindbis virus infection. *Lab. Invest.* 56 (1987) 418–423.
- [69] C.A. Mims, F.A. Murphy, W.P. Taylor, I.D. Marshall, Pathogenesis of Ross River virus infection in mice. I. Ependymal infection, cortical thinning, and hydrocephalus. *J. Infect. Dis.* 127 (1973) 121–128.
- [70] R.L. Deresiewicz, S.J. Thaler, L. Hsu, A.A. Zamani, Clinical and neuroradiographic manifestations of eastern equine encephalitis. *N. Engl. J. Med.* 336 (1997) 1867–1874.
- [71] J.K. Fazakerley, C.L. Cotterill, G. Lee, A. Graham, Virus tropism, distribution, persistence and pathology in the corpus callosum of the Semliki Forest virus-infected mouse brain: a novel system to study virus–oligodendrocyte interactions. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 32 (2006) 397–409.
- [72] S. Amor, M.F. Scallan, M.M. Morris, H. Dyson, J.K. Fazakerley, Role of immune responses in protection and pathogenesis during Semliki Forest virus encephalitis. *J. Gen. Virol.* 77 (Pt 2) (1996) 281–291.
- [73] J.F. Rowell, D.E. Griffin, Contribution of T cells to mortality in neurovirulent Sindbis virus encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 127 (2002) 106–114.
- [74] B.A. Schoneboom, K.M. Catlin, A.M. Marty, F.B. Grieder, Inflammation is a component of neurodegeneration in response to Venezuelan equine encephalitis virus infection in mice. *J. Neuroimmunol.* 109 (2000) 132–146.
- [75] A. Sharma, B. Bhattacharya, R.K. Puri, R.K. Maheshwari, Venezuelan equine encephalitis virus infection causes modulation of inflammatory and immune response genes in mouse brain. *BMC Genomics* 9 (2008) 289.

- [76] P. Vogel, W.M. Kell, D.L. Fritz, M.D. Parker, R.J. Schoepp, Early events in the pathogenesis of eastern equine encephalitis virus in mice. *Am. J. Pathol.* 166 (2005) 159–171.
- [77] L. Labrada, X.H. Liang, W. Zheng, C. Johnston, B. Levine, Age-dependent resistance to lethal alphavirus encephalitis in mice: analysis of gene expression in the central nervous system and identification of a novel interferon-inducible protective gene, mouse ISG12. *J. Virol.* 76 (2002) 11688–11703.
- [78] L. Poluektova, V. Meyer, L. Walters, X. Paez, H.E. Gendelman, Macrophage-induced inflammation affects hippocampal plasticity and neuronal development in a murine model of HIV-1 encephalitis. *Glia* 52 (2005) 344–353.
- [79] D.S. Reed, T. Larsen, L.J. Sullivan, C.M. Lind, M.G. Lackemeyer, W.D. Pratt, M.D. Parker, Aerosol exposure to western equine encephalitis virus causes fever and encephalitis in cynomolgus macaques. *J. Infect. Dis.* 192 (2005) 1173–1182.
- [80] B. Verrier, R. Le Grand, Y. Ataman-Onal, C. Terrat, C. Guillon, P.Y. Durand, B. Hurtrel, A.M. Aubertin, G. Sutter, V. Erle, M. Girard, Evaluation in rhesus macaques of Tat and rev-targeted immunization as a preventive vaccine against mucosal challenge with SHIV-BX08. *DNA Cell Biol.* 21 (2002) 653–658.
- [81] M.P. Vierboom, M. Jonker, P.P. Tak, B.A. t Hart, Preclinical models of arthritic disease in non-human primates. *Drug Discov. Today* 12 (2007) 327–335.
- [82] G.P. Walsh, E.V. Tan, E.C. dela Cruz, R.M. Abalos, L.G. Villahermosa, L.J. Young, R.V. Cellona, J.B. Nazareno, M.A. Horwitz, The Philippine cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat. Med.* 2 (1996) 430–436.
- [83] A.W. McCrae, B.E. Henderson, B.G. Kirya, S.D. Sempala, Chikungunya virus in the Entebbe area of Uganda: isolations and epidemiology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65 (1971) 152–168.
- [84] N.J. Marchette, A. Rudnick, R. Garcia, D.W. MacVean, Alphaviruses in Peninsular Malaysia: I. Virus isolations and animal serology. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 9 (1978) 317–329.
- [85] J.F. Saluzzo, J.P. Gonzalez, J.P. Herve, A.J. Georges, Serological survey for the prevalence of certain arboviruses in the human population of the south-east area of Central African Republic (author's transl). *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 74 (1981) 490–499.
- [86] M.J. Turell, F.J. Malinoski, Limited potential for mosquito transmission of a live, attenuated chikungunya virus vaccine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47 (1992) 98–103.
- [87] L.N. Binn, V.R. Harrison, R. Randall, Patterns of viremia and antibody observed in rhesus monkeys inoculated with chikungunya and other serologically related group A arboviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 16 (1967) 782–785.
- [88] D.E. Griffin, Immune responses to RNA-virus infections of the CNS. *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 493–502.
- [89] B. Levine, D.E. Griffin, Persistence of viral RNA in mouse brains after recovery from acute alphavirus encephalitis. *J. Virol.* 66 (1992) 6429–6435.
- [90] S.W. Precious, H.E. Webb, E.T. Bowen, Isolation and persistence of chikungunya virus in cultures of mouse brain cells. *J. Gen. Virol.* 23 (1974) 271–279.
- [91] G.K. Binder, D.E. Griffin, Interferon-gamma-mediated site-specific clearance of alphavirus from CNS neurons. *Science* 293 (2001) 303–306.
- [92] S. Paul, C. Ricour, C. Sommereyns, F. Sorgeloos, T. Michiels, Type I interferon response in the central nervous system. *Biochimie* 89 (2007) 770–778.
- [93] S. Briolant, D. Garin, N. Scaramozzino, A. Jouan, J.M. Crance, In vitro inhibition of chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon-alpha and ribavirin combination. *Antiviral. Res.* 61 (2004) 111–117.
- [94] O. Takeuchi, S. Akira, Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol. Rev.* 220 (2007) 214–224.
- [95] A.G. Bowie, L. Unterholzner, Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 911–922.
- [96] N.S. Wilson, V. Dixit, A. Ashkenazi, Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat. Immunol.* 10 (2009) 348–355.
- [97] K. Takahashi, T. Kawai, H. Kumar, S. Sato, S. Yonehara, S. Akira, Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *J. Immunol.* 176 (2006) 4520–4524.
- [98] M.C. Michallet, E. Meylan, M.A. Ermolaeva, J. Vazquez, M. Rebsamen, J. Curran, H. Poeck, M. Bscheider, G. Hartmann, M. Konig, U. Kalinke, M. Pasparakis, J. Tschopp, TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. *Immunity* 28 (2008) 651–661.
- [99] S. Balachandran, P.C. Roberts, T. Kipperman, K.N. Bhalla, R.W. Compans, D.R. Archer, G.N. Barber, Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. *J. Virol.* 74 (2000) 1513–1523.
- [100] J. Lund, A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov, A. Iwasaki, Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 198 (2003) 513–520.
- [101] J.M. Lund, L. Alexopoulou, A. Sato, M. Karow, N.C. Adams, N.W. Gale, A. Iwasaki, R.A. Flavell, Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101 (2004) 5598–5603.
- [102] R.K. Maheshwari, V. Srikantan, D. Bhartiya, Chloroquine enhances replication of Semliki Forest virus and encephalomyocarditis virus in mice. *J. Virol.* 65 (1991) 992–995.
- [103] K. Coombs, E. Mann, J. Edwards, D.T. Brown, Effects of chloroquine and cytochalasin B on the infection of cells by Sindbis virus and vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 37 (1981) 1060–1065.
- [104] P. Seth, H. Mani, A.K. Singh, K.K. Banaudha, S. Madhavan, G.S. Sidhu, J.P. Gaddipati, S.N. Vogel, R.K. Maheshwari, Acceleration of viral replication and up-regulation of cytokine levels by antimalarials: implications in malaria-endemic areas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61 (1999) 180–186.
- [105] X. de Lamballerie, L. Ninove, R.N. Charrel, Antiviral treatment of chikungunya virus infection. *Infect. Disord. Drug Targets* 9 (2009) 101–104.
- [106] A.C. Brehin, I. Casademont, M.P. Frenkiel, C. Julier, A. Sakuntabhai, P. Despres, The large form of human 2',5'-Oligoadenylate Synthetase (OAS3) exerts antiviral effect against chikungunya virus. *Virology* 384 (2009) 216–222.
- [107] L. Breakwell, P. Dosenovic, G.B. Karlsson Hedestam, M. D'Amato, P. Liljestrom, J. Fazakerley, G.M. McInerney, Semliki Forest virus nonstructural protein 2 is involved in suppression of the type I interferon response. *J. Virol.* 81 (2007) 8677–8684.
- [108] J.D. Simmons, L.J. White, T.E. Morrison, S.A. Montgomery, A.C. Whitmore, R.E. Johnston, M.T. Heise, Venezuelan equine encephalitis virus disrupts STAT1 signaling by distinct mechanisms independent of host shutoff. *J. Virol.* (2009).
- [109] N.E. Rulli, J. Melton, A. Wilmes, G. Ewart, S. Mahalingam, The molecular and cellular aspects of arthritis due to alphavirus infections: lesson learned from Ross River virus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1102 (2007) 96–108.
- [110] K.D. Ryman, W.B. Klimstra, Host responses to alphavirus infection. *Immunol. Rev.* 225 (2008) 27–45.
- [111] M. Recher, K.S. Lang, A. Navarini, L. Hanziker, P.A. Lang, K. Fink, S. Freigang, P. Georgiev, L. Hangartner, R. Zellweger, A. Bergthaler, A.N. Hegazy, B. Eschli, A. Theodorides, L.T. Jeker, D. Merkler, B. Odermatt, M. Hersberger, H. Hengartner, R.M. Zinkernagel, Extraplymphatic virus sanctuaries as a consequence of potent T-cell activation. *Nat. Med.* 13 (2007) 1316–1323.
- [112] M.R. Hilleman, Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101 (Suppl. 2) (2004) 14560–14566.
- [113] L.F. Ng, A. Chow, Y.J. Sun, D.J. Kwok, P.L. Lim, F. Dimatac, L.C. Ng, E.E. Ooi, K.H. Choo, Z. Her, P. Kourilsky, Y.S. Leo, IL-1beta, IL-6, and RANTES as biomarkers of chikungunya severity. *PLoS One* 4 (2009) e4261.
- [114] A. Cossarizza, C. Ortolani, C. Mussini, V. Borghi, G. Guaraldi, N. Mongiardò, E. Bellesia, M.G. Franceschini, B. De Rienzo, C. Franceschi, Massive activation of immune cells with an intact T cell repertoire in



- acute human immunodeficiency virus syndrome. *J. Infect. Dis.* 172 (1995) 105–112.
- [115] A. Gallimore, H. Hengartner, R. Zinkernagel. Hierarchies of antigen-specific cytotoxic T-cell responses. *Immunol. Rev.* 164 (1998) 29–36.
- [116] B. Gangadharan, M.A. Hoeve, J.E. Allen, B. Ebrahimi, S.M. Rhind, B.M. Dutia, A.A. Nash, Murine gammaherpesvirus-induced fibrosis is associated with the development of alternatively activated macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 84 (2008) 50–58.
- [117] A.L. Mora, E. Torres-Gonzalez, M. Rojas, C. Corredor, J. Ritzenthaler, J. Xu, J. Roman, K. Brigham, A. Stecenko, Activation of alveolar macrophages via the alternative pathway in herpesvirus-induced lung fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 35 (2006) 466–473.

***Article 2 : Emergence and clinical insights into the pathology of Chikungunya virus infection.***

Revue sur invitation, je suis le premier auteur de cet article de synthèse publié par Expert Reviews on anti-infectious therapies (ERAIT) en 2010.

L'objet de cet article est de souligner certaines particularités épidémiologiques, cliniques, virologiques et immunologiques suite à l'épidémie réunionnaise, avant de mentionner les traitements utilisés durant ces dernières épidémies, ainsi que les nouvelles mesures de prévention pour le contrôle du moustique et les futures stratégies vaccinales.

1 – Concernant le virus et son vecteur le moustique, nous soulignons la dynamique évolutionnaire du CHIKV qui s'est adapté à *Ae albopictus*, ainsi que la grande capacité d'adaptation d'*Ae albopictus*, qui s'est répandu de façon mondiale non seulement dans les zones tropicales et sub-tropicales, mais aussi dans les zones tempérées, faisant ainsi craindre un risque d'épidémie dans ces zones indemnes d'alphavirus jusqu'à présent. Cette adaptation du CHIKV à *Ae albopictus* s'est révélée entre autre liée à l'acquisition de la mutation A226V de la protéine E1 (Schuffenecker, Iteman et al. 2006), et qui n'est retrouvée que chez *Ae albopictus*. Cette mutation améliore l'adaptation du virus au moustique, augmente son infectivité chez le moustique, et sa reproduction dans les organes secondaires. Ces différentes raisons évoquées, associées à l'absence d'immunité de la population, ainsi qu'à l'augmentation de l'urbanisation (Tsetsarkin, Vanlandingham et al. 2007; Vazeille, Moutailler et al. 2007), expliqueraient l'ampleur de l'épidémie réunionnaise.

## 2 – CHIKV et grossesse :

La transmission materno-néonatale a été rapportée pour la première fois durant l'épidémie réunionnaise (Robillard, Boumahni et al. 2006 ; Ramful, Carbonnier et al. 2007). Cette contamination se produit lors de l'infection maternelle en péripartum. Ces infections néo-natales ont nécessité pour la majorité d'entre elles l'hospitalisation du nouveau-né et se sont compliquées d'encéphalopathie, de troubles hémorragiques et de désordres hémodynamiques, voire de décès. L'imagerie médicale (IRM) a retrouvé des signes de lésions de la substance blanche, des hémorragies du parenchyme. Le suivi à long-terme de ces enfants confirme l'atteinte neurologique avec un quotient intellectuel de 86% en moyenne, comparé à 100% dans le groupe contrôle (Duksha Ramful, communication personnelle). L'infection survenant à distance de l'accouchement est rarement dangereuse (Fritel, Rollot et al.). La transmission materno-néonatale du péripartum est probablement due à la contamination du sang foetal par le sang maternel lors du travail mais on ne peut cependant pas exclure la voie olfactive comme cela a été décrit expérimentalement chez la souris (Powers and Logue 2007; Ziegler, Lu et al. 2008). La césarienne ne semble pas protéger le nouveau-né et n'est pas recommandée (Gerardin, Barau et al. 2008). Bien que le virus n'ait pas été mis en évidence dans le lait maternel lors de la phase virémique chez la mère, l'allaitement n'est pas recommandé en raison de l'état fébrile maternel (Ramful, résultats non publiés, (Grivard, Le Roux et al. 2007)).

## 3 – CHIKV et pédiatrie :

La maladie est généralement bénigne chez l'enfant, malgré les trois décès durant l'épidémie réunionnaise (Economopoulou, Dominguez et al. 2009). Néanmoins, des manifestations atypiques, parfois graves, ont été observées, en particulier chez le nourrisson. Des manifestations neurologiques allant de la convulsion au syndrome méningé, la diplopie, l'aphasie, à l'encéphalite ont été rapportées. Le facteur de risque pour un déficit neurologique résiduel

incluent le jeune âge, la sévérité initiale (encéphalite) et les signes d'atteinte à l'imagerie (Robin, Ramful et al. 2008). Des éruptions cutanées à type d'épidermolyse bulleuse sévère chez le nourrisson de moins de 6 mois, concernant plus de 10% de la surface corporelle, ont été décrites ; l'histologie a retrouvé des lésions vésiculo-bulleuses intra-épidermiques contenant parfois une charge virale supérieure à celle du sérum. Tous ces cas ont nécessité une hospitalisation en service de soins intensifs (Robin, Ramful et al.). D'autres complications ont été observées, à type de déshydratation avec insuffisance rénale, surinfection bactérienne, hypoglycémie et manifestations cardiaques. Les formes chroniques arthritiques sont restées rares chez l'enfant (Ernould, Walters et al. 2008). L'hyperalgie a constitué un motif classique d'hospitalisation, surtout des jeunes enfants. Le traitement était parfois problématique, les salicylés et les AINS devant être évités en raison des risques hémorragiques. Le développement récent d'IgG polyvalentes purifiées à partir de plasmas de sujets convalescents pourrait être d'un apport bénéfique, chez les mères virémiques et les nouveau-nés de mères virémiques, tout comme les formes dermatologiques extensives de l'enfant, ainsi que les formes compliquées des adultes. Ces IgG anti-CHIKV, par leur activité neutralisante, abolit la détection virale dans le sérum et la dissémination au cerveau chez la souris (Couderc, Khandoudi et al. 2009) mais sans que l'on puisse à ce jour exclure des problèmes éventuels dues à l'ADE.

#### 4 – Les formes cliniques de l'adulte :

La présentation clinique est souvent similaire à celle d'une dengue en dehors de l'hémorragie ou du choc, exceptionnels dans l'infection CHIKV. Les études de séroprévalence dans plusieurs régions d'Afrique sont en faveur d'une réponse IgG anti-CHIKV, de type anticorps neutralisants qui protège de la réinfection ou de la multiplication systémique des sujets qui se réinfectent (Osterrieth, Deleplanque-Liegeois et al. 1960; Ivanov, Ivanova et al. 1992). 610 adultes ont présenté des formes atypiques avec un âge médian de 70 ans (15-95). 222 (36%) étaient des

formes sévères, 84 (14%) ont été admis en unité de soins intensifs et 65 de ces cas sévères (29%) sont décédés (Economopoulou, Dominguez et al. 2009) (Lemant, Boisson et al. 2008). 546 avaient des comorbidités cardiovasculaires, neurologiques, respiratoires. 147 patients présentaient des troubles neurologiques, dont 69 un tableau d'encéphalite, 15 de méningoencéphalite. Des polyradiculonévrites ou syndrome de Guillain-Barré, nécessitant une assistance respiratoire a été rapporté pour la première fois à la Réunion (Gauzere 2007). La présence d'anomalies et d'IgM anti-CHIKV dans le liquide céphalo-rachidien est fortement évocatrice d'une pathologie induite par le virus. Des troubles oculaires à type de défaut de la vision ou de neurorétinite ont aussi été rapportés (Mahesh, Giridhar et al. 2009). De nombreux signes cutanés ont été rapportés chez l'adulte (Prashant, Kumar et al. 2009). Des éruptions érythémateuses maculopapulaires ou morbilliformes disparaissant en 3-4 jours sans séquelles étaient la manifestation la plus courante. Des ulcères génitaux scrotaux ou à la base du pénis chez l'homme, et au niveau des grandes lèvres chez la femme constituaient la seconde manifestation. D'autres signes, incluant des œdèmes incapacitants des pieds et des mains, des macules hyperpigmentées du nez et des joues, des érythèmes noueux, des éruptions d'urticaire généralisée, et une exacerbation d'un lichen plan ou d'un psoriasis préexistant. Des cas de démangeaisons, de desquamation ont été observés dans quelques cas. Le devenir de ces signes était bon dans la majorité des cas, avec dans quelques la persistance de tâches dyschromiques (Talarmin, Staikowsky et al. 2007). Les formes atypiques étaient 2.5 fois plus fréquentes chez le sujet âgé de plus de 60 ans, comparé au sujet de moins de 40 ans.

##### 5 – Arthralgie chronique, douleur et arthrite post-CHIKV :

Nombre de patients souffrant de douleurs chroniques n'étaient pas soulagés par les analgésiques usuels, suggérant que la nature de la douleur n'était pas seulement nociceptive mais aussi neuropathique. Les douleurs persistantes des articulations, des muscles et une dépression ont été

rapportés plusieurs mois après l'infection CHIKV. Dans une cohorte de 147 patients infectés par le CHIKV, 84 d'entre eux (57%) rapportaient des signes rhumatismaux 15 mois après le CHIKV. Parmi ces derniers, 53 (63%) faisaient état de signes permanents, et 31 (37%) de signes récurrents. L'âge supérieur à 45 ans, des douleurs articulaires sévères initiales et la présence de lésions ostéoarticulaires préexistantes constituaient des facteurs de non guérison (Sissoko, Malvy et al. 2009). En particulier, chez le sujet de plus de 60 ans, l'apparition d'arthrite chronique incapacitante est décrite pour plusieurs alphavirus (Tesh 1982 ; Levine, Hardwick et al. 1994). Ces manifestations rhumatismales se présentent comme une arthrite fébrile, affectant essentiellement les extrémités (coudes, poignets, phalanges), sont fluctuantes dans le temps, mais ne changent pas de localisation. Les douleurs au niveau ou autour des tendons sont aussi caractéristiques et évoluent vers la ténosynovite. Peu de patients présente un facteur rhumatoïde (FR) ou des anti-CCP ((Chopra, Anuradha et al. 2008), et nos résultats). L'imagerie des articulations montre des signes de ténosynovite et enthésopathie plutôt qu'une synovite, et ne retrouve pas des images d'érosions articulaires évoquant une polyarthrite rhumatoïde (PR). Les patients présentant un tableau clinique d'arthrites sévères post-CHIK ont reçu un traitement associant méthotrexate, salazopyrine, leflunomide ou hydroxychloroquine (Chopra, Anuradha et al. 2008). En cas d'absence de réponse, des inhibiteurs de TNF- $\alpha$  ont été utilisés avec succès. Après 1 à 2 ans d'évolution, quelques patients présentent un tableau de PR (dont la définition correspond aux critères de l'American College of Rheumatology) avec des signes d'arthrite érosive, et pour certains la persistance d'IgM mais pas nécessairement associées à des stigmates d'auto-immunité (FR, anti-CCP).

#### 6 – Utilisation des répulsifs et des traitements :

Les recommandations concernant l'utilisation des répulsifs contre les moustiques chez l'enfant et la femme enceinte varient en fonction des pays. L'utilisation chez l'enfant de moins de 2 mois

n'est pas recommandée. Seule la prévention des piqûres de moustiques par l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'anti-moustique est préconisée. Le DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) est le plus efficace mais il n'est pas recommandé chez les jeunes enfants, la femme enceinte et pendant l'allaitement en raison des effets neurotoxiques potentiels.

Nous avons évoqué plus haut la mise à disposition possible des IgG polyvalentes purifiés et leur utilisation potentielle. Les premiers tests chez l'homme de l'utilisation de la chloroquine n'ont malheureusement pas montré son efficacité. De même, les résultats concernant la quinine sont variables. Bien que la ribavirine inhibe un certain nombre de virus à ARN *in cellulo*, elle n'a pas fait sa preuve *in vivo*, ainsi que l'association interféron- ribavirine. Il faut en effet rappeler que l'interféron- $\alpha$  testé chez la souris aurait un effet protecteur à condition d'être injecté avant l'infection.

Des recherches se poursuivent afin d'identifier des inhibiteurs d'enzymes viraux. L'utilisation d'ARN interférents ciblant nsP3 ou E1 a montré une certaine activité sur la réplication virale mais à court terme. Selon le Pr Xavier de Lamballerie, le traitement du CHIKV par les antiviraux n'est pas aisé en raison de la charge virale extrêmement élevée et courte. L'utilisation des antiviraux serait plus particulièrement indiquée chez les sujets âgés et dans les formes sévères avec persistance de gîtes sanctuaires.

#### 7 – Les vaccins :

Il n'existe pas de vaccin contre le CHIKV sur le marché. Le premier vaccin mis au point par l'Armée Américaine, a été produit sur cultures de cellules de singe et inactivé par le formol ou après extraction des protéines par le tween-éther. Le vaccin inactivé testé dans les années 70 stimule la production d'anticorps neutralisants.

Une souche de vaccin vivant atténuée issue d'une ancienne souche asiatique (Bangkok, 1962) et cultivée sur fibroblastes humains MRC5, a fait l'objet d'études précliniques et en phase II sur

200 volontaires sains de l'Armée Américaine. Les taux de séroconversion (98% à J28) et les titres d'anticorps neutralisants obtenus étaient très satisfaisants et persistaient dans 85% des cas à un an. Les essais se sont arrêtés en raison des priorités de l'Armée Américaine et probablement en raison des problèmes d'interférences dues à l'utilisation séquentielle de différents vaccins dirigés contre les alphavirus. La vaccination CHIKV suivie de celle du VEEV a entraîné une réduction de la réponse spécifique VEEV. Ce vaccin a été requalifié en France suite à l'épidémie de 2004-2006, et abandonné fin 2008.

Plus récemment, trois nouvelles versions de vaccins recombinants ont été testés avec succès chez la souris et le macaque. L'expression sélective de protéines structurales virales entraîne la production de particules virus-like. L'injection de ces particules entraîne une immunisation et la production d'anticorps neutralisants dirigés contre les protéines d'enveloppe. Les macaques ainsi immunisés sont protégés. L'utilisation de ces vaccins recombinants semble prometteuse dans la lutte contre la dissémination du CHIKV.

Autres commentaires :

Les mesures de contrôle d' *Ae albopictus* passent par la réduction de l'exposition au moustique par l'utilisation des répulsifs et la réduction des gîtes larvaires. L'utilisation de larvicides comme le Téméphos ou le BTI, et des insecticides organophosphorés limitent la population de moustiques. L'impact sur l'environnement n'est pas négligeable et il est à espérer que des mesures de contrôle biologique puissent être développées dans un avenir proche, comme l'utilisation de moustique mâle stérile ou génétiquement modifié qui ne transmettent pas la maladie à l'homme.

Sur le plan clinique, la mise au point d'anticorps monoclonaux anti-CHIKV dirigés contre les protéines d'enveloppe pourraient voir le jour. Des traitements de la douleur chronique nociceptive et/ou neuropathique seraient intéressants.



L'utilisation de techniques nouvelles d'imagerie telles que la TEP utilisant le 18-FDG (18 fluoro-désoxy-glucose) combinée à la RMN pourrait nous aider à élucider les mécanismes de l'arthrite chronique en identifiant des zones de fibrose, des érosions osseuses, des zones inflammatoires, qui pourraient guider le traitement.

Les études vaccinales sont à encourager particulièrement si le CHIKV se répand sur des continents tels que l'Amérique. La possibilité de vaccins épitopes pourrait être une alternative, avec l'association d'épitopes des cellules T et B dans une même préparation.

# Emergence and clinical insights into the pathology of Chikungunya virus infection

Expert Rev. Anti Infect. Ther. 8(9), xxx-xxx (2010)

Marie Christine Jaffar-Bandjee<sup>1</sup>,  
Duksha Ramful<sup>1</sup>,  
Bernard Alex Gauzere<sup>1</sup>,  
Jean Jacques Hoarau<sup>1</sup>,  
Pascale Krejbich-Trotot<sup>1</sup>,  
Stephanie Robin<sup>1</sup>,  
Anne Ribera<sup>1</sup>,  
Jimmy Selambarom<sup>1</sup>  
and Philippe Gasque<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Immunopathology and Infection Research Grouping (IRG/IGRI), Université de La Réunion and CHR Félix Guyon, St Denis 97400, Réunion, France

<sup>2</sup>Groupe de recherche immunopathologie et maladies infectieuses (GRI), Université de la Réunion, Plateau technique du CYROI, 2 rue Maxime Rivière, Ste Clotilde, Réunion, France

<sup>3</sup>Author for correspondence:  
Tel.: +262 938 836  
Fax: +262 938 801  
gasque@univ-reunion.fr;  
gasquep@hotmail.com

Major epidemics of Chikungunya have re-emerged with millions of cases worldwide. What was once largely a tropical disease in poorer countries is now recognized as a major global health issue. The disease is perpetuated by the alphavirus Chikungunya and is transmitted by *Aedes* mosquitoes. The infection is highly symptomatic, with fever, skin rash and incapacitating arthralgia, which can evolve to chronic arthritis and rheumatism in elderly patients. Mother-to-child transmission, encephalitis, Guillain-Barré syndrome and deaths have been noted. In this article, we will highlight the epidemiological, clinical, virological and immunological aspects of the disease and mention the therapies that have been used during recent epidemics. Novel prevention measures to control the mosquito and a new vaccine are highly warranted.

**Keywords:** anti-TNF- $\alpha$  • arthritis • Chikungunya • chloroquine • encephalitis • immunology • methotrexate • mosquito • neutralizing antiserum • vaccine

## Chikungunya: a re-emerging worldwide epidemic

Chikungunya (CHIK) is a re-emerging mosquito-borne disease due to an alphavirus (arbovirus) of the *Togaviridae* family [1,2]. The alphavirus group comprises 29 viruses, six of which can cause human joint disorders (arthralgia evolving to arthritis), namely Chikungunya virus (CHIKV), O'Nyong-Nyong virus, Semliki forest virus (in Africa, Asia and Europe), Ross River virus (in Australia and the Pacific), Sindbis virus (cosmopolitan), and Mayaro virus (in South America and French Guyana) [3]. The tropical disease CHIK is transmitted by the *Aedes* mosquito and is characterized by fever, headache, rashes and debilitating arthralgia [4]. CHIK was initially believed to be mainly an incapacitating disease and nonfatal, but severe forms and deaths have been reported on the Indian Ocean island of La Réunion [5] and in India [6]. A total of 3 years after the 2005–2007 epidemic, as the main feature of the disease remains the persistence of chronic arthralgia, the disease is now recognized as a major public health issue [2,7].

Chikungunya virus was first isolated in Tanganyika (now Tanzania) in 1953 [4,8]. Epidemics were then reported in West Africa [9–11], the Central African Republic [12] and in Southern Africa [13]. Many outbreaks were reported in Southeast Asia and the Western

Pacific [14], Indonesia [15] and India [16]. Neither Europe nor the Americas experienced outbreaks of CHIKV during these years. The last epidemic wave of CHIK in the Indian Ocean emerged in Kenya (Lamu) in July 2004, then reached the Comoros in January 2005, and the Seychelles in March 2005, followed by Mauritius. Serologic studies showed a high attack rate, with a prevalence of 75% in the population of Lamu [17], and 63% in Comoros [18]. The virus reached La Réunion in March–April 2005, with a prevalence of over 38% (266,000 cases) [19]. For the first time, deaths were directly or indirectly attributed to CHIKV (254 in La Réunion) [20]. Afterwards, several outbreaks expanded to India [6] and Southeast Asian countries. In India, it is estimated that more than 1.4 million people in 13 states were infected. Moreover, imported cases of CHIK in exposed travelers from the affected areas were observed in most countries in Europe, the USA, Canada, Hong Kong and, more recently, in China [21]. In Italy, where *Aedes albopictus* is present, an outbreak of more than 200 cases occurred in the Ravenna region during the summer of 2007 [22]. Previous phylogenetic studies showed that CHIKV strains were clustered into three distinct genotypes separated primarily by location into West African, Central East/South African and Asian genotypes [23,24]. Earlier outbreaks in Southeast Asia, India and

Indonesia prior to 2004 were caused by strains of the Asian genotype [24]. Explosive epidemics in the Indian Ocean islands and India since 2005 and the worldwide increase in travel have changed the distribution of CHIKV genotypes. Recent studies have shown that different lineages of CHIKV strains of the Central/East/South African genotype have expanded [25] and have spread to new areas in Africa during 2006–2007, Europe (2007), India (2006), Bangladesh (2008) and Malaysia (2008–2009) and caused the most recent epidemics [6,26]. This highlights the evolutionary dynamics of CHIKV, and probably involves the vector, the *Aedes* mosquito species.

Although the urban mosquito *Aedes aegypti* is the primary vector for Dengue and CHIKV transmission in Asia, the *Ae. albopictus* mosquito, initially a less efficient vector, was recently identified as the main or alternate vector in CHIKV outbreaks in Central and East Africa, India and Europe. The increased fitness of CHIKV in *Ae. albopictus* has important consequences. Given the worldwide distribution of *Ae. albopictus*, not only tropical and subtropical countries but also temperate countries where *Ae. aegypti* is rare (e.g., the Americas, China and Japan) are at risk of epidemics [27,28].

Moreover, recent studies have suggested that the increased outbreaks caused by CHIKV strains might have been associated with the A226V mutation in the E1 protein. This mutation appeared to be exclusively found in CHIKV isolated from *Ae. albopictus* [29]; it improves virus adaptation to the mosquito, with an increased ability to invade mosquito cells and to replicate [30]. For example, this mutation is responsible for a significant increase in CHIKV infectivity for *Ae. albopictus* and leads to a more efficient viral dissemination into mosquito secondary organs [31]. The enhanced fitness would be due to the loss of cholesterol dependence for growth by CHIKV, thereby allowing the virus to adapt and replicate more efficiently in *Ae. albopictus* and other mosquito species, which usually lack cholesterol [31,32]. Together with the absence of herd immunity and increased urbanization, this might explain the magnitude of the La Réunion outbreak, where more than a third of the population has been infected [33]. Genetic studies showed cocirculation of Asian genotype and Central/East/South African genotype during 2006–2009 in Taiwan [26]. The E1-A226V mutation only occurred in the 2007 outbreak in India [34]. Singapore was concerned by a CHIKV outbreak without the E1–226V mutation in January 2008, and the vector was *Ae. aegypti* [35]. In 2010, there is an ongoing epidemic in India, Thailand and in the southeast coast of Madagascar (Mananjary) where more than 2000 cases were reported by March 8 2010 [101]. Moreover, imported cases from these countries have led to a resurgence of a dozen indigenous cases per week of CHIKV in La Réunion since March 2010 [102].

#### CHIK & pregnancy

Mother-to-child transmission of CHIKV was first reported during the 2005–2006 outbreak on La Réunion Island [36,37], with similar cases published afterwards in India and Sri Lanka [38,39]. This novel mode of transmission occurs during the peripartum maternal infection when there is insufficient time for the maternal production of protective antibodies. In a population-based

series of 47 cases of perinatal mother-to-child CHIKV infection in La Réunion, maternal infection occurred from 4 days prepartum to 2 days after delivery, and neonates developed illness from days 2–10 (mean 4 days) after birth. Clinical signs included hyperalgia (100%), fever (77%), erythrodermia with secondary peripheral skin peeling (79%), refusal to feed requiring tube feeding (87%), edema of extremities (55%) and diarrhea (32%) [SAMPERIZ ET AL., COMMUNICATION IN BULL SOC PATHOL EXOT. 2007] [40]. All neonates except for one were hospitalized and 16 (34%) presented with severe complications including encephalopathy with seizures in nine cases, hemorrhagic manifestations (n = 9) with concomitant thrombocytopenia and hemostatic disturbances, and hemodynamic disorders (n = 10) such as hypotension, left ventricular dysfunction, pericarditis and hypercholechoic coronary arteries. Mechanical ventilation was needed in 25% of patients due to apneic spells, status epilepticus or hemodynamic instability. One neonate died on day 6 because of necrotizing enterocolitis. Interestingly, pathological brain MRI was noted in 17 out of 30 patients with scattered white matter lesions, parenchymal hemorrhages and early cytotoxic edema on diffusion-weighted sequences, and CHIKV RNA was detected in spinal fluid, even in apparently uncomplicated cases. Preliminary data concerning long-term follow-up of the infected neonates confirm poor outcome, with a mean developmental quotient of 86 (51% of the cases <85) compared with 100 in the control group (p < 0.001) [41].

Conversely, maternal infection occurring a long time from delivery is rarely harmful. In a prospective study comparing birth outcomes between 655 women not infected during pregnancy with 658 who were infected during pregnancy, only the number of hospital admissions differed between infected and uninfected women (40 vs 29%) [42]. There was no propensity to prematurity, growth restriction, fetal deaths, stillbirths, congenital anomalies or other complications of pregnancy such as vaginal bleeding or third-stage hemorrhage. Newborns seem to be healthy at birth with no detectable IgM antibody and maternally transferred IgG antibodies cleared progressively, indicating absence of *in utero* infection [9]. Antepartum fetal contamination seems to be very unusual, with only three cases described in La Réunion during a term of 12–15 weeks [43].

Mother-to-child infection around delivery is probably due to intrapartum contamination of the fetal blood by free virus particles from highly viremic mothers through placental breaches initiated by induction of labor. However, cesarean section does not seem to be protective and is not recommended [19]. A mouse model study [44] and the rarity of placental histologic lesions in human studies [42] confirm the non-permissiveness of the placental barrier during antepartum exposure.

The risk for CHIKV transmission through breastfeeding during maternal illness or its protective role in women previously infected by CHIKV remains unknown. CHIKV RNA was not detected in 20 maternal milk samples, including eight that were collected during viremia in La Réunion. However, as a precaution, breastfeeding was not recommended during the acute febrile phase of the disease [45]. In a study of 39 women who were infected in the



peripartum period, no statistical difference was found between infected (n = 16) and noninfected neonates (n = 23) with regards to breastfeeding [RAMFULD, UNPUBLISHED DATA].

#### CHIK in pediatrics

Pediatric hospitalized-based studies from La Réunion or India during the recent epidemics showed that the classic triad (fever, arthralgia and rash) of CHIK fever is found in more than 50% of patients [46–48]. CHIKV fever is usually benign in children. Death is rare, and in La Réunion, only three deaths were reported (one neonatal infection, one case of acute disseminated encephalomyelitis and one case of acute hemorrhagic shock syndrome) [37,49]. However, atypical manifestations, sometimes with subsequent sequelae, have been described, especially in small infants. Neurologic manifestations ranging from simple and complex febrile seizures to meningeal syndrome, acute encephalopathy, diplopia, aphasia, acute disseminated encephalomyelitis and encephalitis have been reported, with often unremarkable **cerebrospinal fluid findings** [47–50]. Risk factors for residual neurologic deficit (20% of the patients) included **young age (neonatal infection)**, severe initial clinical presentation (encephalitis) and **pathological MRI findings** [49]. Severe skin blistering in infants younger than 6 months of age affecting more than 10% of the total body surface area has been described, with **intraepidermal vesiculobullous lesions** sometimes having a higher mean viral load than in concurrent serum [48,49]. All infants required hospitalization in the intensive care unit (ICU), with **repeated dressings** under general anesthesia. Other complications related to pediatric CHIKV infection included dehydration with **dyselectrolytemia** and acute renal failure, poor tolerance due to **high-grade fever**, bacterial surinfection, hypoglycemia and cardiac manifestations [47,48,50]. Conversely, **persistent arthralgia** and exacerbation of underlying medical conditions seem to be very rare in children, and no fulminant hepatitis has been described.

Symptomatic treatment in pediatrics can be problematic during CHIKV fever. **Hyperalgesia**, with refusal to feed and the need for **intravenous level III analgesics** in small infants, was not an uncommon cause of hospitalization [47]. Salicylates and other NSAIDs should be avoided as they may precipitate bleeding manifestations.

Recently, the development of polyvalent immunoglobulins purified from human plasma samples of convalescent CHIK patients exhibited *in vitro* and *in vivo* neutralizing activities [51]. CHIKV immunoglobulin administration abolished viral detection in serum and dissemination to the brain in a mouse model. Viremic mothers and neonates born of viremic mothers, patients with severe neurological presentation of the disease, small infants with rapidly extensive skin blistering or adults with severe underlying comorbidities could benefit from this passive immunization technique.

#### Classic, atypical & severe cases of CHIK in adults

The classic symptoms after infection by CHIKV are abrupt febrile illness (temperature usually >38.9°C), maculopapular rash and articular pains responsible for a stooped walk. Other symptoms include myalgia, headache, edema of the extremities

and gastrointestinal complaints [52,53]. ‘Chikungunya’ means ‘to walk bent over’, in Tanzanian’s language and this is the canonical sign adopted by infected people in the acute phase (the incubation period ranges from 3 to 7 days and as few as 5% of patients are asymptomatic) with a characteristic stooped walking position. Clinical presentations are often similar to those of Dengue fever, except for hemorrhagic or shock syndrome, which are only seen in CHIKV infection [54].

The diagnosis of CHIKV infection is based on either specific serology or by the detection of viral RNA (e.g., *E1* gene) by reverse transcription PCR (RT-PCR). RT-PCR is positive during the viremic phase ( $10^2$ – $10^3$  viral RNA/ml of blood) lasting for 1 week after symptom onset, while the elevated levels of IgG (and surprisingly IgM) can last for months. CHIKV infection leads to protective adaptive immunity. **IgM antibodies** against CHIKV can be detected in the sera of infected patients during the acute phase of the infection. **Antibody prevalence** studies in many parts of Africa strongly suggest that anti-CHIKV (IgG), particularly neutralizing antibodies may prevent virus reinfection and/or systemic multiplication in reinfected individuals [10,55]. Interestingly, and in contrast to Dengue fever, the apparition of IgG anti-CHIKV was sometimes detected in the first week following infection, illustrating the rapid and robust adaptive immune response [56]. As in the majority of infectious diseases, the host rapidly mobilizes a robust innate immune cellular and molecular response [57]. Natural killer (NK) cells are strongly activated within the first few days postinfection and lead to a more sustainable CD4/CD8 response. Some, but not all, canonical cytokines and chemokines instigate the immune response and, surprisingly, the level of TNF- $\alpha$  is rather weak (almost undetectable) during the acute phase of CHIKV infection [57,58]. Innate and adaptive immune responses are essential to ward off the infectious challenge, and hence, the acute signs usually resolve in less than 2 weeks (coinciding with the disappearance of CHIKV in the blood) [57]. However, incapacitating arthralgia may persist for weeks or months.

The 2005–2006 epidemic in La Réunion was the first time that severe cases and deaths due to CHIK fever were documented. This outbreak, which occurred in a tropical area with European health standards, has increased the chance of identifying previously unreported clinical presentations and of documenting clinical forms. A hospital-based surveillance system collected data on atypical CHIK cases [59], and patients with laboratory-confirmed CHIK virus infection who developed other symptoms than fever and arthralgia were recorded as atypical cases. In addition, severe atypical cases were recorded when patients required maintenance of at least one vital function. A total of 610 adults presented with atypical cases of CHIK fever; the median age was 70 years (range: 15–95 years), and the sex ratio (M/F) was 0.8. Of these, 222 (36%) were severe cases, 84 (14%) were admitted to an ICU and 65 of the severe cases (29%) died, accounting for an overall case–fatality rate of 10.7% [5]. Overall, 546 cases had underlying medical conditions (226 cardiovascular, 147 neurological and 150 from respiratory disorders), 479 (78%) were on medication prior to hospitalization, 84 (14%) used NSAIDs and 88 (14%) were alcohol abusers.

In total, 110 patients were admitted with pre-renal acute renal failure and 41 (34%) presented with an exacerbation of a pre-existing renal disorder. Of these, 36 had chronic renal failure, two had a nephropathy and three had previously had a renal transplantation. Among 102 patients admitted with pneumonia, 17 had a history of chronic obstructive pulmonary disorder and three had asthma. A total of 131 patients presented with a glycemic impairment that revealed diabetes mellitus in 27 cases (20%). Although information on liver enzymes was only available for 64% of the cases, 73 patients had a greater than three-fold increase of the liver enzymes. Of the 226 patients presenting with cardiovascular disease, 110 (49%) had an underlying cardiac condition and 137 (61%) had hypertension. Of the 84 patients with heart failure, 29 (35%) had underlying cardiomyopathy, ten (12%) coronary artery disease, six (7%) valvular disease and four (5%) a history of myocardial infarction. Of the 44 cases with arrhythmias, seven had known arrhythmias, six cardiopathy, two valvulopathy and one heart failure. Of the 35 cases with myocarditis or pericarditis, seven had an underlying cardiopathy, two arrhythmias and two had a history of myocardial infarction. Of the 25 cases diagnosed with angina pectoris, 15 (60%) had a history of coronary artery disease. Four patients presented with acute myocardial infarction, including two with a history of coronary artery disease.

In total, 147 patients had neurological disorders. Of these, 25 (17%) had underlying neurological conditions. Of the 69 cases with encephalitis, 12 (17%) had underlying neurological conditions, including five strokes and five epilepsies. Of the 15 cases with meningoencephalitis, one had a history of cysticercosis, one of hydrocephalus, one of myasthenia gravis and eight a diagnosis of hypertension. Eight out of 12 cases who developed seizures were previously healthy. Prior to the Indian Ocean epidemic, a single case of meningoencephalitis had been reported in a 5-year-old Cambodian boy in 1971 [60].

Guillain-Barré syndromes that required respiratory support were recorded in adults for the first time during the La Réunion outbreak [61]. Neurological symptoms started during the invasion phase prior to seroconversion. The presence of cerebrospinal fluid (CSF) abnormalities and CHIK-specific IgM intrathecal synthesis were highly suggestive of CHIK-induced pathology in the nervous system. Tropism for brain tissue is a common occurrence in human viral disease. It has been reported in some other arboviral infection and validated in several mouse models of CHIK neuroinfection [44,62,63]. Ocular manifestations, such as defective vision linked with neuroretinitis, have also been reported [64].

A plethora of cutaneous manifestations were noted [65]. Erythematous maculopapular or morbilliform eruption subsiding without any sequelae within 3–4 days was the most common cutaneous finding. Genital ulcers located predominantly over the scrotum and base of the penile shaft in men and labia majora in women were the second most common manifestation. Other manifestations included incapacitating edema of the hands and feet, hyperpigmented macules on the nose and cheeks, erythema nodosum, erythema multiforme, generalized urticarial eruptions and flare up of pre-existing lichen planus and psoriasis. Itching

was reported in some cases. Peeling of the skin was observed in a few cases but remained uncommon in adults. Outcome was generally favorable, as the manifestations resolved rapidly in most cases, sometimes with scaling or persistence of dyschromic patches [66].

In La Réunion, the atypical cases aged 40–60 years were 2.5-times more likely to develop a severe disease than those aged less than 40 years. Those aged over 60 years were 1.6-times more likely to develop severe disease than those aged less than 40 years. In a recent study from India, age over 85 years was the only risk factor for mortality, although the possibility of coinfection by dengue virus (and other pathogens such as the respiratory syncytial or influenza viruses) may be contributing factors to be considered [67,68].

#### Chronic arthralgia, pain & arthritis post-CHIK

Several reports on chronic pain related to CHIKV infection have been published. Many of these patients do not respond well to usual analgesics, suggesting that the nature of chronic pain may be not only nociceptive but also neuropathic. A cross-sectional study at the end of the major two-wave outbreak in La Réunion assessed pain in 106 patients visiting general practitioners with confirmed infection with CHIKV, and evaluated its impact on quality of life [69]. A total of 56 patients fulfilled the definition of chronic pain. Pain was neuropathic in 18.9% of patients. The mean pain interference in life activities calculated from the Brief Pain Inventory (BPI) was significantly higher in patients with chronic pain than in patients without it. This score was also significantly higher in patients with neuropathic pain than in those without.

Persistent symptoms, mainly joint and muscular pain and depression, have been reported several months after CHIKV infection. A retrospective cohort study on 199 patients [70] described the frequency of prolonged clinical manifestations of CHIKV infection and measured the impact on quality of life and healthcare resource consumption in comparison with that of an unexposed population, more than 1 year post-infection (PI). More than 1 year following the acute phase of infection, CHIK-positive subjects reported more disabilities than those who were CHIK-negative. These persistent disabilities, however, have no significant influence on medical consumption, and the impact on quality of life was moderate. In the acute phase, as most normal analgesic and anti-inflammatory treatments failed, many patients were given various doses of prednisone (0.5–1 mg per kg), since during the chronic phase, low-dose prednisone ( $\leq 10$  mg/day) was used.

Long-term CHIKV rheumatic manifestations seem to be a frequent underlying post-epidemic condition. At the 15-month-evaluation period after diagnosis, 84 out of 147 participants (57%) reported rheumatic symptoms. Of these 84 patients, 53 (63%) reported permanent trouble while 31 (37%) had recurrent symptoms. Age 45 years or older, severe initial joint pain and presence of underlying osteoarthritis comorbidity were predictors of nonrecovery [7].

Particularly in elderly patients (those over 60 years of age), CHIKV had rather profound acute arthritogenic activities and could contribute to chronic incapacitating arthritis as described for several alphaviruses [71–75]. Rheumatic manifestations in up to



50% of the adult patients (6 months–1 year PI) typically consisted of a febrile arthritis mainly affecting the extremities (ankles, wrists and phalanges) [7,76–80]. Typically, the joint symptoms occurred in a fluctuating manner but did not change anatomical location. Pain within or around tendons was also a common trait and evolved to tenosynovitis. Chopra *et al.* reported high levels of CHIKV IgM antibodies in a cohort of Indian patients with post-CHIKV rheumatoid arthritis (RA)-like illnesses [81]. These patients were clearly naive for musculoskeletal disorders prior to CHIKV infection. Surprisingly, few were positive for rheumatoid factor (RF) and anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibodies. Tenosynovitis/enthesopathy rather than synovitis was evidenced by ultrasonography in several cases and these unique observations are in agreement with our x-ray imaging of enthesitis in post-CHIK RA patients in La Réunion [RIBEIRA A, PERS. COMM.]. The Chopra's and our ongoing cohort studies (6 months–1 year PI) did not reveal any major RA classic erosions of the cartilage and bones and hence the post-CHIK RA is reminiscent of, but distinguishable from, autoimmune RA. Nevertheless some inflammatory processes were suggested in the Indian study by high levels of C-reactive protein (in over 70% of the cohort), necessitating effective treatment regimes. Patients with a diagnosis of RA following CHIKV infection were given a classical disease-modifying anti-rheumatic drug therapy with methotrexate (up to 0.3 mg/kg/week), salazopyrine (1.5 g–3 g/day), leflunomide (10–20 mg/day) or hydroxychloroquine (200–600 mg/day). In case of inadequate response to methotrexate, treatment was successful with TNF- $\alpha$  blockers (etanercept and adalimumab) [82].

As the chronic disease progresses, more severe cases of arthritis were reported 1–2 years post-CHIKV infection. Some patients with chronic associated rheumatism developed progressive erosive arthritis [76,80,83]. In Manimunda's study, it was confirmed that the level of RF and anti-CCP antibodies was not elevated, in contrast to what is known in canonical autoimmune RA [80]. In the same study, a third of the patients who had joint pain met the American College of Rheumatology criteria to classify them as having RA. The MRI findings were joint effusion, erosion of the bone, marrow edema, synovial thickening, tendinitis and tenosynovitis. The authors conclude that CHIK arthritis is a chronic inflammatory erosive arthritis.

It has recently been demonstrated that CHIKV infection in cynomolgus macaques mimics CHIKV infection in humans. The viral, clinical and pathological features observed in human disease can be observed in these animals [84]. Moreover, viral antigens and RNA (3 months PI) was observed in joints, muscles, lymphoid organs and liver. This seminal study suggests that arthritogenic CHIKV could persist for extended periods, despite the presence of antiviral antibodies and T-cell responses. The same conclusions were drawn in a longitudinal study of 49 hospitalized CHIKV patients from La Réunion subsequently categorized into two distinct groups at 12 months PI [57]. Comprehensive analyses of the clinical and immunological parameters throughout the disease course were studied in either the 'recovered' or the 'chronic' groups to identify prognostic markers of arthritis-like pathology post-CHIKV disease. It was found that the 'chronic' group consisted

mainly of more elderly patients (over 60 years) and with much higher viral load (up to  $10^{10}$  viral RNA/ml) during the acute phase. Interestingly, the antiviral immune response witnessed by high levels of IFN- $\alpha$  mRNA in peripheral blood mononuclear cells and circulating IL-12 persisted for months only in the 'chronic' group. Remarkably, CHIKV (RNA and proteins) was found in perivascular synovial macrophages in one chronic patient 18 months PI. Fibroblast hyperplasia, strong angiogenesis, tissue lesions given the high levels of matrix metalloproteinase 2 and acute cell death (high cleaved poly[ADP-ribose] polymerase staining) were observed in the injured synovial tissue [57]. These observed cellular and molecular events may contribute to chronic arthralgia/arthritis targeted by methotrexate used empirically for effective treatment but with immunosuppressive function in the context of viral persistence. As the development and characterization of primate models for CHIK fever represent a significant advance that has already increased our understanding of the disease, it is hoped that this model of CHIKV physiopathology could allow the development of new therapeutic and prophylactic strategies. It provides a possible explanation for the long-lasting symptoms observed in humans and demonstrates the existence of a relationship among the amount of inoculated virus, the viremia and the disease.

#### Use of repellents & treatment issues

Recommendations concerning the use of topical insect repellents in children and pregnant women vary widely from country to country. Rational repellent prescription for a child must take into account age, active substance concentration, topical substance tolerance, nature and surface of the skin to protect, number of daily applications, and the length of use in a risk-benefit ratio assessment perspective. Generally, topical repellents should not be used under the age of 2 months. Owing to the severity of neonatal infection and atypical forms of CHIKV infection in very young infants, parental training about prevention of mosquito bites during the perinatal period and distribution of impregnated mosquito nets should be carried out during outbreaks. DEET (*N,N*-diethyl-*m*-toluamide, now called *N,N*-diethyl-3-methylbenzamide) is considered the most effective insect repellent for personal protection but is not recommended for young children, pregnant or lactating women due to its potential neurotoxic effects [85]. Novel formulations of repellents using natural oil products may be of use for this group [SELAMBAROM, UNPUBLISHED DATA].

The elaboration of animal models in mice and macaques has recently significantly increased the scope for new antiviral therapies as aforementioned and validated for the polyvalent anti-CHIKV immunoglobulins. Viremic mothers and neonates to viremic mothers, patients with severe neurological presentation of the disease, small infants with rapidly extensive skin blistering or adults with severe underlying comorbidities could benefit from this passive immunization technique. The *in cellulo* antiviral action of chloroquine was reported long ago [86]. In the particular case of alphaviruses that include CHIKV, chloroquine inhibited the replication of Sindbis and Semliki forest viruses *in cellulo*, although a mouse model suggested that chloroquine may enhance the viral replication of Semliki forest virus *in vivo* [87].

During the La Réunion outbreak, the efficacy of chloroquine in the treatment of acute CHIK infections was discussed following positive *in vitro* studies. A double-blind randomized placebo-controlled trial was conducted and suggested that there is no justification for the use of chloroquine to treat acute CHIK infections [88]. In the trial, 27 patients received chloroquine (600 mg on day 1, 600 mg on days 2 and 3, and 300 mg on days 4 and 5), and 27 patients received a placebo treatment. No significant difference between the groups could be identified regarding the duration of febrile arthralgia or the decrease of viremia between days 1 and 3. Moreover, at day 200, patients who received chloroquine complained more frequently of arthralgia than those who received placebo. Quinine, another antimalarial molecule, is being currently studied *in cellulo*, with variable results. Although ribavirin inhibits a wide range of RNA viruses *in cellulo*, there is no evidence supporting the clinical efficacy of ribavirin *in vivo* for the treatment of CHIK infection. The efficacy of interferon and of the combination of IFN- $\alpha$  and ribavirin remains to be ascertained [88]. IFN- $\alpha$  has been tested in a mouse model of CHIKV and was shown to be protective only when injected prior to infection [89].

Work is currently being pursued to identify specific inhibitors of viral enzymes such as CHIKV polymerase-capping enzymes, proteases and helicases, as recently demonstrated for the non-structural protein nsP3 [90]. Some of these proteins are now available as active soluble compounds. RNA interference targeting the nsP3 and E1 of CHIKV was recently shown to be an active route against viral replication but failed to induce long-term inhibition, possibly due to the rapid replicating nature of alphaviruses [91].

According to de Lamballerie [88], the treatment of CHIKV infection using antiviral drugs is likely to be uneasy given the extremely high and short virus load. Therefore an antiviral treatment may only be useful for preventing the infection in individuals such as the elderly and for the management of severe cases, as well as cases where the virus may be persisting in tissue sanctuaries [57].

#### Towards a vaccine strategy?

There is no licensed human vaccine for CHIK [92]. The first formulation of a potential vaccine was established by the US Army and tested in the early 1970s. CHIKV was produced from monkey cell cultures and the vaccine was prepared from either formalin-fixed virus or Tween-ether-extracted viral proteins [93,94]. The inactivated CHIKV vaccine was able to stimulate antibody production with neutralizing capacities when tested on a small cohort of army recruits.

A live-attenuated strain of CHIKV was obtained from an old strain of Asian origin (Bangkok, 1962) and cultured on MRC5 human fibroblasts [95]. Preclinical studies and Phase II trials were conducted on 200 healthy US Army volunteers [96,97]. Very satisfactory seroconversion rates (98% on day 28) and neutralizing antibody titers were obtained, persisting in 85% of cases at 1 year. Further development was stopped due to new priorities in the US Army and perhaps also due to the problem of potential interference arising from sequential administration of vaccines specific for different alphaviruses. For example, McClain and colleagues showed that vaccination with CHIKV followed by Venezuelan equine encephalitis virus resulted in reduced Venezuelan equine

encephalitis virus-specific responses [96]. The candidate vaccine was then stored frozen in lyophilized form. Requalification of the American candidate vaccine was decided in France but then abandoned at the end of 2008 as the vaccine batch no longer met the demands of the French Medicine Evaluation Agency.

More recently, three new recombinant versions of CHIKV vaccines were reported and successfully tested on mouse or macaque animal models [61,98,99]. Akahata and colleagues showed that the selective expression of viral structural proteins gives rise to virus-like particles *in vitro* that resemble replication-competent alphaviruses. Immunization with these virus-like particles elicited neutralizing antibodies against envelope proteins. Macaques immunized with particles were protected against viremia after high-dose challenge, by producing high titers of neutralizing antibodies. Immunization with alphavirus virus-like particle vaccines may represent a new strategy to contain the spread of CHIKV-related pathogenic viruses in humans.

#### Expert commentary & five year view

From a mosquito's stand point and as demonstrated in the recent epidemics in the Indian Ocean and Europe, it is likely that CHIKV could emerge in any tropical or temperate area where *Ae. albopictus* is present. A concerted set of actions will be required to tackle this problem, with community-based and governmental interventions essential for the early detection and risk reduction through implementation of aggressive vector control measures and health communications.

The validated control measures on *Ae. albopictus* rely on the reduction of human-to-vector contact through the use of insect repellents and on the reduction of the larval source by removing water-holding containers. The use of larvicides such as temephos and *Bacillus thuringiensis israelensis* applied at breeding sites have been used to limit mosquito population sizes together with classical organophosphate insecticides to limit the density of adult mosquitoes. The cost to the environment is not negligible and alternative strategies should be encouraged with the hope that biologic control measures will be proposed in the next 5 years. These new measures are currently in trials and include the release of sterile male or genetically modified mosquitoes that are unable to transmit diseases to humans. All these measures will benefit from experimental models incorporating ecologic, entomologic and virologic factors to obtain a better knowledge of factors contributing to the spread of the disease.

From a patient's point of view, physicians will have a key role in detecting and treating new cases and taking into account the great vulnerability of pregnant mothers and newborns. These patients will be treated using polyvalent immunoglobulins or any other neutralizing polyclonal or anti-CHIKV monoclonal antibodies. Humanized monoclonal antibodies against viral envelope proteins may also be of use. Treatments should aim to treat the nature of chronic nociceptive but also neuropathic pains. Our understanding of CHIKV pathology is still in its infancy and experiments using existing and novel animal models are highly warranted to help us obtain a better understanding of the mechanisms driving arthralgias and rheumatism. Experiments addressing the interactions



between the host and CHIKV are highly warranted and, in particular, to explain the mechanisms of viral persistence and chronic arthritis in a non-autoimmune context. Novel noninvasive imaging techniques such as <sup>18</sup>fluorodeoxyglucose positron emission tomography combined with nuclear magnetic resonance should help us to decipher the arthritis mechanisms (bone erosion and level of fibrosis) that may be controlled by methotrexate treatment.

These studies are important in designing novel antiviral control strategies, including treatments delivered at sites of viral persistence such as IFN- $\alpha$  [57].

A live-attenuated vaccine was originally advanced through to Phase II human trials, but its development was halted because of its poor tolerance, problems of interference with other alphaviruses and a lack of demand. The study of this and other potential vaccine formulations, such as chimeric alphavirus vaccines, should

be renewed. Epitope-based vaccines may provide an alternative approach as they could incorporate both T- and B-cell epitopes in a single formulation.

#### Financial & competing interests disclosure

*The Immunopathology and Infection Research Grouping has received financial support from the University of La Réunion, the overseas French ministry (Ministère de l'outre mer), the Agence Nationale de la Recherche en France, the Health French Ministry (PHRC research program), the Centre de Recherche et de Veille de l'Océan Indien and INSERM (Contrat d'interface to Philippe Gasque). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.*

*No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.*

#### Key issues

- Chikungunya, a tropical disease in poorer countries, is now becoming a major global health issue given the worldwide distribution of its mosquito vector (*Aedes albopictus* and, to a less extent, *Aedes aegypti*).
- The disease is highly symptomatic and characterized by a Dengue-like episode (fever and rash) and a unique incapacity to walk, accompanied by myalgia and neurological symptoms.
- Rare cases of mother-to-child transmission, encephalitis, hepatitis and cardiomyopathies have been described that required intensive care. Deaths linked to Chikungunya virus infection were estimated at 0.1% in La Réunion.
- Chronic pain is of nociceptive but also neuropathic nature, and salicylates and other NSAIDs used in adults should be avoided in neonates as they may precipitate bleeding manifestations.
- Severe arthralgia can persist for months, particularly in elderly patients, and evolve to rheumatism.
- Classical disease-modifying anti-rheumatic drug therapy with methotrexate, sulfasalazine, leflunomide or hydroxychloroquine was used successfully. In case of inadequate response to methotrexate, treatment was successful with TNF- $\alpha$  blockers.
- Other treatments (anti-malaria drugs) proved to be inadequate.
- The design of a safe and efficient recombinant vaccine is in progress and has been shown to be protective in mouse and nonhuman primate models of Chikungunya.
- The development of polyvalent immunoglobulins purified from human plasma samples of convalescent Chikungunya patients could benefit infected viremic mothers and newborns.

#### References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest

•• of considerable interest

- 1 Pialoux G, Gauzere BA, Jaureguierry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect. Dis.* 7, 319–327 (2007).
- 2 Jaffar-Bandjee MC, Das T, Hoarau JJ *et al.* Chikungunya virus takes centre stage in virally induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis. *Microbes Infect.* 11, 1206–1218 (2009).
- 3 Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* 58, 491–562 (1994).
- 4 Robinson MC. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953. I. Clinical features. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 49, 28–32 (1955).
- 5 Lemant J, Boisson V, Winer A *et al.* Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the Reunion Island outbreak in 2005–2006. *Crit. Care Med.* 36, 2536–2541 (2008).
- 6 Mavalankar D, Shastri P, Raman P. Chikungunya epidemic in India: a major public-health disaster. *Lancet Infect. Dis.* 7, 306–307 (2007).
- 7 Sissoko D, Malvy D, Ezzedine K *et al.* Post-epidemic chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e389 (2009).



- 8 Ross RW. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J. Hyg.* 54, 177–191 (1956).
- 9 Filipe AF, Pinto MR. Arbovirus studies in Luanda, Angola. 2. Virological and serological studies during an outbreak of dengue-like disease caused by the Chikungunya virus. *Bull. World Health Organ.* 49, 37–40 (1973).
- 10 Ivanov AP, Ivanova OE, Lomonosov NN *et al.* Serological investigations of Chikungunya virus in the Republic of Guinea. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 72, 73–74 (1992).
- 11 Moore DL, Reddy S, Akinkugbe FM *et al.* An epidemic of chikungunya fever at Ibadan, Nigeria, 1969. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 68, 59–68 (1974).
- 12 Guilherme JM, Gonella-Legall C, Legall F, Nakoume E, Vincent J. Seroprevalence of five arboviruses in Zebu cattle in the Central African Republic. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90, 31–33 (1996).
- 13 McIntosh BM, Harwin RM, Paterson HE, Westwater ML. An epidemic of Chikungunya in south-eastern southern Rhodesia. *Cent. Afr. J. Med.* 43, 351–359 (1963).
- 14 Mackenzie JS, Chua KB, Daniels PW *et al.* Emerging viral diseases of Southeast Asia and the Western Pacific. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 497–504 (2001).
- 15 Porter KR, Tan R, Istary Y *et al.* A serological study of Chikungunya virus transmission in Yogyakarta, Indonesia: evidence for the first outbreak since 1982. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 35, 408–415 (2004).
- 16 Rao TR. Immunological surveys of arbovirus infections in South-East Asia, with special reference to dengue, chikungunya, and Kyasanur Forest disease. *Bull. World Health Organ.* 44, 585–591 (1971).
- 17 Serگون K, Njuguna C, Kalani R *et al.* Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 333–337 (2008).
- 18 Serگون K, Yahaya AA, Brown J *et al.* Seroprevalence of Chikungunya virus infection on Grande Comore Island, union of the Comoros, 2005. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 1189–1193 (2007).
- 19 Gerardin P, Barau G, Michault A *et al.* Multidisciplinary prospective study of mother-to-child Chikungunya virus infections on the island of La Reunion. *PLoS Med* 5, e60 (2008).
- **First comprehensive study of mother-to-child contamination by chikungunya.**
- 20 Renault P, Soler JL, Sissoko D *et al.* A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005–2006. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 727–731 (2007).
- 21 Zheng K, Li J, Zhang Q *et al.* Genetic analysis of chikungunya viruses imported to mainland China in 2008. *Virology* 401, 7–8 (2010).
- 22 Rezza G, Nicoletti L, Angelini R *et al.* Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370, 1840–1846 (2007).
- 23 Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J. Gen. Virol.* 81, 471–479 (2000).
- 24 Powers AM, Logue CH. Changing patterns of Chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J. Gen. Virol.* 88, 2363–2377 (2007).
- **Excellent review illustrating the recent emergence of Chikungunya virus and the worldwide impact.**
- 25 Kariuki Njenga M, Nderitu L, Ledermann JP *et al.* Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. *J. Gen. Virol.* 89, 2754–2760 (2008).
- 26 Huang JH, Yang CF, Su CL *et al.* Imported Chikungunya virus strains, Taiwan, 2006–2009. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1854–1856 (2009).
- 27 Parola P, de Lamballerie X, Jourdan J *et al.* Novel Chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1493–1499 (2006).
- 28 Moore CG, Mitchell CJ. *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 329–334 (1997).
- 29 Gould EA, Higgs S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 109–121 (2009).
- 30 Schuffenecker I, Iteman I, Michault A *et al.* Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* 3, e263 (2006).
- **Key paper describing the epidemiology of Chikungunya in the Indian Ocean and characterization of mutants.**
- 31 Tsersarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 3, e201 (2007).
- 32 Vazille M, Moutailler S, Coudrier D *et al.* Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One* 2, e1168 (2007).
- 33 Kam YW, Ong EK, Renia L, Tong JC, Ng LF. Immunobiology of Chikungunya and implications for disease intervention. *Microbes Infect.* 11, 1186–1196 (2009).
- 34 Kumar NP, Joseph R, Kamaraj T, Jambulingam P. A226V mutation in virus during the 2007 chikungunya outbreak in Kerala, India. *J. Gen. Virol.* 89, 1945–1948 (2008).
- 35 Leo YS, Chow AL, Tan LK *et al.* Chikungunya outbreak, Singapore, 2008. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 836–837 (2009).
- 36 Robillard PY, Boumahni B, Gerardin P *et al.* Vertical maternal fetal transmission of the chikungunya virus. Ten cases among 84 pregnant women. *Presse Med.* 35, 785–788 (2006).
- 37 Ramful D, Carbonnier M, Pasquet M *et al.* Mother-to-child transmission of Chikungunya virus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 26, 811–815 (2007).
- 38 Rao G, Khan YZ, Chitnis DS. Chikungunya infection in neonates. *Ind. Pediatr.* 45, 240–242 (2008).
- 39 Senanayake MP, Senanayake SM, Vidanage KK, Gunasena S, Lamabadururiya SP. Vertical transmission in chikungunya infection. *Ceylon Med. J.* 54, 47–50 (2009).
- 40 Samperiz E, Gerardin P, Noormahomed T, Beullir G, Boya I. [Transmission perinatale du virus chikungunya, à propos de 47 cas à l'île de La Réunion]. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 100, 355 (2007).
- 41 Ramful D, Fourmaintraux A, Rollot O *et al.* [Pronostic neurodéveloppemental à 2 ans de l'infection materno-néonatale à virus chikungunya]. *Arch. Pediatr. Livre des Résumés* 17(6), 17 (2010).
- 42 Fritel X, Rollot O, Gerardin P *et al.* Chikungunya virus infection during pregnancy, Reunion, France, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 418–425 (2010).
- 43 Touret Y, Randrianaivo H, Michault A *et al.* [Early maternal-fetal transmission of the Chikungunya virus]. *Presse Med.* 35, 1656–1658 (2006).
- 44 Coudere T, Chretien F, Schilte C *et al.* A mouse model for Chikungunya: young

- age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathog.* 4, e29 (2008).
- **One of the first animal models of Chikungunya infection illustrating the protective role of the innate immune system.**
- 45 Grivard P, Le Roux K, Laurent P *et al.* Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. *Pathol. Biol. (Paris)* 55, 490–494 (2007).
- 46 Ernould S, Walters H, Alessandri JL *et al.* Chikungunya in paediatrics: epidemic of 2005–2006 in Saint-Denis, Reunion Island. *Arch. Pediatr.* 15, 253–262 (2008).
- 47 Le Bomin A, Hebert JC, Marty P, Delaunay P. [Confirmed chikungunya in children in Mayotte. Description of 50 patients hospitalized from February to June 2006]. *Med. Trop. (Mars.)* 68, 491–495 (2008).
- 48 Valamparampil JJ, Chirakkaror S, Lerha S, Jayakumar C, Gopinathan KM. Clinical profile of Chikungunya in infants. *Ind. J. Pediatr.* 76, 151–155 (2009).
- 49 Robin S, Ramful D, Le Seach F *et al.* Neurologic manifestations of pediatric chikungunya infection. *J. Child Neurol.* 23, 1028–1035 (2008).
- **The first comprehensive report of Chikungunya neuroinfection.**
- 50 Lewthwaite P, Vasanthapuram R, Osborne JC *et al.* Chikungunya virus and central nervous system infections in children, India. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 329–331 (2009).
- 51 Couderc T, Khandoudi N, Grandadam M *et al.* Prophylaxis and therapy for Chikungunya virus infection. *J. Infect. Dis.* 200, 516–523 (2009).
- **Study characterizing the therapeutic potential of neutralizing antisera prepared from infected patients.**
- 52 Borgherini G, Poubreau P, Staikowsky F *et al.* Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. *Clin. Infect. Dis.* 44, 1401–1407 (2007).
- **A comprehensive study of the clinical symptoms and biological status in acute Chikungunya infection.**
- 53 Lakshmi V, Neeraja M, Subbalaxmi MV *et al.* Clinical features and molecular diagnosis of Chikungunya fever from South India. *Clin. Infect. Dis.* 46, 1436–1442 (2008).
- 54 Her Z, Kam YW, Lin RT, Ng LF. Chikungunya: a bending reality. *Microbes Infect.* 11, 1165–1176 (2009).
- 55 Osterrieth P, Deleplanque-Liegeois P, Renoirte R. [Research on the Chikungunya virus in the Belgian Congo. II. Serological investigation]. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop. (1920)* 40, 205–213 (1960).
- 56 Panning M, Grywna K, van Esbroeck M, Emmerich P, Drosten C. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 416–422 (2008).
- 57 Hoarau JJ, Bandjee MC, Trotot PK *et al.* Persistent chronic inflammation and infection by chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. *J. Immunol.* 184, 5914–5927 (2010).
- **This is the first comprehensive study describing the innate and acquired immune responses during acute and chronic Chikungunya in patients. The capacity of the virus to hide in tissue sanctuaries is also mentioned and is a scenario that may contribute to arthritis, particularly in elderly patients who failed to control the acute infectious challenge.**
- 58 Ng LF, Chow A, Sun YJ *et al.* IL-1 $\beta$ , IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. *PLoS One* 4, e4261 (2009).
- **Key paper describing the cytokine response in acute Chikungunya disease.**
- 59 Economopoulou A, Dominguez M, Helynek B *et al.* Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Reunion. *Epidemiol. Infect.* 137, 534–541 (2009).
- **A thorough analysis of severe cases of Chikungunya and links with comorbidity factors.**
- 60 Mazaud R, Salaun JJ, Montabone H, Goube P, Bazillio R. [Acute neurologic and sensorial disorders in dengue and Chikungunya fever]. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 64, 22–30 (1971).
- 61 Lebrun G, Chadda K, Reboux AH, Martinet O, Gauzere BA. Guillain-Barre syndrome after chikungunya infection. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 495–496 (2009).
- 62 Wang E, Volkova E, Adams AP *et al.* Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya. *Vaccine* 26, 5030–5039 (2008).
- 63 Ziegler SA, Lu L, da Rosa AP, Xiao SY, Tesh RB. An animal model for studying the pathogenesis of chikungunya virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 133–139 (2008).
- **A model of Chikungunya infection in outbred mice with tissue (including brain sequelae).**
- 64 Mahesh G, Giridhar A, Shedbeke A, Kumar R, Saikumar SJ. A case of bilateral presumed chikungunya neuroretinitis. *Ind. J. Ophthalmol.* 57, 148–150 (2009).
- 65 Prashant S, Kumar AS, Basheeruddin DD, Chowdhary TN, Madhu B. Cutaneous manifestations in patients suspected of chikungunya disease. *Ind. J. Dermatol.* 54, 128–131 (2009).
- 66 Talarmin F, Staikowsky F, Schoenlaub P *et al.* [Skin and mucosal manifestations of Chikungunya virus infection in adults in Reunion Island]. *Med. Trop. (Mars.)* 67, 167–173 (2007).
- 67 Tandale BV, Sathe PS, Arankalle VA *et al.* Systemic involvements and fatalities during Chikungunya epidemic in India, 2006. *J. Clin. Virol.* (2009).
- 68 Sankari T, Hoti SL, Govindaraj V, Das PK. Chikungunya and respiratory viral infections. *Lancet Infect. Dis.* 8, 3–4 (2008).
- 69 de Andrade DC, Jean S, Clavelou P, Dallel R, Bouhassira D. Chronic pain associated with the Chikungunya fever: long lasting burden of an acute illness. *BMC Infect. Dis.* 10, 31 (2010).
- 70 Soumahoro MK, Gerardin P, Boelle PY *et al.* Impact of Chikungunya virus infection on health status and quality of life: a retrospective cohort study. *PLoS One* 4, e7800 (2009).
- 71 Tesh RB. Arthritides caused by mosquito-borne viruses. *Annu. Rev. Med.* 33, 31–40 (1982).
- 72 Harley D, Sleight A, Ritchie S. Ross River virus transmission, infection, and disease: a cross-disciplinary review. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 909–932 (2001).
- 73 Levine B, Hardwick JM, Griffin DE. Persistence of alphaviruses in vertebrate hosts. *Trends Microbiol.* 2, 25–28 (1994).
- 74 Suhrbier A, La Linn M. Clinical and pathologic aspects of arthritis due to Ross River virus and other alphaviruses. *Curr. Opin. Rheumatol.* 16, 374–379 (2004).
- 75 Toivanen A. Alphaviruses: an emerging cause of arthritis? *Curr. Opin Rheumatol.* 20, 486–490 (2008).
- 76 Brighton SW, Simson IW. A destructive arthropathy following Chikungunya virus

- arthritis – a possible association. *Clin. Rheumatol.* 3, 253–258 (1984).
- 77 Fourie ED, Morrison JG. Rheumatoid arthritic syndrome after chikungunya fever. *S. Afr. Med. J.* 56, 130–132 (1979).
- 78 Simon F, Parola P, Grandadam M *et al.* Chikungunya infection: an emerging rheumatism among travelers returned from Indian Ocean islands. Report of 47 cases. *Medicine* 86, 123–137 (2007).
- **First comprehensive report about Chikungunya and evolving arthritogenic activities in patients.**
- 79 Borgherini G, Poubau P, Jossaume A *et al.* Persistent arthralgia associated with Chikungunya virus: a study of 88 adult patients on Reunion island. *Clin. Infect. Dis.* 47, 469–475 (2008).
- **Report of chronic cases of arthritis post-Chikungunya, months after the initial infection.**
- 80 Manimunda SP, Vijayachari P, Uppoor R *et al.* Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 104, 392–399 (2010).
- 81 Chopra A, Anuradha V, Lagoo-Joshi V *et al.* Chikungunya virus aches and pains: an emerging challenge. *Arthritis Rheum.* 58, 2921–2922 (2008).
- 82 Bouquillard E, Combe B. Rheumatoid arthritis after Chikungunya fever: a prospective follow-up study of 21 cases. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 1505–1506 (2009).
- 83 Malvy D, Ezzedine K, Mamani-Matsuda M *et al.* Destructive arthritis in a patient with chikungunya virus infection with persistent specific IgM antibodies. *BMC Infect. Dis.* 9, 200 (2009).
- 84 Labadie K, Larcher T, Joubert C *et al.* Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *J. Clin. Invest.* 120, 894–906 (2010).
- **Chikungunya (antigens, proteins and particles) was shown to persist in tissue sanctuaries.**
- 85 Sorge F. [Prevention with repellent in children]. *Arch. Pediatr.* 16(Suppl. 2), S115–S122 (2009).
- 86 Brighton SW. Chloroquine phosphate treatment of chronic Chikungunya arthritis. An open pilot study. *S. Afr. Med. J.* 66, 217–218 (1984).
- 87 Maheshwari RK, Srikantan V, Bhartiya D. Chloroquine enhances replication of Semliki Forest virus and encephalomyocarditis virus in mice. *J. Virol.* 65, 992–995 (1991).
- 88 de Lamballerie X, Ninove L, Charrel RN. Antiviral treatment of chikungunya virus infection. *Infect. Disord. Drug Targets* 9, 101–104 (2009).
- 89 Gardner J, Anraku I, Le TT *et al.* Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. *J. Virol.* 84(16), 8021–8032 (2010).
- 90 Maler H, Courard B, Jamal S *et al.* The crystal structures of Chikungunya and Venezuelan equine encephalitis virus nsP3 macro domains define a conserved adenosine binding pocket. *J. Virol.* 83, 6534–6545 (2009).
- 91 Dash PK, Tiwari M, Santhosh SR, Parida M, Lakshmana Rao PV. RNA interference mediated inhibition of Chikungunya virus replication in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376, 718–722 (2008).
- 92 Thiboutot MM, Kannan S, Kawalekar OU *et al.* Chikungunya: a potentially emerging epidemic? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e623 (2010).
- 93 Eckels KH, Harrison VR, Herrick FM. Chikungunya virus vaccine prepared by Tween-ether extraction. *Appl. Microbiol.* 19, 321–325 (1970).
- 94 Harrison VR, Eckels KH, Bartelloni PJ, Hampton C. Production and evaluation of a formalin-killed Chikungunya vaccine. *J. Immunol.* 107, 643–647 (1971).
- 95 Levitt NH, Ramsburg HH, Hasty SE *et al.* Development of an attenuated strain of chikungunya virus for use in vaccine production. *Vaccine* 4, 157–162 (1986).
- 96 McClain DJ, Pittman PR, Ramsburg HH *et al.* Immunologic interference from sequential administration of live attenuated alphavirus vaccines. *J. Infect. Dis.* 177, 634–641 (1998).
- 97 Edelman R, Tackett CO, Wasserman SS *et al.* Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 681–685 (2000).
- **References 61, 97 and 98 illustrate the molecular design of future safe and recombinant vaccines against Chikungunya, now highly warranted.**

#### Websites

- 101 ProMED mail archive number 0100226.0637  
www.promedmail.org
- 102 Chikungunya à La Réunion  
www.invs.sante.fr/regions/reunion\_mayotte/pe\_rm\_chik\_34\_200510.pdf

***Article 3: Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response.***

Je suis co-premier auteur de cet article publié en 2010 dans le *Journal of Immunology*.

J'ai pu obtenir un financement PHRC pour débiter cette étude en Janvier 2007 en collaboration avec l'équipe du Pr Brigitte Autran de la Salpêtrière (INSERM U543/945) et celle de l'équipe du Pr Hugues Tolou (IMTSSA, Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées)). L'inclusion et le suivi sur deux ans de patients atteints de CHIKV ont permis d'identifier deux cohortes de patients, guéris et ceux qui ont développés des arthralgies/artrites chroniques. L'étude de ces patients sur plusieurs mois (de la phase aiguë à 12-18 mois post-infection) a permis d'apporter des éléments qui permettent de proposer un modèle de manifestations immuno-pathologiques de la maladie liées à l'infection virale :

Les caractéristiques clinico-biologiques qui nous ont permis de décrire d'une part les phénomènes immunopathologiques lors de la phase aiguë, et d'autre part l'évolution vers la guérison ou la chronicité, ont été analysées et suivies chez 49 patients. La difficulté du suivi, la difficulté de classement de certains patients (patients en cours de guérison ou phase d'amélioration temporaire de patients souffrant de forme chronique), l'inclusion des patients en phase aiguë ou en phase chronique, expliquent l'inhomogénéité du suivi des 49 patients, et donc la déclinaison de sous-groupes pour l'étude des différents paramètres. Chez les 49 patients, le statut immunitaire ainsi que leur suivi vis-à-vis du CHIKV a été établi et permis de montrer que l'immunité humorale acquise était solide et que les rechutes cliniques chez les patients chroniques n'étaient pas liées à une nouvelle virémie.



La réaction immunitaire systémique :

La réponse immunitaire cellulaire par phénotypage a été décrite à T0 chez un seul patient dont l'évolution a abouti à la guérison (en raison des difficultés matérielles de conservation des cellules), chez 9 patients dont l'évolution s'est faite vers la chronicité et 10 sujets sains contrôles. Lors de la phase aiguë de la maladie, la réponse immunitaire innée cellulaire est dominée par les cellules NK, massivement activées (CD3-CD56+CD69+), constituant ainsi la première ligne de défense contre les cellules infectées. Par contre, les DCs en nombre normal ne semblent pas activées (CD80-), bien que l'on observe une légère amplification des pDCs ((Lin-CD11c-HLA-DR+). On observe une augmentation de l'activation des cellules T néanmoins en nombre normal (CD3+CD69+) ainsi qu'une mobilisation des cellules effectrices/mémoire B (CD19+CD27+IgD-). Ces niveaux d'activation des cellules NK, DCs, T et B reviennent rapidement à la normale en 3-6 mois.

L'étude phénotypique des PBMCs des patients chroniques versus guéris au cours de la phase initiale de la maladie ne montre pas de différence notable hormis une activation CD4/CD8 plus importante chez les chroniques.

Chez 32 patients suivis à T0 puis à un ou plusieurs points (J15, S6 (semaine 6), M3, 6, 12 (mois 3, 6, 12)), on observe une réponse IFN- $\gamma$  marquée à T0 (ELISA) parallèle à l'activation des cellules NK. L'IL-12 qui est essentiel pour l'activation des cellules NK reste élevé chez les patients chroniques (n = 9) alors que son taux revient à la normale dès le 15ème jour chez les patients guéris (n = 6). De même, l'expression transcriptionnelle de l'INF- $\alpha$  (ARNm) dans les PBMCs de patients chroniques (n = 9) est élevée à T0 et reste importante 6 et 12 mois post-

infection, alors qu'elle est indétectable chez les patients guéris (n = 6). La persistance d'IL-12 sérique et de l'expression de l'IFN- $\alpha$  dans les PBMCs est le témoin d'une activation persistante des cellules immunes chez les patients chroniques.

Mais cette production d'IFN de type I n'est pas accompagnée d'une réaction cytokinique de type inflammatoire complète. En effet, on observe de façon surprenante, des taux circulants extrêmement faibles de cytokines proinflammatoires Th1, tels que le TNF- $\alpha$  ou l'IL-8 lors de la phase aiguë chez l'ensemble des patients (n = 32). Même si la réponse est globalement plus marquée chez les patients chroniques (n = 26) comparés aux guéris (n = 6) à T0, la différence n'est statistiquement pas significative. De même, les cytokines anti-inflammatoires Th2, comme l'IL-4 ou l'IL-10 sont exprimées à des niveaux très faibles. L'analyse transcriptomique des cytokines confirme l'absence d'expression d'IL-4, IL-13, IL-6, et d'IL-1 $\alpha$ . Au total, de façon surprenante, l'activation importante des cellules NK/pDCs/T/B ne s'accompagne pas d'une explosion de la réponse cytokinique.

La réaction immune tissulaire :

L'analyse des tissus et de liquides synoviaux, en particulier d'un hygroma chez un patient 18 mois post-infection CHIKV a permis :

Dans le liquide synovial, de caractériser la réaction cellulaire composée essentiellement de monocytes (50% de cellules CD14+), de macrophages vacuolaires, de cellules NK activées et de cellules T. La présence de MCP1/CCL2, d'IL-6 et d'IL-8 (protéines et ARNm) associée est en faveur d'une circulation des monocytes/macrophages dans le tissu synovial. Cette réaction inflammatoire est différente de celle décrite dans la polyarthrite rhumatoïde dans laquelle on retrouve une réaction cellulaire à polynucléaires ainsi que des cytokines pro-inflammatoires.

Moins de 5% des monocytes ont été retrouvés CHIKV+ à l'immunomarquage par des anticorps monoclonaux anti-protéines virales (E et capside).

L'étude histologique de la synoviale a mis en évidence une hyperplasie fibroblastique, une prolifération vasculaire (CD31+) ainsi qu'une infiltration macrophagique CD18+ essentiellement périvasculaire. On note la présence de lymphocytes CD4+ ou CD56+. Les lymphocytes CD8+ cytotoxiques sont extrêmement rares, et les lymphocytes B CD19+ ne sont pas détectés. Par contre, les cellules NK quiescentes ou activées (NKp46 et NKp44 respectivement) sont distribuées en clusters dans le tissu. L'immunomarquage CHIKV utilisant deux anticorps monoclonaux différents a identifié les macrophages périvasculaires CD18+ comme les cellules infectées. De façon très intéressante, une apoptose (détection de PARP clivé) a été mise en évidence dans les fibroblastes dans les mêmes coupes tissulaires. La présence *in situ* du CHIKV a été confirmée par RT-PCR (et séquençage du produit) de E1 et de Nsp2. Par ailleurs, la transcription de l'IFN- $\alpha$  (ARNm) témoigne de la présence de matériel viral dans le tissu synovial. Nous avons aussi détecté des taux élevés de métallo-protéase MMP2 qui pourrait contribuer aux lésions tissulaires et à la fibrose.

Les résultats de ce travail apportent un éclairage à la compréhension de l'arthrite chronique post-CHIKV. Concernant la réponse immune, nous avons identifié l'importante réponse NK, entraînant rapidement une coopération cellulaire T4/T8, ainsi qu'une activation de pDCs au cours de la phase aiguë. Nous avons aussi décrypté la réponse moléculaire de la réponse immune comme une réponse modérée de type Th1/Th2. La caractéristique de l'arthrite chronique est associée à la persistance de production d'Il-12 circulant et de la transcription d'IFN- $\alpha$  des PBMCs. L'analyse histologique et les immunomarquages des liquides et de tissus synoviaux de patients nous a permis d'identifier du matériel viral à l'intérieur des macrophages, et de définir

les lésions associées, à type d'hyperplasie fibroblastique, d'angiogénèse, et de lésions tissulaires probablement dues à la sécrétions de métallo-protéases.

Ma participation dans ce travail :

Inclusion des patients, gestion et suivi clinique et biologique, gestion de la bibliothèque

RT-PCR CHIKV

ELISA CHIKV et cytokines

RT-PCR des cytokines,

Immunomarquages



## Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response

Jean-Jacques Hoarau,<sup>\*,†,1</sup> Marie-Christine Jaffar Bandjee,<sup>\*,†,‡,1</sup> Pascale Krejbich Trotot,<sup>†,‡</sup> Trina Das,<sup>†,‡</sup> Ghislaine Li-Pat-Yuen,<sup>\*</sup> Bérengère Dassa,<sup>\*</sup> Mélanie Denizot,<sup>†,‡</sup> Elsa Guichard,<sup>\*</sup> Anne Ribera,<sup>§</sup> Tawfiq Henni,<sup>¶</sup> Frank Tallet,<sup>\*</sup> Marie Pierre Moiton,<sup>||</sup> Bernard Alex Gauzère,<sup>†,¶</sup> Sandrine Bruniquet,<sup>\*</sup> Zainoul Jaffar Bandjee,<sup>\*\*</sup> Philippe Morbidelli,<sup>††</sup> Gérard Martigny,<sup>††</sup> Michel Jolivet,<sup>‡‡</sup> Frederick Gay,<sup>§§</sup> Marc Grandadam,<sup>¶¶</sup> Hugues Tolou,<sup>¶¶</sup> Vincent Vieillard,<sup>|||</sup> Patrice Debré,<sup>|||</sup> Brigitte Autran,<sup>|||</sup> and Philippe Gasque<sup>\*,†,‡,|||</sup>

Alphaviruses, including Chikungunya virus (CHIKV), produce a transient illness in humans, but severe forms leading to chronic incapacitating arthralgia/arthritis have been reported by mechanisms largely ill-characterized. The pathogenesis of CHIKV was addressed in a prospective cohort study of 49 hospitalized patients from Reunion Island subsequently categorized into two distinct groups at 12 mo postinfection. Comprehensive analyses of the clinical and immunological parameters throughout the disease course were analyzed in either the "recovered" or the "chronic" groups to identify prognostic markers of arthritis-like pathology after CHIKV disease. We found that the chronic group consisted mainly of more elderly patients (>60 y) and with much higher viral loads (up to  $10^{10}$  viruses per milliliter of blood) during the acute phase. Remarkably, a rapid innate immune antiviral response was demonstrated by robust dendritic/NK/CD4/CD8 cell activation and accompanied by a rather weak Th1/Th2 cytokine response in both groups. Interestingly, the antiviral immune response witnessed by high levels of IFN- $\alpha$  mRNA in PBMCs and circulating IL-12 persisted for months only in the chronic group. CHIKV (RNA and proteins) was found in perivascular synovial macrophages in one chronic patient 18 mo postinfection surrounded by infiltrating NK and T cells (CD4<sup>+</sup> but rare cytotoxic CD8). Fibroblast hyperplasia, strong angiogenesis, tissue lesions given the high levels of matrix metalloproteinase 2, and acute cell death [high cleaved poly (ADP-ribose) polymerase staining] were observed in the injured synovial tissue. These observed cellular and molecular events may contribute to chronic arthralgia/arthritis targeted by methotrexate used empirically for effective treatment but with immunosuppressive function in a context of viral persistence. *The Journal of Immunology*, 2010, 184: 5914–5927.

Alphaviruses are globally distributed and are maintained in nature by continuous cycles of transmission between mosquitoes and vertebrate hosts, such as mammals (for review, see Refs. 1–3). Bites by infected mosquitoes can result in epidemic infections of humans, with most cases occurring after seasonal rains when mosquito numbers are high. Human diseases and pathological mechanisms caused by the African and Asian arthritogenic alphaviruses have not been extensively studied because they largely occur in underdeveloped or developing countries, where they often do not represent a major health priority.

Chikungunya virus disease (CHIKVD), which has affected as many as 3–4 million people in the Indian Ocean zone and spread to continental Europe in 2005–2007, has received recently considerable attention, and many parallels may be drawn between CHIKVD and the other alphaviral arthritides, such as Ross River virus (RRV) disease (4–10). Classically, infected people adopt a characteristic stooped walking position, which is the hallmark of the disease and from which it derives its name "Chikungunya," meaning "to walk bent over," in the Kimakonde language of Mozambique. The classic clinical symptoms are abrupt febrile

<sup>\*</sup>Biology/Microbiology/Virology/Biochemistry Units, <sup>†</sup>Rheumatology Unit, <sup>‡</sup>Hematology and Oncology Unit, <sup>§</sup>Medicine Unit, <sup>¶</sup>Intensive Care Unit, <sup>\*\*</sup>Orthopaedic Surgery Unit, <sup>††</sup>Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, and <sup>|||</sup>Groupe de Recherche Infection et Immunopathologie, Centre Hospitalier Régional Nord-Félix-Guyon and Cyclotron Réunion Océan Indien, Université de la Réunion, St. Denis; <sup>||</sup>Hospital Gabriel Martin, St. Paul, Ile de la Réunion; <sup>‡‡</sup>Biomérieux, Marcy l'Etoile; <sup>§§</sup>Department of Tropical and Infectious Diseases, Pitié-Salpêtrière Hospital, Pierre and Marie Curie University; <sup>¶¶</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U543, Pitié-Salpêtrière Hospital, University Paris 6, Paris; and <sup>¶¶</sup>Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées, Laboratoire Associé au Centre National de Référence des Arbovirus, Marseille, France

<sup>1</sup>J.J.H. and M.-C.J.B. contributed equally to this work.

Received for publication January 26, 2009. Accepted for publication March 11, 2010.

This work was supported by a Programme Hospitalier de Recherche Clinique grant, an Agence Nationale pour la recherche project in collaboration with Prof. B. Autran, a research project from Ministère de l'Outre-Mer, and from university funding (Programme Pluri-Formation).

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0900255

Address correspondence and reprint requests to Prof. Philippe Gasque, Groupe de Recherche Infection et Immunopathologie, 15 Avenue René Cassin, Université de la Réunion, St. Denis, Ile de la Réunion. E-mail address: gasque@univ-reunion.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this paper: CHIKV: Chikungunya virus; CHIKVD: CHIKV disease; CHR, Centre Hospitalier Régional; CRP, C-reactive protein; Ct, threshold cycle; D, day; ECD, R-Phycocerythrin-Texas Red; IMTSSA, Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées; LBG, Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire; M, month; MMP2, matrix metalloproteinase 2; PAMP, poly (ADP-ribose) polymerase; PI, postinfection; qRT-PCR, quantitative RT-PCR; RA, rheumatoid arthritis; RRV, Ross River virus; T0, day of the first visit; TCID50, tissue culture infectious dose 50; W, week.

Copyright © 2010 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/10/184-5914-09\$16.00

illness (temperature usually  $>38.9^{\circ}\text{C}$ ), polyarthralgia ( $>90\%$  of cases), and maculopapular rash (a form of microvasculitis, more than one third of cases). The pain can be excruciating and is usually symmetrical and involved more than one joint. Fingers, wrists, elbows, toes, ankles, and knees are most commonly affected as described for most of the alphaviruses (4). Previously injured joints are especially susceptible. Paresthesia (numbness and tingling) in the skin covering affected joints has also been described, although the joints are often swollen there are usually no other signs of inflammation (11, 12). The other symptoms include myalgia, headache, edema of the extremities, and gastrointestinal complaints (11–13). The incubation period for CHIKV ranges from 3 to 7 d, in agreement with data from other alphaviruses (14), and as few as 5% of asymptomatic CHIKVD cases were generally reported.

Remarkably, the epidemic of CHIKVD in La Réunion Island in a nonimmune population has revealed exceptional forms of the disease (e.g., mother-to-child transmission associated with encephalitis and deaths and extensive bullous eruption) and severe complications in adults, such as persistent arthralgia, destructive arthritis, hepatitis, autoimmune neurologic pathologies (Guillain Barré), cardiologic manifestations, and deaths (7, 9, 15–20).

The CHIKV infection is characterized by a strong viremia ( $10^8$  up to  $10^{12}$  viruses per milliliter of blood as established by real-time PCR techniques) (6), inducing an acute disease and an immune response that should, in principle, limit the duration of the infection. High viral load is more likely to be detected in newborns and elderly CHIKV disease patients, but to what extent can this contribute to increased pathogenesis remains to be addressed (21). Interestingly, and in contrast to Dengue virus, the apparition of IgG anti-CHIKV Abs was detected in the first week (even at day 2 in some patients) following infection and illustrating the rapid seroconversion and robust adaptive immune response (8). Clinical biological laboratory parameters (e.g., acute phase proteins, such as C-reactive protein [CRP] and complement) remained largely within the normal ranges, although major lymphopenia and moderate thrombocytopenia characterized the acute infectious phase of CHIKV fever (11, 12, 22).

The acute signs and symptoms usually resolve in less than 2 wk, but arthralgia may linger for weeks, months, or even years, and this is a clinical sign that may distinguish CHIKV from Dengue virus infection. Typically, the joint symptoms occurred in a fluctuating manner but did not change anatomical location. Chronic incapacitating arthritis has already been described for several alphaviruses (1, 2, 4, 23), and rheumatic manifestations in 10–20% of the CHIKV patients typically consisted of a febrile arthritis mainly affecting the extremities (ankles, wrists, or phalanges) (11, 16, 20, 24–26). Pain within or around tendons was also a common trait and evolving to tenosynovitis or enthesopathy but rarely to joint synovitis by ill-characterized mechanisms. Recently, Chopra et al. (27) reported high levels of CHIKV IgM in a cohort of Indian patients with post-CHIKV rheumatoid arthritis (RA)-like illnesses. These patients were clearly naive for musculoskeletal disorders prior to CHIKV infection. Over 90 down to 60% of the patients were IgM<sup>+</sup> in a period of 30–180 d postinfection (PI), and interestingly, 5–10% of patients with CHIKV arthritis were also positive for rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide. This study did not reveal any major RA classic erosions of the cartilage and bones, and hence the post-CHIKV RA is reminiscent of but distinguishable from autoimmune RA. Some inflammatory processes were suggested by high levels of CRP (in  $>70\%$  of the cohort, mean of 15 mg/l) and necessitating effective treatment regimes, such as hydroxychloroquine, methotrexate, sulfasalazine, and some corticoids, for a period of up to 6 mo (27). The persistence of the specific IgM response months after the initial infection has already been ob-

served for several alphaviruses and may be related to viral persistence but through poorly understood mechanisms (28).

The host response to viral infection represents a complex orchestration of divergent pathways designed to eradicate the virus and benefit the host. However, many pathways that are involved in antiviral defense can also have untoward effects on the host, including NK cell and CTL hyperresponses, cytokine hyperresponses, and severe apoptosis, resulting in either dysfunction or death of infected or neighboring uninfected cells. Thus, the most effective defense response needs to be sufficiently lethal to rapidly kill invading pathogens, but it is essential, at the same time, to avoid collateral damage to the host by anti-inflammatory mechanisms, which remain largely ill-characterized in CHIKVD.

Alternatively, virus persistence could be linked to immune inefficacy, viral escape phenomenon, or both. Understanding to what extent protective and pathogenic immune mechanisms are present in CHIKVD and contributing to chronic arthralgia/arthritis is critical to have a better insight into the pathology and possible therapeutic routes targeting the possible viral sanctuaries and chronic inflammation. Therefore, an important challenge in understanding the pathogenesis of CHIKV infection was the elucidation of specific host and viral responses in acute and long-lasting conditions to distinguish patterns between patients who either “recovered” or suffered from “chronic” arthralgia 12 mo after the initial insult.

## Materials and Methods

### *Patients and clinical follow-up of the chronic cohort*

Patients with clinically acute CHIKVD leading to chronic polyarthralgia were prospectively selected from a large cohort of hospitalized patients (French clinical research hospital program, 2006–2010) during the 2006–2007 outbreaks in La Réunion. These patients were selected to address specifically the mechanisms involved in the long-term physiopathology of CHIKVD and particularly in chronic settings. Informed consent was obtained from CHIKVD patients and healthy volunteers from the local medical hospital (Centre Hospitalier Régional [CHR] Nord Félix-Guyon, St Denis, and local hospital, St. Paul, Ile de la Réunion). All of the biological assays, in particular the levels of proinflammatory cytokines, were also performed in nine patients (so-called positive inflammatory controls) with either CMV or bacterial infections and eight healthy controls (Supplemental Table I). The healthy controls were obtained from the hospital staffs and enrolled with consent. The study was performed with the permission of the coordinating ethics committee of University of Tours (Comité Consultatif de Protection des Personnes se prêtant à des Recherches Biomédicales, Tours and Bordeaux, France). All of the patients and controls were screened by RT-PCR for E1 viral RNA or for the presence of anti-CHIKV IgM/IgG Abs as tested by ELISA (see data listed in Supplemental Table I). The protocol, the sensitivity, and the specificity of these assays have already been reported (29). Briefly, RT-PCR detection of the viral genome was performed after extraction from 200  $\mu\text{l}$  serum either manually using the Viral QIAamp RNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) or the MagNa Pure automated system (Roche Diagnostics, Meylan, France) using the High Pure Viral RNA kit (Roche Diagnostics). RT-PCR was performed with the SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq kit (Invitrogen, Cergy Pointoise, France). Results are expressed from the threshold cycle (Ct) values. Ct  $>41$  cycles was considered as negative for the presence of CHIKV RNA.

The detection of anti-CHIKV IgM was performed by an immunocapture method (Mac-ELISA) according to the techniques and reagents of the National Reference Center of Arboviruses in Lyon, France, as well as the Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées (IMTSSA) in Marseille, France. Briefly, serum IgM was captured by an anti-human IgM (Sigma-Aldrich, I-2386), followed by the addition of CHIKV Ag and detected by hyperimmune murine ascites. Finally, the visualization was performed with an anti-mouse Ab conjugated to peroxidase. (Sigma-Aldrich, A-0168) (16, 29). In our hands, the IgM and IgG OD values of healthy subjects screened as negative controls were  $<0.01$ .

Clinical examinations and biological evaluations of the patients were carried out from the first days of clinical acute infection (T0, day of the first visit, i.e., day of referral) and associated with high fever, rash, and arthralgia. Follow-ups were performed at day (D) 15, week (W) 6, and month (M) 3, M6, and M12 PI. The sex ratio of the CHIKVD cohort was 0.63 with 30 women for 19 men, and the mean age was 60.3 y (range 19–90). No



obvious premorbid medical history was reported apart from a high incidence of metabolic diabetes in 34.7% of the CHIKVD cohort. Patient 21 (male, 59 y old) suffering from chronic arthralgia due to CHIKVD relapses and requesting surgery to remove his hygroma was also tested M18 PI. We used the connective tissue biopsies from the surgery to ascertain the presence of the virus and the host inflammatory response in situ. All of the donors provided plasma and serum, and PBMC samples were prepared and stored at  $-80$  and  $-150^{\circ}\text{C}$ , respectively, before use. Levels of several biological and cellular surrogate markers were tested. These included markers of cytopenia (neutrophil, platelet, and lymphocyte cell counts) and liver, muscle, and kidney tissue damage (acute phase response, CRP and complement). The inflammatory status was established by immunophenotyping, ELISA of serum samples, and RT-PCR analyses of PBMCs as described below.

#### Flow cytometry and immunophenotyping of PBMCs

FACS analysis was limited to only few patients subsequently found to belong to the chronic group ( $n = 8$ ) and only one patient from the recovered group. Hence, statistical analyses of the FACS data could not be performed. Typically, PBMCs were isolated by Ficoll-Histopaque (Sigma Diagnostics, St. Quentin Fallavier, France) density gradient centrifugation from whole blood collected in Vacutainers containing acid citrate dextrose anticoagulants. Cells were characterized by immunofluorescence staining. A total of  $100\ \mu\text{l}$  whole blood was mixed with a combination of two or three Abs directed against cell surface markers, labeled with R-Phycoerythrin-Texas Red (ECD), R PE, or FITC. Twelve combinations of Abs were used as follows: CD45-ECD (Beckman Coulter, Villepinte, France, A07784)/CD14-PE (Beckman Coulter, A07764); HLA-DR-ECD (Beckman Coulter, IM3636)/CD11c-PE (Beckman Coulter, IM1760)/Lin 1-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA, 340546); HLA-DR-ECD (Beckman Coulter, IM3636)/CD80-PE (Beckman Coulter, 1976)/Lin 1-FITC (BD Biosciences, 340546); CD3-ECD (Beckman Coulter A07748)/CD4-PE (Beckman Coulter, A07751)/CD8-FITC (Beckman Coulter, A07756); HLA-DR-ECD (Beckman Coulter, IM3636)/CD4-PE (Beckman Coulter, A07751)/CD8-FITC (Beckman Coulter, A07756); CD3-ECD (Beckman Coulter, A07748)/TCR Pan  $\alpha/\beta$ -PE (Beckman Coulter, 1467)/TCR Pan  $\gamma\delta$ -FITC (Beckman Coulter, 1571); CD4-ECD (Beckman Coulter, 6604727)/CD45RA-PE (Beckman Coulter, 1834)/CD62L-FITC (Beckman Coulter, 1231); CD8-ECD (Beckman Coulter, 737661)/CD45RA-PE (Beckman Coulter, 1834)/CD62L-FITC (Beckman Coulter, 1231); CD8-ECD (Beckman Coulter, 737661)/CD38-PE (Beckman Coulter, IM1832)/CD57-FITC (Beckman Coulter, 0466); CD19-ECD (Beckman Coulter, A07770)/IgD-PE (BD Biosciences, 555779)/CD27-FITC (BD Biosciences, 555440); CD19-ECD (Beckman Coulter, A07770)/CD5-PE (Beckman Coulter, A07753)/CD23-FITC (Beckman Coulter, IM0529); CD3-ECD (Beckman Coulter, A07748)/CD56-PE (Beckman Coulter, A07788)/CD69-FITC (BD Biosciences, 555530). All of the Abs were from Beckman Coulter (Villepinte, France) except CD69-FITC, IgD-PE, CD27-FITC, and Lin 1-FITC that were from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Cells were analyzed by flow cytometry (Beckman Coulter EPICS XL-MCL Flow Cytometer, System II acquisition software and CXP analysis software, version 2.2) after treatment with Beckman Coulter's ImmunoPrep Reagent Systems using the TQ-Prep Workstation.

#### Viral particle quantification

We used a viral isolate (clone CHIKV no. 4) amplified from a CHIKVD serum sample (isolated during the 2006 epidemic) by a single passage on Vero cells (Supplemental Fig. 1). One-step RT-PCR was used to amplify the *E1* gene, the amplicon was sequenced, and the nucleotide sequence of this clone was found to be similar to that of the Reunion strain (17). After complete cell death, the culture medium was filtered ( $0.2\ \mu\text{m}$ ) and separated into aliquots at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. The viral titer of the CHIKV suspension was established by serial dilutions on Vero cells (to evaluate PFU and tissue culture infectious dose 50 [TCID<sub>50</sub>]) and by quantitative RT-PCR of the infected cell culture supernatants using a plasmid containing the *E1* insert as a standard (kindly provided by Prof. X. de Lamballerie, Marseille, France). With the quantitative RT-PCR (qRT-PCR) assay, the viral titer was evaluated at  $3 \times 10^{11}$  per milliliter equivalent viral particles. For the TCID<sub>50</sub> assay, serially diluted ( $10^{-1}$ – $10^{-7}$ ) samples of the virus were added to confluent Vero cells ( $2 \times 10^6$  in  $100\ \text{ml}$ ) cultured in 96-well plates. Cytopathic effect at 24 h was evaluated in each well using the MTT assay as described. In vitro titer was estimated at  $10^8$  TCID<sub>50</sub> per milliliter.

#### Abs and immunocytochemistry

Primary Abs listed below were used to detect CHIKV-infected cells and the associated cytopathic activities such as apoptosis: human antisera against CHIKV (named FDO), monoclonal mouse anti-CHIKV (clones C6 and 4F,

Biomérieux, Craponne, France and IMTSSA, Marseille, France), polyclonal rabbit anti-cleaved poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) (BioVision, Mountain View, CA, 3140), polyclonal rabbit anti-cleaved PARP (Promega, Charbonnières-les-bains, France, G7341), monoclonal mouse anti-PARP clone C-2-10 (BioVision, 3001), polyclonal rabbit anti-CD14 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, sc-9150), polyclonal anti-CD248 [in house (30)]. Secondary Abs were: goat anti-rabbit or anti-mouse IgG (H+L) HRP-conjugated (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France, 172-1019 and 170-1011), goat anti-human IgG (Fc-specific) HRP-conjugated (Sigma-Aldrich, A-0170). Goat anti-mouse Alexa Fluor 488 and goat anti-rabbit Alexa Fluor 594 were from Invitrogen Molecular Probes (Cergy Pontoise, France). Rhodamine- or FITC-conjugated goat anti-rabbit and donkey anti-mouse were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). FITC-conjugated goat anti-human IgG Fab-specific was from Sigma-Aldrich. Fluorescence was observed under a Eclipse E2000-U microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France), magnification  $\times 400$ . Images were obtained using the Digital Sight PS-U1 camera system (Nikon) and the imaging software NIS-Element AR (version 2.3).

For immunohistology, fresh-frozen sections from surgical biopsies (hygroma and connective synovial tissues) were incubated overnight with the relevant primary Ab (anti-CHIKV or anti-cell markers) or isotype control at room temperature using the manufacturer's recommended dilutions. Sections were then incubated in secondary Abs either conjugated to Alexa Fluor 488, FITC, tetramethylrhodamine isothiocyanate, or HRP at a 1:200 dilution. Sections were stained using the immunoperoxidase 3-amino-9-ethylcarbazole protocol or observed for immunofluorescence. NK cell populations in CHIKVD biopsies were detected by immunostaining with either anti-NKp46 Ab (R&D Systems, Minneapolis, MN) or anti-NKp44 (produced in house, Dr. V. Vieillard). The level of macrophage/T cell infiltration and angiogenesis was evaluated by immunostaining with mouse anti-CD18 (clone MEM48), anti-CD43 (clone MEM59), anti CD4 (MEM115), anti-CD8 (MEM146), anti-CD31 (clone MEM05), and anti-CD141 (BD Biosciences, 559780), respectively. All of the MEM clones were kindly provided by Prof. Vaclav Horejsi (Institute of Molecular Genetics, Praha, Czech Republic).

#### Western blot analysis of CHIKV infection and apoptosis

Cells were harvested with a scraper and resuspended in lysis buffer ( $1 \times$  PBS, 1% Triton X-100, and 1 mM EDTA) containing a protease inhibitor mixture (5 mg/ml PMSF, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pepstatin A, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin; Sigma-Aldrich). Approximately 50  $\mu\text{g}$  of each sample was loaded onto a 4–12% NuPAGE gel from Invitrogen. Membranes were incubated overnight with the different Abs: anti-CHIKV (FDO), anti-cleaved PARP (Promega), anti-CD248, and anti-CD46 (both in house). After three washes in PBS/1% Tween, membranes were incubated 2 h with HRP-conjugated secondary Ab, washed again, and visualized with the Vector NovaRED Detection Kit (Vectorlabs, Peterborough, U.K.).

#### RT-PCR and qRT-PCR

Total RNA was extracted directly from various tissues, cells, or cell culture supernatant using TRIzol reagent (Invitrogen). For RT-PCR, a one-step RT was performed in a final volume of 20  $\mu\text{l}$  containing 0.5  $\mu\text{g}$  extracted total RNA per reaction, 10  $\mu\text{l}$  of  $2 \times$  ThermoScript Reaction Mix buffer (Invitrogen), 10  $\mu\text{M}$  of each primer (see Table I for primers list), 8 U of RNase inhibitor (RNasin, Promega), 0.5 U uracil-DNA-glycosylase (dot no. 12958220, Roche Diagnostics, Meylan, France), and 0.8  $\mu\text{l}$  ThermoScript Plus/Platinum Taq Enzyme Mix (Invitrogen). RT-PCR was carried out in Mastercycler Gradient (Eppendorf Hamburg, Germany) with the following steps: reverse transcription at  $50^{\circ}\text{C}$  for 30 min and 25 cycles of PCR ( $94^{\circ}\text{C}$  for 30 s, annealing at  $60^{\circ}\text{C}$  for 30 s, and amplification at  $72^{\circ}\text{C}$  for 1:30 min). Final extension was carried out at  $72^{\circ}\text{C}$  for 4 min, and finally samples were kept at  $4^{\circ}\text{C}$ . The size and the purity of the RT-PCR product was checked via 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized with ethidium bromide. We used the ImageQuant TL software, version 2005, to calculate the size and to semiquantify the amount of each PCR product. GAPDH was used as the housekeeping gene, and all of the data were expressed compared with the GAPDH signal.

For qRT-PCR, cDNA synthesis was performed on 0.5  $\mu\text{g}$  total RNA using the RT<sup>2</sup> First Strand Kit (SuperArray C-03 kit; Bioscience Corporation, TEBU Bio, Le Perray en Yvelines, France). Relative abundances of 84 specific mRNA sequences were determined by real-time fluorescent SYBR green PCR, using the Human Chemokines and Receptors RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Kit (SuperArray APhS-022A Kit; Bioscience Corporation). Nucleic acid amplification was performed on an ABI Prism 7000 Sequence Detection System with the 7000 SDS software, version 1.2.3 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). The fold-change versus

control for each gene was calculated with the  $\Delta\Delta Ct$  method using the RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis Template, version 3.0 (SuperArray, Bioscience Corporation). Briefly,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{patient}) - \Delta Ct(\text{healthy control})$  with  $\Delta Ct = \text{average } Ct - \text{average of housekeeping genes' } Ct$  (GAPDH, actin). The fold-change for each gene between the patient and the control is calculated as  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

**ELISA and Ab array**

Chemokine and cytokine serum levels were detected by ELISA using IL-1 $\beta$  (BMS224/2), IL-2 (BMS221/2), IL-4 (BMS225/3), IL-6 (BMS213/2), IL-8 (BMS204), IL-10 (BMS215/2), IL-12 (BMS261/2), IL-13 (BMS231/2), IFN- $\alpha$  (BMS216), IFN- $\gamma$  (BMS228), and TNF- $\alpha$  (BMS223/3) ELISA module sets (Bender MedSystems, TEBU Bio, France). When only small volumes of biological samples were available (e.g., synovial fluid), we used the Ab array technology to measure the levels of cytokines, growth factors, and chemokines according to the manufacturer's protocol (RayBio Human Cytokine Ab Membrane Array III, TEBU Bio, France). Fifty microliters of serum or synovial fluid was incubated with the membrane spotted with the different Abs followed by the secondary Ab mix, and the revelation was carried out by ECL (GE Healthcare, Saclay-Orsay, France).

**Statistical analysis**

All of the results are expressed as mean  $\pm$  SD and as percentages. The quantitative variables are not normally distributed. As a consequence, the nonparametric tests using exact calculation rather than asymptotic ones have been applied by using StatXact software, version 6 (Cytel Studio, Cambridge, MA). Without any certitude regarding the hypothetical direction of the relation, all of the tests have been interpreted based on a two-tailed *p* value. The  $\alpha$  risk has been chosen at 5%. The Bonferroni correction has been taken into account according to the number of tests done.

Regarding the quantitative variables, the comparison between different groups has been tested by using the Mann-Whitney *U* exact test. The Fischer's exact test has been applied to the categorical variables. All *p* values  $\leq 0.05$  were considered statistically significant.

**Results**

*Clinical features of CHIKVD patients leading to prominent chronic arthralgia*

Of the 49 hospitalized CHIKVD patients with viral, immunological, and clinical histories, 32 (65%) were tested from the initial period of infection (ranging from 4 to 5 d of symptoms and considered as T0) and up to M12–M18 PI (Supplemental Table I). The other patients were either not willing to contribute to follow-up studies or they were hospitalized but were not enrolled in the cohort study during the acute phase of the disease. The acute infection was always associated with fever ( $38.1 \pm 1^\circ\text{C}$ ). The diagnosis was validated either from the RT-PCR data (detection of *EJ* RNA) (Table I) and/or by ELISA to screen for specific IgM and IgG anti-CHIKV Abs. Nineteen out of 32 hospitalized patients tested at T0 were positive for CHIKV by RT-PCR. No positive RT-PCR result was found at D15, clearly indicating that the virus was rapidly cleared from the systemic blood circulation. We performed standard virus isolation techniques on Vero cells and found that all of the RT-PCR-positive samples yielded a viral clinical isolate capable of developing cytopathic activities (Supplemental Fig. 1). Interestingly, we found that CHIKV-infected Vero cells were

Table I. List of primers used for the RT-PCR gene profiling

Name	Sequence (5' → 3')	Sequence Reference	Amplicon	Position (bp)
Hu IFN- $\gamma$ _F	TTCCAGCTCTGCATCGTPTTG	NM_000619	375	155–174
Hu IFN- $\gamma$ _R	CATGTATTGCTTTGCGTTGG			529–510
Hu IL-8_F	TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG	NM_000584	229	147–166
Hu IL-8_R	ACTTCTCCACAACCCCTCTGC			375–356
Hu IL-12_F	CACCTCCAGACCAGGAATGT	NM_000882	293	401–420
Hu IL-12_R	TACTAAGGCACAGGGCCATC			693–674
Hu IL-10_F	TTACCTGGAGGAGGTGATGC	NM_000572	293	326–345
Hu IL-10_R	ATAGAGTCCGCCACCCCTGATG			618–599
Hu IL-4_F	TGCCTCCAAGAACAACAACCTG	NM_000589	219	544–563
Hu IL-4_R	CTCTGGTTGGCTTCCCTTCAC			762–743
Hu IL-13_F	GGTCAACATCACCCAGAACCC	NM_002188	240	164–183
Hu IL-13_R	TTTACAACCTGGGCCACCTC			403–384
Hu TGF- $\beta$ 1_F	CTATCCACCTGCAAGACTATCGAC	NM_000660	777	955–978
Hu TGF- $\beta$ 1_R	GGAGCTGAAGCAATAGTTGGTGC			1731–1703
Hu IL-1 $\alpha$ _F	GTCTCTGAATCAGAAATCCCTTCTATC	NM_000575	421	1044–1069
Hu IL-1 $\alpha$ _R	CATGTCAAATTTCACTGCTTCATCC			1464–1440
Hu MCP-1_F	CAATAGGAAGATCTCAGTGC	NM_002982	188	190–209
Hu MCP-1_R	GTGTTCAAGTCTTCGGAGTT			377–358
Hu IFN- $\alpha$ _F	CAGGAGGAGTTTGATGGCAACCAG	NM_021057	314	228–250
Hu IFN- $\alpha$ _R	GACAACCTCCCAGGCACAAGGGC			541–519
Hu TNF $\alpha$ _F	GGAGACCCCTCCAGATAG	NM_000594	514	770–751
Hu TNF $\alpha$ _R	TGCTTGTTCCTCAGCCCTTT			257–276
Hu IL-1 $\beta$ _F	TCITTTCAACACGCAGGACAG	NM_000576	260	659–640
Hu IL-1 $\beta$ _R	TTCGACACATGGGATAACGA			400–419
Hu IL-6_F	AAAGCTGGCGAGAATGAGAT	NM_000600	351	656–637
Hu IL-6_R	AAAGGGCACTGGCAGAAAA			306–325
Hu VEGF_F	TTTCTTGGCGCTTTCGTTTT	NM_003376	424	1502–1483
Hu VEGF_R	CTACCTCCACCATGCCAAGT			1079–1098
Hu GAPDH_F	GAACGGGAAGCTTGTATCA	NM_002046	473	291–310
Hu GAPDH_R	TGACCTTGGCCACAGCCCTTG			744–763
Hu IFN- $\alpha$ F (1, 5–7, 10, 13, 14, 17)	CAGGAGGAGTTTGATGGCAACCAG			
Hu IFN- $\alpha$ R (1, 5–7, 10, 13, 14, 17)	GACAACCTCCCAGGCACAAGGGC			
CHIK E1_F	AAGCTYCGCGTCTTTACCAAG	EU-037962.1	209	10387–1040
CHIK E1_R	CCAAATTGTCYGGTCTTCCT			10595–10575
CHIK E1c_F	ATGTGGGGCGGCGCCT	NC_004162	1059	10255–10270
CHIK E1c_R	TTAGTGCCCTGCTGAAC			11298–11313
CHIK E1w_F	ACGGGCGTCTACCCATTTATGTG	NC_004162	932	10237–10259
CHIK E1w_R	GCCGGGTAGTTGACTATRTGGTC			11146–11168
CHIK Nsp2_F	CTTGGTGAGACCRRAGRCAGAA	NC_004162	942	2482–2502
CHIK Nsp2_R	TGTTCCACTCCCTTTTGTA			3402–3422

Downloaded from www.jimmunol.org on May 25, 2010



Table II. Clinical data (at T0) of CHIKV patients either recovered or suffering from chronic arthralgia M12 PI

	Diabetes Type II	Virus (per ml Blood) (T0)	Age	Sex	CRP [0–10] (mg/l)	Fibrinogen [2.5–4.5] (g/l)	Platelets [150–450] (10 <sup>9</sup> /l)	Lymphocytes [1.2–4.0] (10 <sup>9</sup> /l)	Neutrophils [1.4–7] (10 <sup>9</sup> /l)
Recovered									
R1	–	0.00E+00	46	M	7	5.3	143	1.79	1.9
R2	–	1.00E+07	71	F	28		144	0.71	2.2
R3	–	0.00E+00	37	F	19	4.6	211	0.87	1.8
R4	+	0.00E+00	62	F	3	3.4	266	2.21	2.3
R5	+	4.00E+06	49	F	8	3.5	90	0.77	1.5
R6	–	0.00E+00	37	F	3	3.5	231	1.04	1.6
Mean			50.3		11.33	4.06	180.8	1.23	1.88
SD			13.7		10.05	0.85	65.9	0.61	0.31
Chronic (M12)									
C1	–	3.70E+09	74	F	10	3.8	161	0.96	1.9
C2	+	3.00E+09	90	F	14	3.8	132	0.82	2
C3	+	2.10E+09	62	M	188	4.6	112	0.38	4.2
C4	–	6.80E+07	82	F	85	4	124	0.83	0.9
C5	+	2.30E+10	66	F	46	6.4	320	2.29	6.2
C6	–	0.00E+00	86	F	16	4.4	322	2.01	1.1
C7	–	1.10E+07	78	F	8	4.4	211	0.42	5.7
C8	–	2.10E+09	58	F	73	2.9	154	0.61	2.6
C9	–	1.10E+09	41	F	102	3.9	117	0.26	3
Mean			70.7		60.2	4.2	183.6	0.95	3.06
SD			15.5		59.7	0.9	83.4	0.7	1.91
<i>p</i> value		0.005	0.02		0.07	0.7	0.9	0.4	0.16
		***	*		*	NS	NS	NS	NS

Clinical data at T0 (day of referral) of CHIKV patients classified at M12 PI either recovered or suffering from chronic arthralgia. Diabetes type II status, age (y), sex, CHIKV viral load (qRT-PCR for the E1 gene as expressed as number of RNA copies per milliliter of blood), cell counts, and biochemical analyses are indicated and including physiological range values. The status of chronic arthralgia or recovered was recorded at M12 PI.

rapidly dying by apoptosis (cleavage of PARP and detection of apoptotic blebs) (Supplemental Fig. 1)

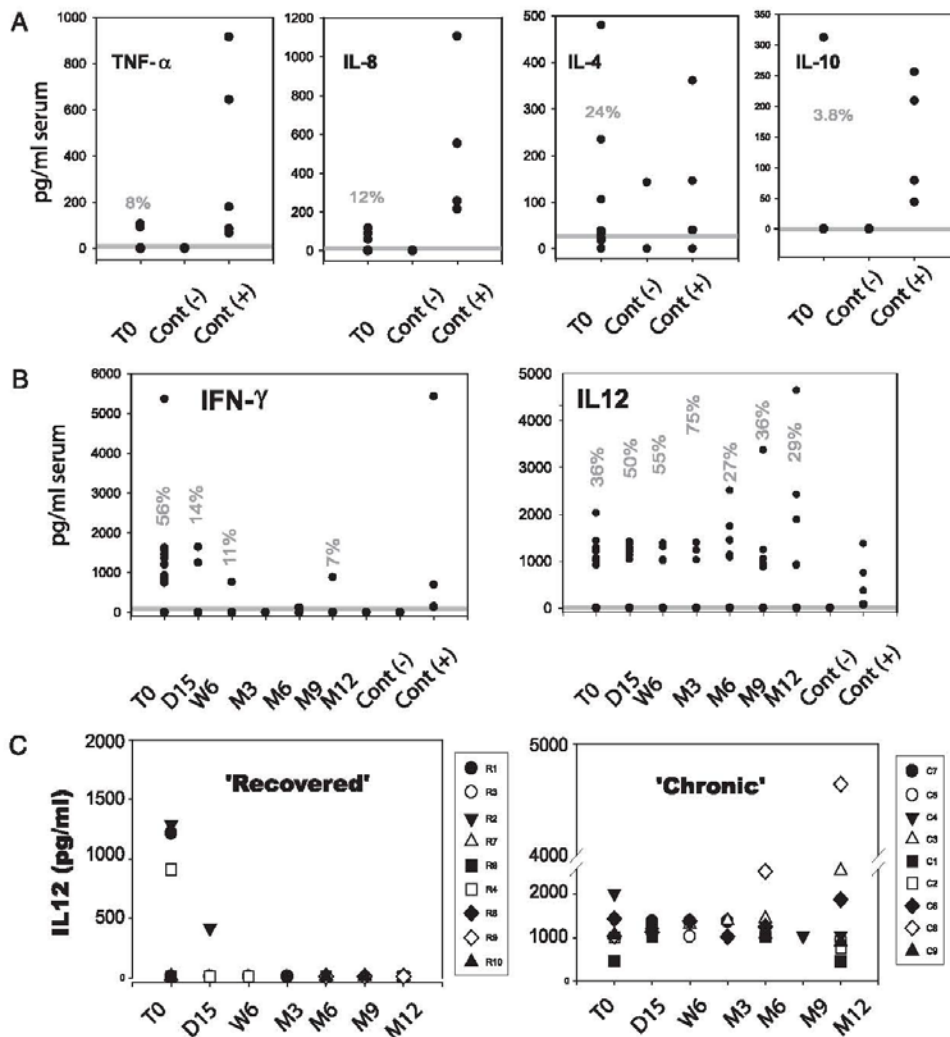
The chronic status of the disease (i.e., pain with relapsing arthralgia in more than one small articulation 3 mo at least after initial insult) was evaluated using a declarative numerical rating scale as described (20). This scale could be scored between 0 and 10, with higher values indicating more severe pain/arthralgia, and data were recorded at M12 (Supplemental Table I).

Hence, two groups of CHIKVD patients with a complete set of clinical immunological and biochemical data from T0 right to M12–M18 PI were further analyzed comprehensively to identify markers possibly associated with chronic arthralgia post-CHIKVD. Group I (5 females/1 male) consisted of CHIKV patients who fully recovered from the acute infection, and group II (8 females/1 male) were patients who experienced chronic relapsing arthralgia at M12 (Table II). The joint pain symptoms reported at M12 (Supplemental Table I) occurred in a fluctuating timely manner on a monthly basis but did not change anatomical location (data not shown). Remarkably, age, viral load, and CRP level at T0 were the three key discriminative factors between the two groups. The chronic status was more likely to be associated with high viral load at time of referral to the clinic and in elderly patients over 60 y of age (Table II). However, standard laboratory findings including blood cell count (neutrophil, platelets, and lymphocytes) as well as erythrocyte sedimentation rate, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, creatine phosphokinase, creatinine,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, pancreatic lipase, and alkaline phosphatase (AIP) were within normal limits for both groups from T0 up to M12 PI (Table II and data not shown). A mild lymphopenia at T0 was demonstrated in some patients, but this was not significantly different between the two groups. The level of acute phase proteins (CRP, fibrinogen, and complement components C3 and C4) was within the physiological range, although chronic patients presented a significantly more elevated level of CRP at T0 (mean of  $60.2 \pm 59.7$  mg/l) when compared with those of healthy controls ( $<10$  mg/l) and recovered patients ( $11.33 \pm 10.05$  mg/l). Overall, CHIKVD

patients presented a robust adaptive immune response with a seroconversion from IgM to IgG within the first weeks of the disease, but we did not detect any significant differences between the two groups. At T0, the mean OD values for the IgM anti-CHIKV were  $0.3 \pm 0.18$  in the recovered versus  $0.45 \pm 0.38$  ( $p = 0.41$ ) in the chronic group. Interestingly and as previously reported (28), we found that the IgM-specific response persisted even at M12 in both groups ( $0.206 \pm 0.114$  in recovered versus  $0.173 \pm 0.128$  in chronic,  $p = 0.64$ ). The IgM OD value of healthy controls was  $<0.01$  (background level; Supplemental Table I and labeled as not detected). The IgG levels were not significantly different between the two groups at M3 up to M12 ( $1.315 \pm 0.39$  in recovered versus  $1.50 \pm 0.115$  in chronic at M12,  $p = 0.291$ ). Western blot analysis of infected Vero cells using patients' sera indicated that E1/E2 and capsid were the main Ags driving the humoral immune response in both groups (data not shown).

#### Moderate Th1 and Th2 cytokine systemic responses during the acute phase of CHIKVD

We screened for the expression of several inflammatory molecules by ELISA, semiquantitative RT-PCR, and qRT-PCR during the course of CHIKVD. Surprisingly, but perhaps in agreement with the mild acute phase response aforementioned, we found that CHIKVD patients ( $n = 32$ ) had extremely low levels of circulating proinflammatory Th1 cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-8, during the first days PI (T0). The percentage of CHIKVD patients with positive values above background (detected from healthy controls) is included in Fig. 1. We also screened for IL-1 $\beta$  and IL-2, but they were not detected in CHIKVD patients (data not shown). Anti-inflammatory Th2 cytokines, such as IL-4 and IL-10, were also expressed at low levels. When we compared the recovered ( $n = 9$ ) versus the chronic ( $n = 6$ ) group, the overall inflammatory response was more robust in the latter, but this was not statistically different at T0 (Table III). The IFN- $\gamma$  response was particularly prominent in both groups at T0. IL-12 is essential to initiate the activation of NK cells and macrophages to ward off infectious challenge, and



**FIGURE 1.** Expression of Th1 greater than Th2 cytokines and IL12 during the course of CHIKVD. *A*, The levels of circulating TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-4, and IL-10 were mildly elevated in 32 CHIKVD patients in contrast to other infectious diseases (CMV and bacterial infection positive controls,  $n = 9$ ). The percentage of patients with values above the healthy controls ( $n = 8$ ) is indicated in gray. *B*, The levels of IFN- $\gamma$  and IL-12 were measured by ELISA during the course of CHIKVD (32 patients). Protein levels were expressed and compared with mean values of the healthy control groups (line). Significant  $p$  values ( $<0.05$ ) were obtained for (IFN- $\gamma$  at T0) (IL-12 at T0, D15, W6, and M3–M12). *C*, We further compared the levels of IL-12 between patients who recovered and those still suffering from chronic arthralgia at M12 PI. The y-axis is different to display all data points.

interestingly, its level remained dramatically elevated in chronic CHIKVD patients ( $1650.88 \pm 1385.79$  pg/ml at M12) (Fig. 1C). In sharp contrast, IL-12 returned to background levels from D15 in the recovered group (Fig. 1C).

The aforementioned data would suggest that circulating immune cells remain activated in patients suffering from chronic arthralgia as recently reported in one patient with post-CHIKV arthritis (20). We were wondering whether this could be further tested by RT-PCR analyses of the patients' PBMCs comparing samples at T0 and 6–12 mo PI. Due to the limited resources of frozen samples at T0, this study was performed only on patients subsequently categorized as chronic and compared with healthy controls. We performed gene profiling experiments, and the data are presented in Fig. 2. In the first set of

experiments, analyses were performed on four chronic patients, and we compared the cytokine and chemokine (see below) profiles at T0 and M6 PI. In essence, the RT-PCR data confirmed high expression of cytokines in CHIKVD chronic patient PBMCs at T0 and M6. Strikingly, IL-8, IL-1 $\beta$ , and IL-12 were at least equally or more highly expressed at M6 compared with T0 (with the exception of chronic patient 2). No mRNA expression for IL-4, IL-13, IL-6, or IL-1 $\alpha$  was detected, whereas the expression of immunoregulatory cytokines, such as IL-10 and TGF- $\beta$ 1, was demonstrated at T0 and M6 (Fig. 2).

Alphavirus infections, including CHIKV, rapidly induce IFN- $\alpha/\beta$  production (31, 32). Remarkably, we found high mRNA levels of IFN- $\alpha$  in all four chronic CHIKVD patients, and this expression remained largely elevated in patients at M6 PI (Fig. 2B).



Table III. Circulating levels of Th1 and Th2 cytokines during the acute phase of CHIKVD

(at T0)	Recovered (pg/ml)	Chronic Arthralgia (pg/ml)	p Value
TNF- $\alpha$	1.5 $\pm$ 0.76	41 $\pm$ 57.9	NS
IL-8	11.3 $\pm$ 20.86	37 $\pm$ 49.61	NS
IL-6	9.8 $\pm$ 1.46	11.2 $\pm$ 20.49	NS
IFN- $\gamma$	1037.5 $\pm$ 1959.6	757.5 $\pm$ 584.09	NS
IFN- $\alpha$	28.7 $\pm$ 38.34	9.3 $\pm$ 16.39	NS
IL-12	381 $\pm$ 577.3	782.6 $\pm$ 717.20	NS
IL-4	89.5 $\pm$ 175	14.5 $\pm$ 18.8	NS
IL-13	49.8 $\pm$ 106.95	14.5 $\pm$ 27.95	NS

Circulating levels of Th1 and Th2 cytokines during the acute phase of CHIKVD. The recovered group ( $n = 9$ ) was compared with group with chronic arthralgia ( $n = 6$ ). The baseline level in the healthy control groups ( $n = 6$ ) was  $<5$  pg/ml for all of the tested cytokines.

Moreover, at M12 PI, we found high IFN- $\alpha$  mRNA expression in PBMCs from four different chronic patients compared with no detectable levels in the recovered group (Fig. 2C). This group of recovered patients was established from a new cohort study, and only samples at M12 PI were available to us.

Chemokines are major regulators of leukocyte trafficking, and we were wondering whether they could play a role in chronic inflammation and arthralgia post-CHIKVD. Our data indicate robust expression of CC and CXC chemokines in the acute and chronic phases of the disease (Fig. 3, Supplemental Table II), and raw data of the superarray are included in Supplemental Table IV. Both ligands and receptors were highly expressed, and the expression of CC chemokines (e.g., CCL1, CCL2, CCL7, and CCL15 but not RANTES) was prominent particularly in acute conditions. Of note, not all of the inflammatory factors involved in immune cell activation were elevated, and only background levels of IL-16, IL-18, MyD88, and NF- $\kappa$ B were detected at T0 and M6 post-CHIKVD (Supplemental Table II). Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) expression was highly elevated only in one out of four PBMC samples from chronic patients.

All together, our data support the idea that a polarized inflammatory immune response is engaged in the acute phase of CHIKVD although only weak circulating levels of proinflammatory Th1 effectors and immunoregulatory Th2 molecules were detected. Surprisingly, this response persisted in some patients who went on to develop chronic arthralgia. The IL-12 data (in PBMCs and from the circulation) are exceptional and, together with the persistent IFN- $\alpha$  mRNA expression in chronic patients, could be indicators of virus and/or viral antigenic persistence in PBMCs with continuing stimulation of the innate immune cellular response but yet by ill-characterized mechanisms (14, 33).

#### A robust cell-mediated immune response is engaged in CHIKVD patients

Having characterized in depth the molecular immune response, we sought to investigate the cellular immune response in CHIKVD patients. We wanted to know whether a plausible viral persistence in chronic patients could be associated with poor CD4/CD8 T cell, NK cell, or both responses during the initial acute phase responses. When the data were analyzed retrospectively, only one set of immunophenotyping was performed in 2007 for the recovered group and was compared with nine chronic samples and to 10 healthy CHIKV negative controls. NK cells probably contributed to one of the first lines of defense against the viral infection given that at first evaluation (T0) 66.3  $\pm$  11.1% of the CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells displayed CD69 in T0 CHIKVD chronic patients (e.g., in patient chronic 1, Fig. 4) and therefore were massively activated when compared with healthy controls (9.8  $\pm$  2%) ( $p < 0.05$ ) (Supple-

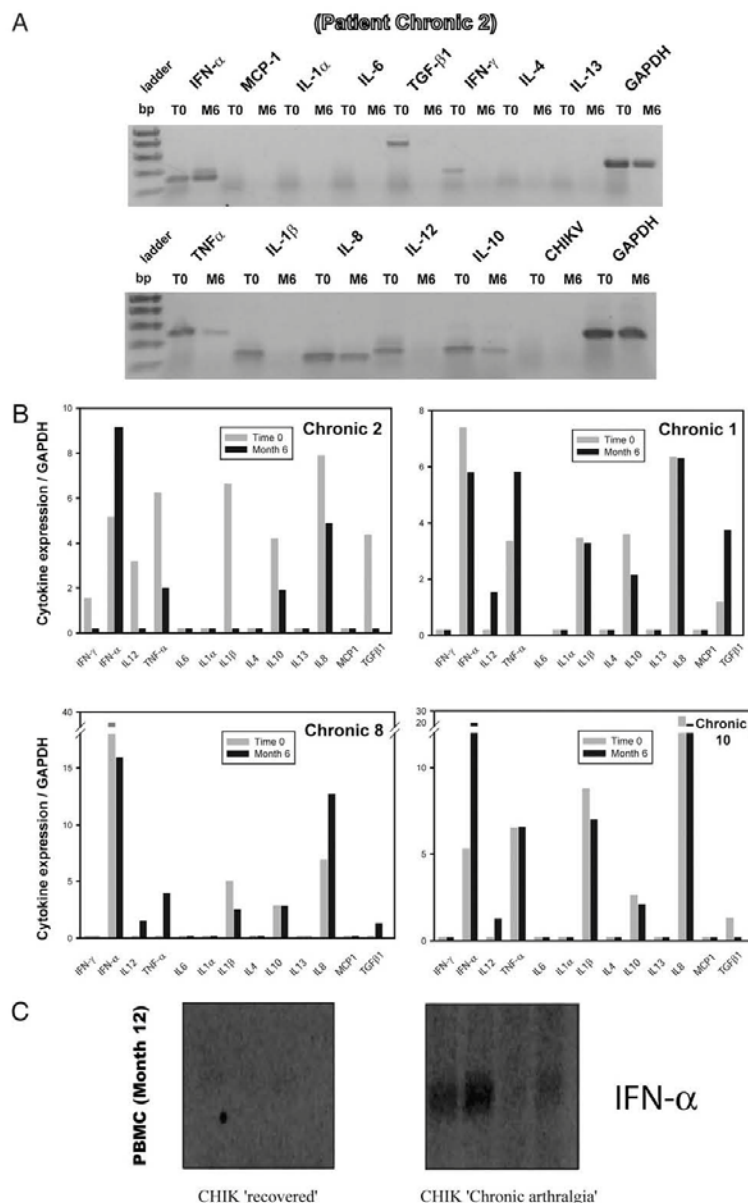
mental Table III). In addition, NK cells were rather spared from the profound lymphopenia with 15.2  $\pm$  4.1% of the CHIKVD lymphocytes presenting an NK cell phenotype compared with 8.3  $\pm$  2.3% in healthy controls ( $p < 0.05$ ). In contrast with NK cells, circulating dendritic cells were detected within normal ranges and did not display an activated phenotype (CD80) (Fig. 4, Supplemental Table III). A relative amplification of plasmacytoid dendritic cells (Lin<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) was demonstrated in the acute phase of the disease (Fig. 4). T cells were also present in normal ranges without dysbalance between TCR- $\alpha$  and TCR- $\gamma$  $\delta$  subsets (Supplemental Table III). A significant increase in activated T cells was observed in CHIKVD patients. We found that 45.6  $\pm$  11.4% of CD3<sup>+</sup> cells expressed CD69 at T0 when compared with 6  $\pm$  1% in healthy controls ( $p < 0.05$ ). Both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> but mostly CD8<sup>+</sup> T cells were involved in such activation with 14.5  $\pm$  3% HLA-DR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and 51.7  $\pm$  8.1% HLA-DR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells compared with 4.4  $\pm$  0.8% and 12.7  $\pm$  2.7%, respectively, in controls ( $p < 0.05$ ). The mobilization of memory/effector B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) was particularly prominent in CHIKVD patients (47.4  $\pm$  11.6%) when compared with that in controls (18.7  $\pm$  5%) ( $p < 0.05$ ). Of note, those levels of activation of all T, B, dendritic, and NK cell subsets rapidly returns to normal at 3–6 mo post-CHIKVD (depicted only for patient chronic 1, Fig. 4). All in all, our data highlight the massive activation of all of the components of the cell-mediated immune response, with a chief implication of innate NK cells in the acute antiviral response to CHIKV accompanied by a classical mobilization of the adaptive immune T and B cells. Nine chronic CHIKVD patients versus one recovered CHIKVD patient were analyzed by FACS, and no profound differences were seen apart from a more robust CD4/CD8 activation status in the former group ( $>50\%$  of CD8 were strongly HLA-DR<sup>+</sup> in chronic versus 15.8% in the recovered sample at T0; for the CD4 T cells,  $<6\%$  were activated in the recovered compared with  $>14\%$  in chronic). NK cells were equally activated between the two groups ( $>60\%$  expressed CD69). Statistical analysis could not be performed, and samples from the more recent 2009 CHIKVD cases may help to delineate the differences in immune cell activation (34).

#### CHIKV (mRNA and proteins) persisting in synovial macrophages could contribute to tissue injuries, apoptosis, fibrosis, and a polarized inflammatory response reminiscent of RA

Several lines of evidence from the literature and from data presented herein would argue that alphaviruses can persist and be at the routes of chronic pathologies, such as arthritis evolving to RA (2, 20, 35–37). But where and how does CHIKV hide from the rather robust innate and adaptive immune responses developed by all patients?

To begin to address this question, we performed consented histological assessments of synovial biopsies obtained after volunteered surgery of CHIKVD patients. One biopsy was collected during the so-called CHIKVD relapses not necessarily associated with fever but nevertheless with severe chronic arthralgia (index 8 on a scale of 10, patient 21). Two more biopsies were obtained from patients hospitalized for orthopedic surgery (not as a consequence of CHIKVD). These two patients were positive for anti-CHIKV IgG but did not suffer from chronic arthralgia. All of the analyses were consented for but were limited to surgical cases and were not unnecessarily requested from the other patients of the cohort for ethical reasons. The data are presented in Figs. 5 and 6.

Synovial liquid and tissues were collected from surgery (patient 21, inflamed hygroma M18 PI) and analyzed for surrogate markers of CHIKV infection and inflammation. In the synovial fluid, we found that 50% of the infiltrating cells were CD14<sup>+</sup> and  $<5\%$  were



**FIGURE 2.** Proinflammatory cytokines and IFN- $\alpha$  expression in PBMCs from CHIKVD chronic patients at T0 and M6. Semiquantitative RT-PCR was carried out, and data are depicted for four chronic patients. *A*, Representative data of one agarose gel ( $n = 3$ ). *B*, Semiquantitative analyses using the National Institutes of Health imaging software for the data when compared with GAPDH gene expression. *C*, RT-PCR data of IFN- $\alpha$  mRNA expression in four individual PBMCs from the recovered or the chronic group at M12.

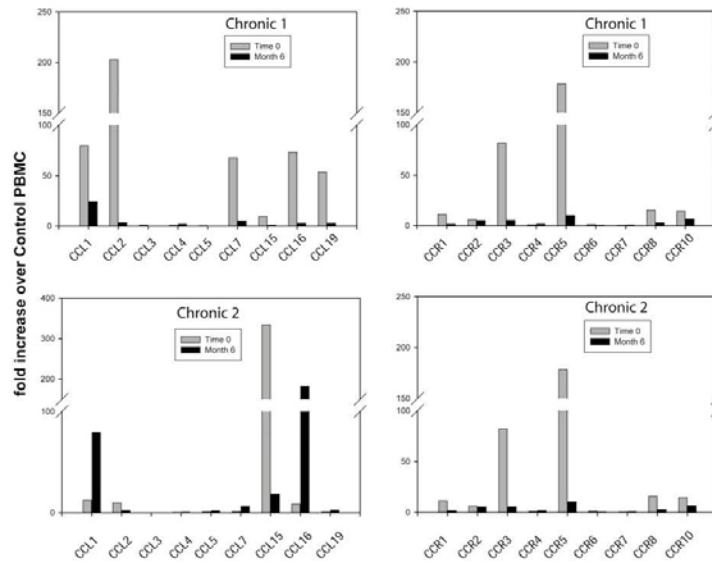
Downloaded from www.jimmunol.org on May 25, 2010

stained for CHIKV using two different mAbs (Fig. 5A*c*). We also found that synovial CD56<sup>+</sup> NK cells were activated as judged by the CD69 staining (Figs. 5, 6). Circulating NK cells (from PBMCs) from this patient were largely quiescent (CD69<sup>neg</sup> CD56<sup>+</sup> cells) (Fig. 5*B*). Synovial T cells were mildly activated as judged by HLA-DR staining (CD4 >>> CD8) (Fig. 6). The presence of the so-called “ballooned macrophages with multiple vacuoles” as described in RRV (Fig. 5*A*, May Grunwald Giemsa stain) was concomitant with the detection of high levels of MCP1/CCL2, IL-6, and IL-8 in the synovial fluid compared with the serum of the same patient (Fig. 5*F*). These data argue for active

monocyte/macrophage trafficking into the synovial tissue of a patient with chronic CHIKVD. Surprisingly, levels of other canonical inflammatory markers known to be elevated in synovial fluid of RA patients were barely affected (i.e., ENA-78, G-CSF, GM-CSF, GRO, GRO- $\alpha$ , I-309, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IFN- $\gamma$ , MCP2, MCP3, M-CSF, MDC, MIG, MIP1 $\delta$ , RANTES, SCF, SDF1, TARC, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , EGF, IGF, angiogenin, oncostatin M, thrombopoietin, VEGF, PDGF-BB, and leptin) (38)(Fig. 5*F*, Ab array detailed in Fig. 6). These data were confirmed at the mRNA levels by RT-PCR (Fig. 5*D*).



**FIGURE 3.** Short lived expression of chemokines and their receptors in response to CHIKV infection. qRT-PCR (superarray technology) was performed using patients PBMCs (chronic 1 and 2) and data are expressed as fold increase over control (PBMCs from healthy controls) ( $n = 2$  repeats). We compared the expression at T0 and 6 mo later.



There were several detectable histological abnormalities in the synovium of the patient, including synovial lining hyperplasia (evocative of mild polyarthritis) (Fig. 6C, hematoxylin, eosin, and safran stain), vascular proliferation (CD31/PECAM-1 staining; Fig. 5C), and CD18<sup>+</sup> macrophage infiltration remaining mainly at the perivascular level. CD43<sup>+</sup> lymphocytes were also present, and subsequent immunostaining indicated that they were mainly CD4<sup>+</sup> or CD56<sup>+</sup> cells. Cytotoxic CD8<sup>+</sup> cells were extremely rare, whereas no CD19<sup>+</sup> B lymphocyte cells were detected (Fig. 6). In contrast, quiescent as well as activated NK cells (NKP46 and NKP44, respectively) were distributed in clusters throughout the tissue section (Fig. 6).

Remarkably, the immunostaining for CHIKV using two different mAbs unambiguously stained the perivascular macrophages (Fig. 5C) and identified as CD18<sup>+</sup> perivascular cells by double immunofluorescence. Interestingly, high levels of apoptosis, as indicated by immunostaining for cleaved PARP in fibroblasts, was demonstrated in the same tissue section areas (Fig. 6). The presence in situ of CHIKV was confirmed by RT-PCR (and sequencing of the product) for *E1* and *Nsp2* gene expression (Fig. 5E). Interestingly, the IFN- $\alpha$  signature (mRNA) was concomitant with the persistence of the virus in the synovial tissue (Fig. 5D). In addition to massive apoptosis contributing to the injury of the connective synovial tissue, we found elevated levels of MMP2 in the synovial tissue of chronic patient 21 that may further contribute injuries, lesions, and chronic fibrosis. Full immunohistological examination was also conducted in two more biopsies from CHIKVD recovered patients (no relapsing arthralgia) but did not reveal the presence of CHIKV and tissue injuries (absence of cleaved PARP staining; data not shown).

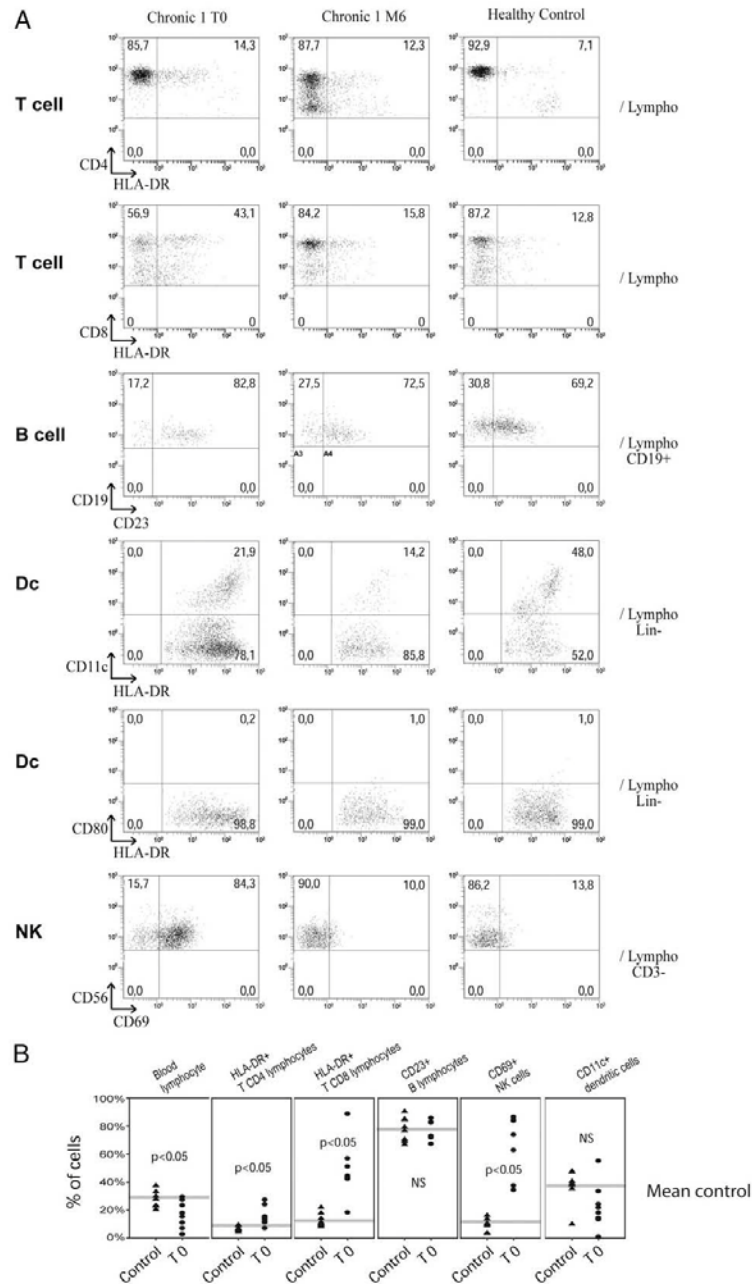
## Discussion

There is a strong body of evidence that persistent joint manifestations are linked with Barmah Forest virus, Mayaro virus, RRV, O'nyong-nyong virus, and Sindbis virus infections, the so-called arthritogenic alphaviruses but by mechanisms largely ill-characterized (3, 4, 23, 37). The exceptional intensity of the epidemics occurring in a Eu-

ropean territory with good medical and university staffs and facilities provided a unique opportunity to describe with modern tools the different aspects of the innate and adaptive immunity generated during the acute phase of CHIKVD.

Moreover, our unique observations that CHIKVD also frequently involves a chronic incapacitating arthralgia/arthritis that can persist for several months raise a number of critical questions, such as the reactivation of virus production, the evasion of the immune antiviral response, the role of an uncontrolled inflammation, and perhaps mechanisms, such as cross-reactivity with self-antigens, a deregulation of autoimmune mechanisms as recently alluded, or both (20, 27). These aspects are of general and great interest in persistent infections and draw attention to the consequences of virus sanctuaries driving long-term illnesses as reported for several RNA viruses (39). Virus sanctuaries in certain tissues not only complicate virus elimination but also enable reactivation during immune suppression (for example, after organ transplantation) (40). Several stages of the disease can be drawn from our investigations, taking into account the clinical and biological data from patients in acute conditions and several months PI and correlating these findings with the in vitro cell modeling studies.

First, our data highlight a complex interplay between CHIKV and host response in the acute phase of the disease, particularly in elderly patients with high viral burden ( $>10^9$ – $10^{10}$  viral particles per milliliter of blood). It has already been established from clinical cohort studies that age is a critical factor linked to more severe CHIKV pathologies and long-term sequelae (11, 19, 20, 41). Of critical note, severe cases reported from hospitalized cohorts may be related to diverse underlying medical conditions, most commonly with hypertension, respiratory conditions, and diabetes mellitus (11, 12, 20, 41, 42). Our study was also from a cohort of hospitalized patients, but we compared two groups where diabetes type II (the only reported comorbidity) was equally found. Remarkably, the patients who will go on to experience chronic arthralgia at M3–M18 PI were over 60 y old and with extremely high viral load at the time of referral to the hospital when compared with the group who will recover from the acute infection with no



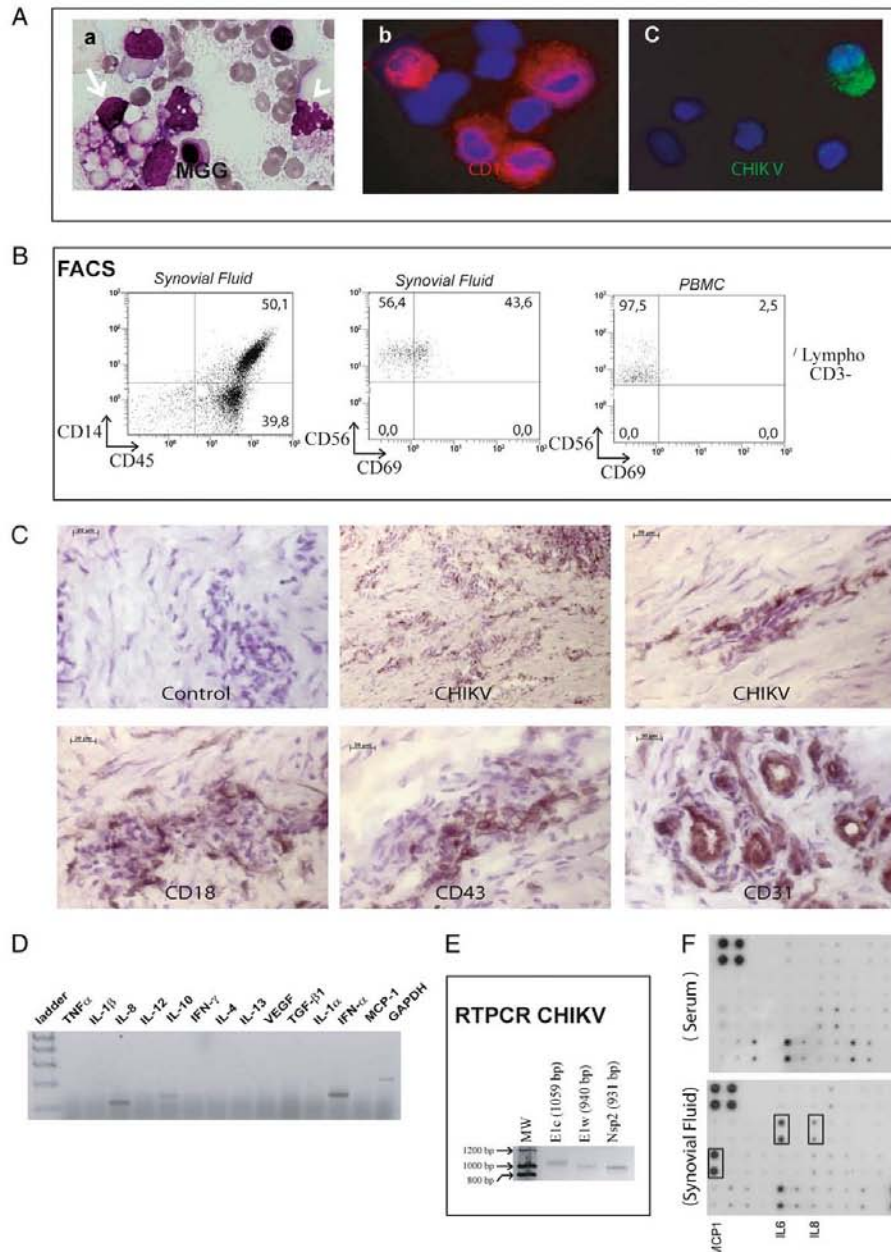
**FIGURE 4.** Rapid and robust mobilization of innate and adaptive immune cells in the acute phase of the CHIKV infection. *A*, The percentage and the level of activation of T (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) and B lymphocytes (CD19<sup>+</sup>), dendritic cells (Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) and NK cells (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) was characterized by FACS analyses of PBMCs from one CHIKV chronic patient (number 23) at T0 and M6 PI when compared with a healthy control. HLA-DR, CD69, and CD23 were used to ascertain for the level of cell activation. Quadrants were established using irrelevant isotype control Abs. *B*, Cumulative data from eight CHIKVD patients (T0) and eight healthy controls. Significant differences are indicated as ( $p < 0.05$ ) or as NS. The mean value of the healthy controls is indicated by the gray line.

detectable or much lower viral load at T0. It is increasingly evident that the elderly are particularly susceptible to severe disease from viral infection, possibly through a dysregulation of their immune system (43, 44), which may be failing to control viral replication.

However, we found that robust cellular and molecular innate immune responses were taking place in all of the CHIKVD patients of both groups as witnessed by the rapid activation of NK cells,

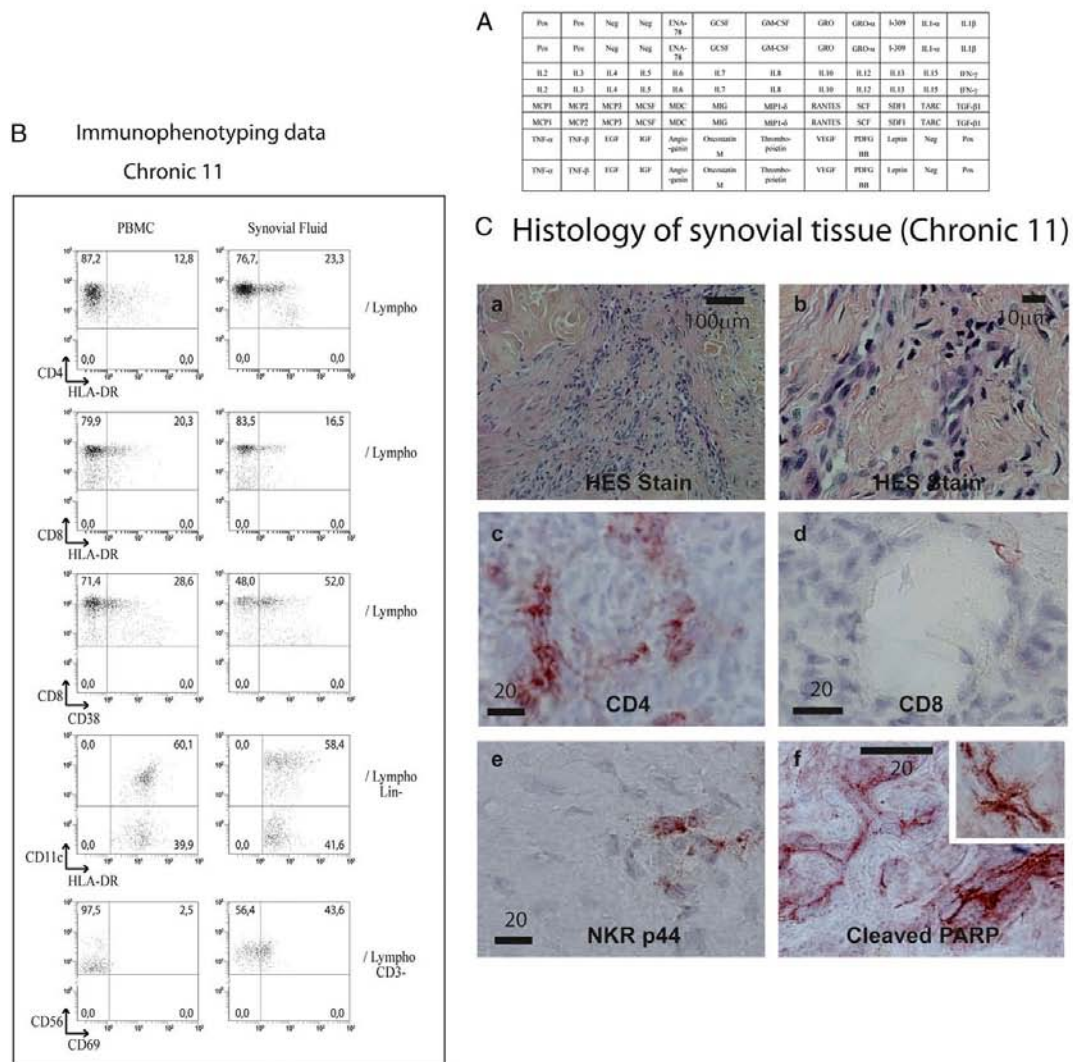
plasmacytoid dendritic cells, and T cell subsets at T0. Over 50% of circulating NK and T (CD4 and CD8) cells from the chronic group were activated as assessed by the CD69 and HLA-DR immunophenotyping data, respectively. Counterintuitively, although only one sample could be analyzed, we found that a less pronounced T cell activation was taking place from the recovered patient at T0. Strong immune cell activation to drive the initial antiviral response could

Downloaded from www.jimmunol.org on May 25, 2010



**FIGURE 5.** Chronic arthralgia months after acute infection is associated with the persistence of CHIKV in synovial macrophages and accompanied by a polarized inflammatory response. Synovial biopsies from cells (A, B), fluid (F), and tissue sections (C–E) were tested for the presence of CHIKV, inflammation, and immune cell activation several months PI (chronic patient 21, M18). A, Synovial cells including numerous ballooned macrophages (May Granwald Giemsa stain) were stained for CD14 (red) and CHIKV (green, monoclonal 4F). B, FACS analysis of synovial cells and blood PBMCs from patient 21 at M18. C, Immunoperoxidase brown staining of patient 21 synovial tissue using irrelevant mAb (control), monoclonal anti-CHIKV, monoclonal anti-CD18 (macrophages), monoclonal anti-CD43 (lymphocytes), and monoclonal anti-CD31 (endothelial cells). D and E, The expression of inflammatory markers and CHIKV RNAs (*E1* and *Nsp2*) was tested by RT-PCR of synovial tissue. F, Ab array technology (RayBio) was used to screen for the level of cytokines and chemokines in synovial fluid and control serum sample from patient 21. MCP1, IL-6, and IL-8 were particularly highly expressed in synovial fluid, whereas the levels of ENA-78, G-CSF, GM-CSF, GRO, GRO- $\alpha$ , I-309, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IFN- $\gamma$ , MCP2, MCP3, M-CSF, MDC, MIG, MIP18, RANTES, SCF, SDF1, TARC, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , EGF, IGF, angiogenin, oncostatin M, thrombopoietin, VEGF, PDGF-BB, and leptin were not affected.





**FIGURE 6.** Polarized cellular inflammatory response in chronic form of CHIKVD. *A*, List of inflammatory markers screened using an Ab array. Samples from chronic patient 21 (C11, M18 PI) was analyzed by FACS, Ab array, and immunohistochemistry. *B*, Immunophenotyping of PBMCs of patient 21 (C11) from blood and synovial fluid. *C*, Synovial tissue (hygroma) of chronic patient 21 was stained for hematoxylin, eosin, and safran, CD4, CD8, NKRp44, and apoptosis (cleaved PARP). *a*, Original magnification  $\times 100$ ; *b-f*, original magnification  $\times 600$ .

lead to the exhaustion of T cells, and this has been linked subsequently to viral persistence (45, 46). Although this phenomenon is well-described for several RNA viruses, it remains to be studied for arboviruses. It will be important to test the effector functions of the T cells, but ongoing ELISPOT analyses in our laboratory clearly indicate that CD4 and CD8 cells are highly capable of recognizing several CHIKV Ags and producing high levels of IFN- $\gamma$  (data not shown). The rapid clearance of the CHIKV in patients' sera at D15 is a clear testimony to the competent antiviral cellular and humoral responses at least from a systemic point of view.

The Th1 cytokine response is essential to promote immune cell activation, but they can also contribute to tissue injuries as, for

example, in RA. We were however surprised to note that proinflammatory TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 were poorly expressed in CHIKD sera and in sharp contrast to other viral and bacterial infections tested concomitantly (47, 48). Several studies have reported the regulation of the cytokine response in a cell culture system exposed to alphaviruses, but little was known in patients (for review, see Ref. 3). Moreover, we found that IL-4 and IL-13 (Th2 cytokines) were expressed in very few CHIKVD patients, whereas low expression of IL-10 was demonstrated by RT-PCR but not by ELISA. There are some discrepancies between the cytokine ELISA data from sera and the RT-PCR data of PBMCs. Soluble cytokines can be rapidly degraded in serum, and the qRT-PCR data were

Downloaded from www.jimmunol.org on May 25, 2010

obtained solely from PBMCs, excluding the likely contribution of other cell types (endothelial cells, fibroblasts, and hepatocytes) to the systemic inflammatory response. IL-12 is known to act synergistically to promote innate immune cell activation (NK cells and macrophages to thwart off an infectious challenge), and it was highly elevated in the majority of CHIKVD patients at T0. More importantly, its expression remained elevated throughout the time course of CHIKVD in chronic patients, and this would argue for the hypothesis of a persisting infectious challenge months after the initial insult. This hypothesis was further substantiated by the detection of high levels of IFN- $\alpha$  mRNA only in chronic but not recovered CHIKV patients at M6 and M12.

CHIKV may trigger persistent joint pain and arthritis-like pathology with mechanisms possibly involving not only host-derived inflammatory cytokines but also the virus itself hijacking the "soldier" of the innate immune system, the resident tissue macrophages as described for RRV (3). We found that NK cells infiltrating the synovial tissue in close vicinity to chronically CHIKV-infected macrophages displayed an activated phenotype (NKRp44-positive) (49). In contrast, the lack of infiltrating CD8<sup>+</sup> cells in the synovial tissue is surprising and may contribute to the persistence of CHIKV. The expression of antiviral type I IFNs was demonstrated in the PBMCs of chronic CHIKVD patients and in the synovial tissue with latent CHIKV infection. In the CHIKV<sup>+</sup> biopsies (synovial tissue and fluid), we found gene expression of IFN- $\alpha$  and IL-10 but not of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IFN- $\gamma$ ). Chemokines, such as CCL2 found in the synovial tissue, are also likely to be involved in the chronic phase response to promote leukocyte trafficking through activated endothelial cells. These findings are in agreement with a canonical chronic immune response reminiscent of but distinct from RA. The absence of polymorphonuclear cells in the synovial fluid and the paucity of proinflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , are important components to consider while selecting the best treatment regimen for chronic CHIKVD.

It is plausible that CHIKV persisting in immunoprivileged niches (called here sanctuaries) contributes directly to synovial tissue damage. RRV was shown to persist in synovial macrophages, and it is interesting that this behavior can be extrapolated to CHIKV (for review, see Ref. 2) and, in general, to many RNA viruses. There is an emerging paradigm that chronic infection of macrophages by some viruses reprograms their differentiation toward a so-called "alternative phenotype" different from the M1/M2 characteristics and contributing to tissue fibrosis (50–53). It will be interesting to ascertain whether this is also true for CHIKV. We found that CHIKV has profound cytopathic effects and can induce apoptosis *in vitro* and in synovial tissues as assessed by the presence of numerous cleaved PARP-positive cells, whereas high expression of MMP2 may contribute to chronic tissue lesions. It remains to be tested whether phagocytosis of apoptotic cells (containing or not remnants of CHIKV) by the neighboring macrophages may permit viral persistence in a nonphlogistic environment and whether novel strategies could be identified to curtail viral persistence in the macrophage reservoir (54).

All in all, the fundamental and clinical questions addressed in acute and chronic CHIKVD are applicable to many RNA viruses causing pathologies with the possibility to link clinical observations with experimental data. The vast body of recent information on the molecular biology, cell biology, and pathogenesis of CHIKV and other alphaviruses makes this system a powerful tool for fundamental and clinical research and to shed new light on the possible routes to protective vaccines and treatments (55). Patients with post-CHIKV RA-like arthritis are currently and efficiently treated with methotrexate (10–20 mg/wk for months), but this

drug has also immunosuppressive activities that may complicate the issue of possible viral reactivation (20, 27).

## Acknowledgments

We thank the medical, technical, and nursing staffs of the different hospitals (St. Paul, St. Benoît, and St. Denis) part of the new CHR from Ile de la Réunion. We thank Dr. J.C. Saly and Dr. F. Tallet (Université de la Réunion, St. Denis, France) for welcoming members of the Groupe de Recherche Infection et Immunopathologie and facilitating the study. We thank Dr. C. Lefebvre d'Helencourt (Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire [LBGM]), Dr. Franck Festy (LBGM), Dr. Hervé Pascalis (CHR Nord Félix-Guyon), Shruti Srivastava, and Gayatri Thiyam (Institute of Bioinformatics and Applied Biotechnology, Bangalore, India) for contribution in securing funding and pilot experimental studies. Cell lines were kindly provided by Prof. B.P. Morgan from Cardiff University (Cardiff, Wales, U.K.), and we thank Prof. V. Horejsi for the MEM Abs.

## Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

## References

- Harley, D., A. Sleight, and S. Ritchie. 2001. Ross River virus transmission, infection, and disease: a cross-disciplinary review. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 909–932.
- Suhrbier, A., and M. La Linn. 2004. Clinical and pathologic aspects of arthritis due to Ross River virus and other alphaviruses. *Curr. Opin. Rheumatol.* 16: 374–379.
- Rulli, N. E., J. Melton, A. Wilmes, G. Ewart, and S. Mahalingam. 2007. The molecular and cellular aspects of arthritis due to alphavirus infections: lesson learned from Ross River virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1102: 96–108.
- Tesh, R. B. 1982. Arthritides caused by mosquito-borne viruses. *Annu. Rev. Med.* 33: 31–40.
- Enserink, M. 2006. Infectious diseases. Massive outbreak draws fresh attention to little-known virus. *Science* 311: 1085.
- Charrel, R. N., X. de Lamballerie, and D. Raoult. 2007. Chikungunya outbreaks—the globalization of vectorborne diseases. *N. Engl. J. Med.* 356: 769–771.
- Pialoux, G., B. A. Gatzère, S. Jauréguiberry, and M. Strobel. 2007. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect. Dis.* 7: 319–327.
- Rezza, G., L. Nicoletti, R. Angelini, R. Romi, A. C. Finarelli, M. Panning, P. Cordioli, C. Fortuna, S. Boros, F. Magurano, et al. 2007. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370: 1840–1846.
- Chevillon, C., L. Briant, F. Renaud, and C. Devaux. 2008. The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. *Trends Microbiol.* 16: 80–88.
- Mavalankar, D., P. Shastri, T. Bandyopadhyay, J. Parmar, and K. V. Ramani. 2008. Increased mortality rate associated with chikungunya epidemic, Ahmedabad, India. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 412–415.
- Borgherini, G., P. Poubeau, A. Jossaume, A. Goux, L. Cotte, A. Michault, C. Arvin-Berod, and F. Paganin. 2008. Persistent arthralgia associated with chikungunya virus: a study of 88 adult patients on reunion island. *Clin. Infect. Dis.* 47: 469–475.
- Borgherini, G., P. Poubeau, F. Staikowsky, M. Lory, N. Le Moullec, J. P. Beccuq, C. Wengling, A. Michault, and F. Paganin. 2007. Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. *Clin. Infect. Dis.* 44: 1401–1407.
- Lakshmi, V., M. Neeraja, M. V. Subbalaxmi, M. M. Parida, P. K. Dash, S. R. Santhosh, and P. V. Rao. 2008. Clinical features and molecular diagnosis of Chikungunya fever from South India. *Clin. Infect. Dis.* 46: 1436–1442.
- Kurkela, S., T. Manni, J. Myllynen, A. Vaheri, and O. Vapalahti. 2005. Clinical and laboratory manifestations of Sindbis virus infection: prospective study, Finland, 2002–2003. *J. Infect. Dis.* 191: 1820–1829.
- Ramful, D., M. Carbonnier, M. Pasquet, B. Bouhmani, J. Ghazouani, T. Noormahomed, G. Beullier, T. Attali, S. Samperiz, A. Fourmaintraux, and J. L. Alessandri. 2007. Mother-to-child transmission of Chikungunya virus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 26: 811–815.
- Simon, F., P. Parola, M. Grandadam, S. Fourcade, M. Oliver, P. Brouqui, P. Hance, P. Kraemer, A. Al Mohamed, X. de Lamballerie, et al. 2007. Chikungunya infection: an emerging rheumatism among travelers returned from Indian Ocean islands. Report of 47 cases. *Medicine (Baltimore)* 86: 123–137.
- Gérardin, P., G. Barau, A. Michault, M. Bintner, H. Ranarivanto, G. Choker, Y. Lenglet, Y. Touret, A. Bouveret, P. Grivard, et al. 2008. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. *PLoS Med.* 5: e60.
- Robin, S., D. Ramful, F. Le Seach, M. C. Jaffar-Bandjee, G. Rigou, and J. L. Alessandri. 2008. Neurologic manifestations of pediatric chikungunya infection. *J. Child Neurol.* 23: 1028–1035.
- Economopoulou, A., M. Domínguez, B. Helynek, D. Sissoko, O. Wichmann, P. Quenel, P. Germonneau, and I. Quatresous. 2009. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Reunion. *Epidemiol. Infect.* 137: 534–541.



20. Sissoko, D., D. Malvy, K. Ezzedine, P. Renault, F. Moschetti, M. Ledrans, and V. Pierre. 2009. Post-epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3: e389.
21. Laurent, P., K. Le Roux, P. Grivard, G. Bertil, F. Naze, M. Picard, F. Stankowsky, G. Barau, I. Schuffenecker, and A. Michault. 2007. Development of a sensitive real-time reverse transcriptase PCR assay with an internal control to detect and quantify chikungunya virus. *Clin. Chem.* 53: 1408–1414.
22. Ng, L. F., A. Chow, Y. J. Sun, D. J. Kwek, P. L. Lim, F. Dimatatac, L. C. Ng, E. E. Ooi, K. H. Choo, Z. Her, et al. 2009. IL-1beta, IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. *PLoS One* 4: e4261.
23. Toivanen, A. 2008. Alphaviruses: an emerging cause of arthritis? *Curr. Opin. Rheumatol.* 20: 486–490.
24. Brighton, S. W., O. W. Prozesky, and A. L. de la Harpe. 1983. Chikungunya virus infection. A retrospective study of 107 cases. *S. Afr. Med. J.* 63: 313–315.
25. Brighton, S. W., and I. W. Simson. 1984. A destructive arthropathy following Chikungunya virus arthritis—a possible association. *Clin. Rheumatol.* 3: 253–258.
26. Fourie, E. D., and J. G. Morrison. 1979. Rheumatoid arthritic syndrome after chikungunya fever. *S. Afr. Med. J.* 56: 130–132.
27. Chopra, A., V. Anuradha, P. Lagoo-Joshi, V. Kunjir, S. Salvi, and M. Saluja. 2008. Chikungunya virus aches and pains: an emerging challenge. *Arthritis Rheum.* 58: 2921–2922.
28. Kuno, G. 2001. Persistence of arboviruses and antiviral antibodies in vertebrate hosts: its occurrence and impacts. *Rev. Med. Virol.* 11: 165–190.
29. Pastorino, B., J. J. Muyembe-Tamfum, M. Bessaud, F. Tock, H. Tolou, J. P. Durand, and C. N. Peyrefitte. 2004. Epidemic resurgence of Chikungunya virus in democratic Republic of the Congo: identification of a new central African strain. *J. Med. Virol.* 74: 277–282.
30. Brady, J., J. Neal, N. Sadakar, and P. Gasque. 2004. Human endosialin (tumor endothelial marker 1) is abundantly expressed in highly malignant and invasive brain tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63: 1274–1283.
31. Couderc, T., F. Chretien, C. Schilte, O. Disson, M. Brigitte, F. Guivel-Benhassine, Y. Touret, G. Barau, N. Cayet, I. Schuffenecker, et al. 2008. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathog.* 4: e29.
32. Ozden, S., M. Huerre, J. P. Riviere, L. L. Coffey, P. V. Afonso, V. Mouly, J. de Momedon, J. C. Roger, M. El Amrani, J. L. Yvin, et al. 2007. Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection. *PLoS One* 2: e527.
33. Calisher, C. H., A. O. el-Kafrawi, M. I. Al-Deen Mahmud, A. P. Travassos da Rosa, C. R. Bartz, M. Brummer-Korvenkontio, S. Haksobusodo, and W. Suhayono. 1986. Complex-specific immunoglobulin M antibody patterns in humans infected with alphaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 23: 155–159.
34. D'Ortenzio, E., M. Grandadam, E. Balleydier, J. S. Dehecq, M. C. Jaffar-Bandjee, A. Michault, S. F. Andriamandimby, J. M. Reynes, and L. Filleul. 2009. Sporadic cases of chikungunya, Réunion Island, August 2009. *Euro Surveill.* 14: 19324.
35. Levine, B., J. M. Hardwick, and D. E. Griffin. 1994. Persistence of alphaviruses in vertebrate hosts. *Trends Microbiol.* 2: 25–28.
36. Franssila, R., and K. Hedman. 2006. Infection and musculoskeletal conditions: viral causes of arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 20: 1139–1157.
37. Gardner, C. L., C. W. Burke, M. Z. Tesfay, P. J. Glass, W. B. Klimstra, and K. D. Ryman. 2008. Eastern and Venezuelan equine encephalitis viruses differ in their ability to infect dendritic cells and macrophages: impact of altered cell tropism on pathogenesis. *J. Virol.* 82: 10634–10646.
38. Rioja, I., F. J. Hughes, C. H. Sharp, L. C. Warnock, D. S. Montgomery, M. Akil, A. G. Wilson, M. H. Binks, and M. C. Dickson. 2008. Potential novel biomarkers of disease activity in rheumatoid arthritis patients: CXCL13, CCL23, transforming growth factor alpha, tumor necrosis factor receptor superfamily member 9, and macrophage colony-stimulating factor. *Arthritis Rheum.* 58: 2257–2267.
39. Recher, M., K. S. Lang, A. Navarini, L. Hunziker, P. A. Lang, K. Fink, S. Freigang, P. Georgiev, L. Hangartner, R. Zellweger, et al. 2007. Extrapulmonary virus sanctuaries as a consequence of potent T-cell activation. *Nat. Med.* 13: 1316–1323.
40. Hilleman, M. R. 2004. Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 14560–14566.
41. Tandale, B. V., P. S. Sathe, V. A. Arankalle, R. S. Wadia, R. Kulkarni, S. V. Shah, S. K. Shah, J. K. Sheth, A. B. Sudeep, A. S. Tripathy, and A. C. Mishra. 2009. Systemic involvements and fatalities during Chikungunya epidemic in India, 2006. *J. Clin. Virol.* 46: 145–149.
42. Sankari, T., S. L. Hoti, V. Govindaraj, and P. K. Das. 2008. Chikungunya and respiratory viral infections. *Lancet Infect. Dis.* 8: 3–4.
43. Debiasi, R. L., and K. L. Tyler. 2006. West Nile virus meningoencephalitis. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2: 264–275.
44. Kong, K. F., K. Dekroux, X. Wang, F. Qian, A. Arjona, S. E. Malawista, E. Fikrig, and R. R. Montgomery. 2008. Dysregulation of TLR3 impairs the innate immune response to West Nile virus in the elderly. *J. Virol.* 82: 7613–7623.
45. Bucks, C. M., J. A. Norton, A. C. Boesteanu, Y. M. Mueller, and P. D. Katsikis. 2009. Chronic antigen stimulation alone is sufficient to drive CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion. *J. Immunol.* 182: 6697–6708.
46. Mueller, S. N., and R. Ahmed. 2009. High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 8623–8628.
47. Hober, D., L. Poli, B. Roblin, P. Gestas, E. Chungue, G. Granic, P. Imbert, J. L. Pecarere, R. Vergez-Pascal, P. Watte, et al. 1993. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48: 324–331.
48. Simmons, C., and J. Farrar. 2008. Insights into inflammation and influenza. *N. Engl. J. Med.* 359: 1621–1623.
49. Moretta, L., R. Binassoni, C. Bottino, C. Cantoni, D. Pende, M. C. Mingari, and A. Moretta. 2002. Human NK cells and their receptors. *Microbes Infect.* 4: 1539–1544.
50. Bowie, A. G., and L. Unterholzner. 2008. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 911–922.
51. Gangadharan, B., M. A. Hoeve, J. E. Allen, B. Ebrahimi, S. M. Rhind, B. M. Dutia, and A. A. Nash. 2008. Murine gammaherpesvirus-induced fibrosis is associated with the development of alternatively activated macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 84: 50–58.
52. Mora, A. L., E. Torres-González, M. Rojas, C. Corredor, J. Ritzenthaler, J. Xu, J. Roman, K. Brigham, and A. Stecenko. 2006. Activation of alveolar macrophages via the alternative pathway in herpesvirus-induced lung fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 35: 466–473.
53. Meneghin, A., and C. M. Hogaboam. 2007. Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis. *J. Clin. Invest.* 117: 530–538.
54. Savill, J., I. Dransfield, C. Gregory, and C. Haslett. 2002. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 965–975.
55. Martinic, M. M., and M. G. von Herrath. 2008. Novel strategies to eliminate persistent viral infections. *Trends Immunol.* 29: 116–124.

**Revised version 09-002555FLR**

**Supplemental figure and tables:**

**Supplemental Figure 1:** Biochemical identification of CHIKV from clinical samples. A. CHIKV isolated from a serum sample (RT-PCR+, clone #4) is able to infect VERO cells (green African monkey epithelial cells) and leading to profound cytopathic activities and apoptotic blebbing (b, c, arrowhead) when compared to control cells (a). d. MTT assay confirmed the dose-response cytopathic activity (48h). B. The commitment to apoptosis was indicated by the detection of cleaved PARP (p85 fragment, anti-neoepitope antibody from Promega) in CHIKV infected cells. Equal protein load was validated by the CD248 signal.

**Supplemental Table I:** Clinical data and biological values of CHIKVD patients from T0 up to 12 month post-infection compared to healthy controls and positive controls (CMV and bacteria). CHIKV RT-PCR (for the E1 gene as expressed as Ct value), anti-CHIKV (IgM and IgG) antibody responses (OD ELISA data), cell counts and biochemical analyses are indicated and including physiological range values. Values below or above the limits are indicated. The chronic status (pain in more than one articulation months after the initial infection) experienced by the patients was also reported. (D: Day, W: week, M: Month). Uk, unknown. Nd, not detected.

**Supplemental Table II:** Gene expression profiling (Q-RT-PCR, superarray technology) of chemokines and receptors in CHIKVD PBMCs when compared to healthy control PBMCs using the superarray quantitative technology. Results from four 'chronic' patients at T0 and

M6 are expressed as fold increase over control (n=2). (up-regulated expression is highlighted in orange). Chronic patients were: 23 (C1), 26 (C2), 32 (C8), 4045 (C10).

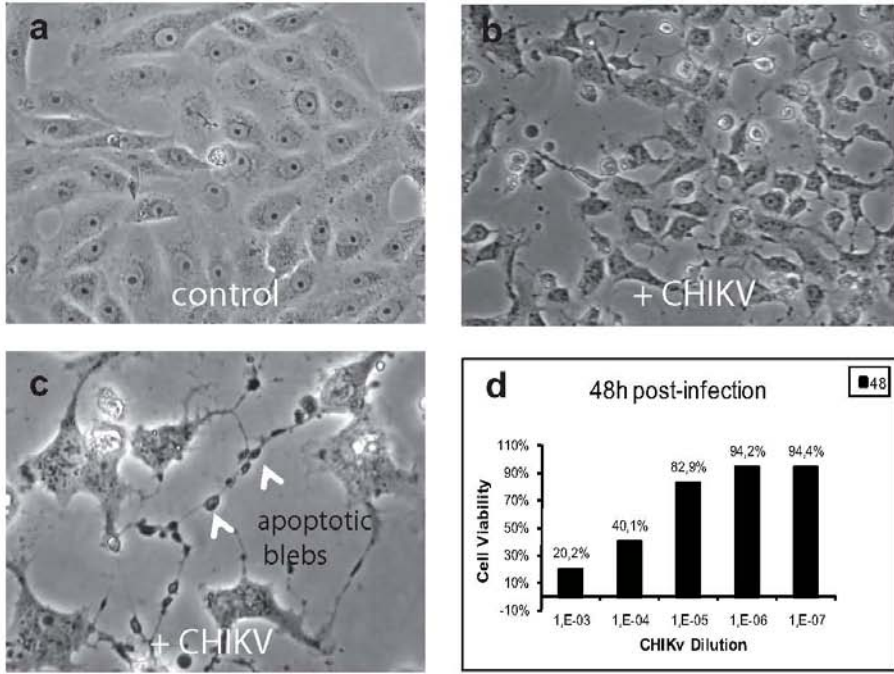
**Supplemental Table III:** Innate and adaptive immune cell activation in PBMCs from CHIKVD patients: Several immunophenotyping experiments were carried out using PBMCs from CHIKVD patients (T0, n=8) and compared to healthy control PBMCs (n=10). The different cell populations were identified according to the staining for specific cell markers and the relative activation status was quantified by staining for CD69, HLA DR, CD5, CD23 and CD38. The percentage of the different cell populations is expressed as mean  $\pm$  SD. (ly, lymphocyte;  $\Sigma\%$ , % of total cell population; TCR, T cell receptor, MFI, Mean fluorescence intensity; lin, lineage).

**Supplemental Table IV:** RAW data from the superarray assay (Human Chemokines and Receptors RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array kit ([http://www.superarray.com/rt\\_per\\_product/HTML/PAHS-022A.html](http://www.superarray.com/rt_per_product/HTML/PAHS-022A.html)), SuperArray APHS-022A kit, Bioscience Corporation). Mean of Ct values obtained from three independent experiments using RNA samples from Chronic patients PBMCs (patients 23 (chronic 1), 26 (Chronic 2), 32 and 4045 at T0 or at M6) versus control PBMCs (one subject). These data were analyzed to build Figure 3 (Chemokine expression as fold increase over PBMC healthy control).

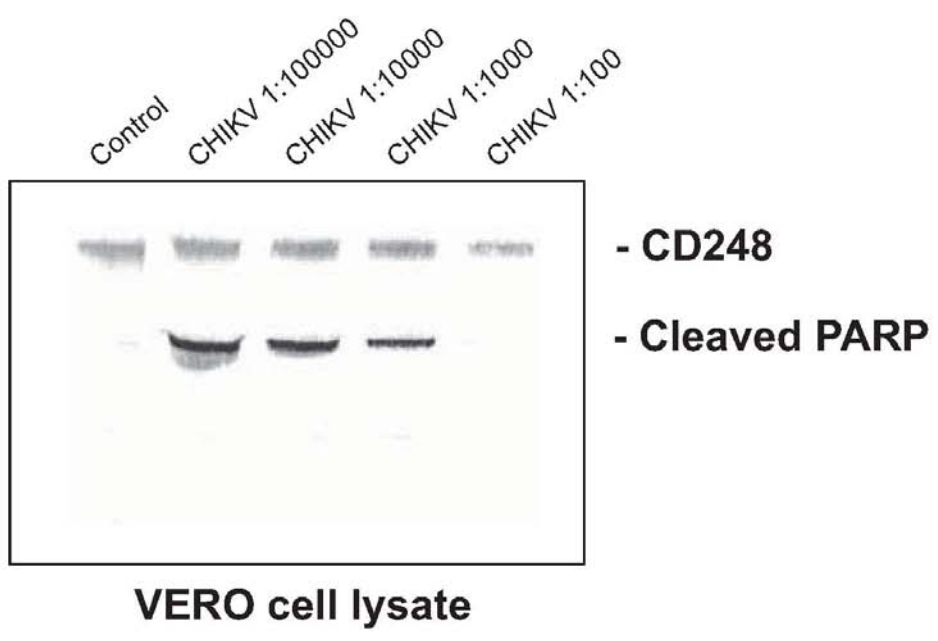


# Supplemental Figure 1

A.



B.



Supplement Table I: Clinical data of CHIKVD patients during the time course of the disease

Patient number	Visit	PCR chikv (E1) (Ct)	IgM chik	IgG chik	CRP [0-10] <sup>1</sup>	Fibrinogen [2.5 - 4.5] <sup>2</sup>	Neutrophil [1.4 - 7.0] <sup>3</sup>	Platelets [150-450] <sup>4</sup>	Lymphocytes [1.2-4.0] <sup>5</sup>	C3 [0.75 - 1.40] <sup>6</sup>	C4 [0.10 - 0.34] <sup>7</sup>	Chronic status
1	T0	-	0.53	0.22	7	5.3	1.9	143	1.79			
	D15	-	0.52	0.95	2	2.6	2.6	223	2.51			
	W6	-	0.45	1.50	10							
	M3	-	0.35	1.88	7							
	M9	-	0.01	0.77	2		2	269	2.66			
	M12	-	0.04	1.00	3		2.8	225	3.06	1.17	0.11	0
2	T0	23,50	uk	uk	8	4.4	5.7	211	0.42			
	D15	-	0.28	0.53	7							
	W6	-	0.46	1.47	9							
	M3	-	0.43	1.80	2							3/10
3	T0	-	0.49	0.01	7	3.7	1.0	116	0.42			
	D15	-	0.51	1.08	2		2.9	186	2.54			0
4	T0	16,10	0.53	0.46	128		16.4	124	1.12			
	D15	-	0.54	1.23	46	6.4	6.2	320	2.29	1.54	0.47	
	W6	-	0.52	1.65	163		7.6	438	4.05			
	M12	-	0.25	1.56	63		6.4	207	2.13	1.31	0.41	8/10
5	T0	-	0.12	0.01	9	3.3	1	145	0.90	1.65	0.34	
	W6	-			15		7	191	1.17			3/10
6	T0	37,40	0.46	0.03	6	3.2	1.9	78	0.74	1.25	0.32	death
7	T0	23,10	0.19	0.01	102	3.9	3	117	0.26			
	M12	-	0.13	1.89	3		3.8	195	2.10	1.44	0.28	4/10
8	T0	27,10	0.18	0.01	55	4.7	4.1	159	0.36			0
	T0	-	0.31	0.01	19	4.6	1.8	211	0.87			
	D15	-	0.51	0.52	2		4.3	317	1.91			
9	M12	-	0.17	1.83	2		3.5	270	2.0	1.03	0.19	0
	T0	39,90	0.10	0.10	28		2.2	144	0.71	0.96	0.28	
	D15	-	0.52	0.34	8		5.2	298	1.66			
11	M12	-	0.27	1.07	2		3.7	206	1.69	1.06	0.25	0
	T0	36,10	0.10	0.02	8	3.5	1.5	90	0.77	1.26	0.29	
12	W6	-	0.28	1.00	2		3.5	182	1.48			0
	D15	-	0.52	0.50	32		2.7	50	0.33			
13	W6	-	0.50	1.44	23		2.5	43	0.28			uk
	T0	24,20	0.02	0.02	32	4.2	8.5	357	0.59			
15	M12	-	0.07	0.93	2		5.1	420	2.06	1.02	0.27	0
	T0	28,60	0.05	0.01	85	4	0.9	124	0.83	1.52	0.39	
16	M6	-	0.02	0.85	2		2.7	169	2.09			
	M12	-	0.02	1.61	4		2.7	145	1.96			8/10

Number patient	Visit	PCR chikv (E1) (Ct)	IgM chik	IgG chik	CRP [0-10] <sup>1</sup>	Fibrinogen [2.5 - 4.5] <sup>2</sup>	Neutrophil [1.4 - 7.0] <sup>3</sup>	Platelets [150-450] <sup>4</sup>	Lymphocytes [1.2-4.0] <sup>5</sup>	C3 [0.75 - 1.40] <sup>6</sup>	C4 [0.10 - 0.34] <sup>7</sup>	Chronic status
18	T0	39,40	0.27	0.01	84	4.6	3.1	114	0.86	0.85	0.21	
	D15	-	0.51	0.67	2							
	W6	-	0.48	1.10	2		8.2	189	1.33			uk
19	T0	21,60	0.01	0.01	188	4.6	4.2	112	0.38	1.56	0.55	
	D15	-	0.50	0.41	18					1.98	0.68	
	W6	-	0.48	1.27	5							
	M3	-	0.25	0.81	2		2.5	208	3.72			
	M6	-	0.01	0.58	3		2.8	198	3.50			
20	M12	-	0.12	1.42	5		3.6	219	3.01	1.43	0.47	7/10
	T0	-	0.54	0.34	2	4.1	5.2	303	2.22			
	D15	-	0.42	1.38	2		1.6	419	1.72			uk
21	M9	-	0.01	1.08	58		4.2	209	2.11			8/10
	T0	-	0.22	1.56								
	M3	-	0.06	1.94	4	3.5	3.3	196	2.71			
22	M6	-	0.10	1.24	2		3.4	199	2.15			5/10
	T0	20,30	0.89	0.01	10	3.8	1.9	161	0.96			
	D15	-	0.52	0.90	2		10.1	297	0.92			
23	M6	-	0.01	1.24	3		5.1	243	2.71			
	M12	-	0.18	1.61	13		9.4	257	1.50	1.27	0.39	7/10
	T0	33,50	0.91	0.01	12	3.7	0.9	133	0.63			uk
25	T0	37,10	0.01	0.01	40	3.7	3.9	181	0.93			uk
26	T0	20,80	0.86	0.04	14	3.8	2	132	0.82			
	M6	-	0.01	0.78	27		14	257	1.26			
	M12	-	0.38	1.32	17	4.1	7.7	292	1.87	1.24	0.22	7/10
27	T0	34,10			59		2.7	74	0.17			uk
28	T0	-	0.27	0.02	3	3.5	1.6	231	1.04			
	M12	-	0.13	1.79	5		1.9	298	1.95	1.23	0.25	0
29	T0	-	0.49	0.03	3	3.4	2.3	266	2.21			
	D15	-			4							
	W6	-	0.23	0.86	2		4.6	348	2.42			0
30	M6	-	0.35	1.20	2							
	T0	-	1.50		2	3.2	3.5	116	0.70			
	T0	-	0.36	0.02		4.4	1.1	322	2.01			
31	D15	-	0.72	0.31		2.4		244	2.18			
	W6	-	0.59	1.70	2							
	M3	-	0.01	0.57	2							
	M6	-	0.02	0.87			2.6	240	2.80	1.25	0.31	5/10
	M12	-	0.09	1.48	2							
32	T0	21,70	0.01	0.01	73	2.9	2.6	154	0.61			
	M6	-	0.58	0.89	7		2.3	241	3.26			
	M12	-	0.13	1.59	2		2.9	204	3.52	1.06	0.29	8/10
34	T0	18,90	0.01	0.01	68	3.9	1.4	23	0.46			0

Number patient	Visit	PCR chikv (E1) (Ct)	IgM chik	IgG chik	CRP [0-10] <sup>1</sup>	Fibrinogen [2.5 - 4.5] <sup>2</sup>	Neutrophil [1.4 - 7.0] <sup>3</sup>	Platelets [150-450] <sup>4</sup>	Lymphocytes [1.2-4.0] <sup>5</sup>	C3 [0.75 - 1.40] <sup>6</sup>	C4 [0.10 - 0.34] <sup>7</sup>	Chronic status
35	T0	38,50	0.01	0.01	15	3.4	2.8	162	1.29			0
37	T0	29,00	0.10	0.01	50	5	2.7	223	1.06	1.59	0.28	0
	T0	33,00	0.59	0.20	12	4.2	0.8	259	0.32			
38	D15	-	0.62	1.06	10							
	M6	-	0.07	1.34	7		4.5	351	1.78			
	M12	-	0.14	2.04	9		4.1	391	2.0	1.28	0.52	3/10
39	M6	-	0.11	1.81		3.9	2.2	105	1.33			
	M9	-	0.01	1.01								5/10
40	M6	-	0.07	2.06	8	4.6	2.6	220	1.30			
	M12	-	0.13	1.92	66		3.8	251	1.26	1.53	0.44	5/10
41	M6	-	0.14	2.12	21	4.8	8.5	297	1.85			
	M9	-	0.01	1.22	20	5.5	6.6	247	1.53			0
42	M6	-	0.15	1.87	10	5.6	8	209	2.07			
	M9	-	0.01	0.75	13	5.7	5.7	201	2.67			2/10
43	M6	-	0.10	2.11	4	3.4	2.5	205	2.93			
	M9	-	0.01	1.18	4	2.7	2.7	190	2.12			0
44	M6	-	0.07	1.84		4.2	7.5	384	1.87			
	M9	-	0.15	0.94	4		6.3	397	1.91			5/10
	M6	-	0.11	2.07		3.4	4.8	187	2.89			
	M9	-	0.01	1.67	8		5.5	254	3.77			
	M12	-	0.79	2			5.2	232	3.54	1.42	0.21	5/10
46	M6	-	0.04	1.91		3.9	3.5	222	3.21			
	M9	-	0.01	1.52	6		3.6	212	3.04			3/10
47	M6	-	0.06	1.90		3.9	2.6	236	2.67			
	M9	-	0.22	1.07	2		2.4	179	2.38			
	M12	-	0.18	1.83	3		2.9	213	2.15	1.43	0.20	0
49	M6	-	0.03	1.87		4	4.7	139	1.90			
	M9	-	0.01	1.30	2		3	116	1.47			0
50	M6	-	0.01	1.94	2	3.9	3.4	146	1.43			
	M9	-	0.01	1.59	2	4	4	152	1.52			7/10
1001	M6	-	0.04	2.00	5	4.2	3.5	210	2.06			
	M9	-	0.01	1.62	4		3.5	192	2.16			2/10
1002	M6	-	0.10	1.85	2	2.3	3.7	184	0.73			
	M9	-	0.37	2.00	2		4.2	183	0.86			2/10
	M6	-	0.06	1.59	14	4.5	4.9	290	3.59			
1003	M9	-	0.28	0.71	7		4.7	227	2.77			
	M12	-	0.33	1.43	9		4.6	207	3.05	1.60	0.27	2/10
4045	T0	-	0.32	0.01	19		1.9	128	0.8			
	M6	-	0.90	1.96	6		2.5	214	2.5			7/10

		PCR chikv (E1) (Ct)	IgM chik	IgG chik	CRP [0-10] <sup>1</sup>	Fibrinogen [2.5 - 4.5] <sup>2</sup>	Neutrophil [1.4 - 7.0] <sup>3</sup>	Platelets [150-450] <sup>4</sup>	Lymphocytes [1.2-4.0] <sup>5</sup>	C3 [0.75 - 1.40] <sup>6</sup>	C4 [0.10 - 0.34] <sup>7</sup>	
Healthy control	OV	-	nd	nd	2		2.8	264	2.02	0.89	0.15	
	PG	-	nd	nd	3		2.6	222	2.18	1.21	0.14	
	MCJ	-	nd	nd	2		3.7	191	1.60	0.78	0.23	
	GT	-	nd	nd		2.4		5.1	350	2.39		
	TD	-	nd	nd		2.8		3	265	1.69		
	AMT	-	nd	nd		2.1		3	221	2.30		
	ADP	-	nd	nd		3.5		2.6	295	1.73		
	BD	-	nd	nd		2.5		3.9	210	1.85		
	CMV	AN				45		10.7	45	0.67		
	CMV	VK				11		4.9	158	3.46		
Bact.	TRP				73		10.4	47	11			
CMV	NA				211	6.8	2.3	106	17.9			
Bact.	AHF						2.1	550	60.6			
Bact.	JR				141		3.3	145	4.3			
Bact.	LS						8.3	129	7			
Bact.	SS				47	4	4.7	104	6			
Bact.	CD				113	5.8	1.2	95	30			

Below physiological range

Above physiological range

nd= not detected

uk=unknown

<sup>1</sup> physiological range mg/l

<sup>2</sup> physiological range g/l

<sup>3</sup> physiological range 10<sup>9</sup>/l

**Supplemental Table II :**

**Gene profiling of CHIKV 'chronic patients' compared to 'Healthy' control patients**

Symbol	Gene Name	Fold increase over control PBMC						Functional genes groups
		23T0	23M6	26T0	26M6	32T0	4045T0	
CCL1	I-309/P500	79,57	24,32	12,05	79,46	12,44	38,12	Chemokines C-C Motif Ligands
CCL2	MCP-1/GDGF-2/GDGF-2 HC11	202,81	3,40	9,61	2,21	6,57	57,92	
CCL3	MIP-1a /GOS19-1/LD78ALPHA	0,97	0,15	0,26	0,25	1,00	0,42	
CCL4	MIP-1b/ ACT2/G-26	0,65	2,14	0,33	0,57	2,01	0,44	
CCL5	D17S136E/RANTES	0,46	0,23	0,78	1,89	1,20	1,08	
CCL7	MCP-3/ FIC/MARC	67,78	5,07	0,90	6,17	4,95	82,95	
CCL15	HCC-2/HMRP-2B	9,65	0,70	334,03	18,35	0,74	2,49	
CCL16	Ckb12/HCC-4	73,35	2,64	8,35	182,88	84,15	1,69	
CCL19	CKb11/ELC	53,55	2,69	0,62	2,58	5,25	12,69	
CCR1	CD191/CKR-1	11,27	1,75	4,90	3,10	5,52	2,76	
CCR2	CC-CKR-2/CCR2A	5,89	5,25	6,45	8,30	1,73	1,26	
CCR3	CC-CKR-3/CD193	82,02	5,35	16,49	17,08	4,00	14,77	
CCR4	CC-CKR-4/CKR4/CD194	0,91	1,85	0,72	0,51	0,82	0,76	
CCR5	CC-CKR-5/CCCKR5	178,27	10,45	7,59	2,56	6,25	33,66	
CCR6	BN-1/CD196	1,25	0,42	0,66	1,22	0,78	0,40	
CCR7	BLR2/CD197	0,31	0,76	0,10	0,10	0,86	0,57	
CCR8	CDw198/CKR-L1	15,71	2,85	2,26	3,81	2,31	4,57	
CCR10	GPR2	14,53	6,50	38,28	192,47	6,41	3,13	
CCRL1	CC-CKR-11/CCBP2	8,18	0,84	0,24	1,60	1,92	1,82	
CCRL2	CKRX/CRAM-A	7,62	1,04	0,91	0,09	3,02	3,17	Chemokines C-X-C Motif Ligands
CXCL1	FSP/GRO1/GROa	11,99	1,09	1,60	0,16	0,13	2,15	
CXCL2	CINC-2a/GRO2	3,25	0,06	0,48	0,08	0,21	2,20	
CXCL3	CINC-2b/GRO3	20,68	0,29	0,52	0,26	0,76	5,82	
CXCL5	ENA-78/SCYB5	26,26	31,20	2,31	24,73	7,45	18,68	
CXCL6	CKA-3/GCP-2	151,37	3,16	0,94	2,19	6,48	28,42	
CXCL9	CMK/Humig	49,72	3,83	5,83	0,81	2,56	9,66	
CXCL11	H174/I-TAC	122,38	4,80	5,24	0,82	14,10	19,05	
CXCR4	CD184/D2S201E	0,30	1,10	0,54	0,23	0,98	0,33	
CXCR6	BONZO/CD186	1,85	0,79	8,56	0,97	1,96	1,45	
CYFIP2	PIR121	0,68	0,54	0,99	1,15	2,94	0,84	Chemokines C-X-C Motif Receptors
IL16	HsT19289/IL-16	0,27	0,41	0,64	0,58	0,59	0,22	
IL18	IGIF/IL-18	1,48	1,40	0,66	1,54	0,72	0,44	Other innate immune molecules
MMP2	CLG4/CLG4A	114,16	2,83	6,91	2,35	4,75	11,95	
MYD88	MyD88	1,26	0,49	0,98	0,70	2,12	0,57	
NFKB1	DKFZp686C01211/EBP-1	2,10	0,48	0,56	0,43	1,88	3,95	
GAPDH	G3PD/GAPD	1,63	1,06	1,49	1,05	0,54	1,15	House keeping
ACTB	PS1TP5BP1	1,16	0,38	1,26	1,15	1,71	1,34	

**Supplemental Table III: Immunophenotyping of CHIKV patients (T0) versus healthy controls**

	Total	T																				
		Total		T CD4 lymphocytes										T CD8 lymphocytes								
		Purity	CD3+	TCR αβ+	TCR γδ+	CD69 activated	Total	Effector	Non-effector memory	Naive	Memory effector	HLA-DR activated	Total	Effector	Non-effector memory	Naive	Memory effector	HLA-DR activated	CD38+	CD57 activated	CD38 & CD57 activated	
																						14-45+
Σ%	/Ly	/CD3+	/CD3+	/CD3+	/Ly	/CD4+	/CD4+	/CD4+	/CD4+	/CD4+	/CD4+	/Ly	/CD8+	/CD8+	/CD8+	/CD8+	/CD8+	/CD8+	/CD8+	/CD8+		
Control	Mean	28,9	99,4	70,4	89,0	6,6	6,0	40,1	3,0	29,2	45,9	21,9	4,4	21,2	15,4	13,8	53,5	17,4	12,7	44,5	18,8	6,2
	Std. Dev.	2,8	0,2	4,3	3,4	1,9	1,0	2,4	0,9	4,2	5,5	4,2	0,8	3,2	3,7	3,1	7,3	4,5	2,7	5,9	6,5	1,4
	median	28,5	99,5	73,6	90,7	5,4	6,6	42,1	3,3	29,2	40,8	23,7	4,3	21,7	13,1	11,6	55,4	15,1	11,2	50,4	16,4	6,1
T0	Mean	16,6	98,8	70,3	93,3	3,1	45,6	42,7	5,5	36,6	40,3	17,6	14,5	21,1	16,4	15,0	60,8	7,7	51,7	74,5	33,6	27,3
	Std. Dev.	4,8	1,1	4,0	2,2	0,8	11,4	4,6	1,7	6,4	6,7	4,3	3,0	6,2	2,5	4,1	6,3	2,3	8,1	10,2	7,1	8,2
	median	16,1	99,6	70,0	94,7	2,8	49,0	43,8	4,7	30,3	39,7	17,5	13,9	15,6	16,4	12,2	60,4	6,3	52,3	80,7	37,3	30,6

	Total	B lymphocytes										NK cells		Dendritic cells					
		Total	Naive	Non-effector memory	Memory effector	Others	CD 5 activated		CD23 activated		CD5 & CD23 activated		Total	Activated	Total	Myeloid	Plasmacytoid	11c	Activated
							CD19+	CD5+	CD23+	5+23+	56+3-	56+69+							
		/Ly	/CD19+	/CD19+	/CD19+	/CD19+	/CD19+	MFI	/CD19+	MFI	/CD19+	/Ly	/CD3-	/Ly	/Lin-DR+	/Lin-DR+	MFI	/Lin-DR+	
Control	Mean	14,3	34,2	44,3	18,7	2,8	43,9	3,0	77,3	3,0	35,4	8,3	9,8	1,0	37,9	62,1	20,2	1,5	
	Std. Dev.	2,2	4,0	6,0	5,0	1,0	4,8	0,8	4,3	0,6	3,7	2,3	2,0	0,2	5,3	5,3	3,9	0,4	
	median	14,3	36,2	46,9	15,6	1,8	43,3	2,6	78,1	2,7	36,8	6,9	9,8	0,8	39,0	61,0	18,4	1,3	
T0	Mean	11,1	7,9	34,8	47,4	9,9	41,4	5,1	76,5	5,6	11,3	15,2	66,3	1,4	21,8	78,2	9,9	0,0	
	Std. Dev.	4,6	3,2	12,3	11,6	5,2	8,5	1,4	3,5	1,1	3,6	4,1	11,1	0,3	7,7	7,7	3,0	0,0	
	median	7,1	7,1	40,3	45,4	4,6	48,9	5,5	73,1	6,2	12,6	15,4	73,9	1,4	18,3	81,7	8,5	0,0	

Supplemental table IV

Symbol	Gene Name	Ct values						
		23T0	23M6	26T0	26M6	32T0	4045T0	Control
AGTRL1	APJ	31,18	31,18	35,84	35,00	31,24	30,69	31,85
BDNF	MGC34632	24,84	28,01	29,37	32,32	25,99	26,26	27,68
BLR1	CD185/CXCR5	26,04	24,49	27,59	28,05	23,11	23,54	22,39
C5	CPAMD4	26,63	26,65	28,84	28,09	25,19	26,80	25,92
C5AR1	CSA/C5AR	21,40	22,91	24,39	24,90	20,19	20,79	19,00
CCBP2	CCR10/CCR9	25,76	26,96	30,17	27,47	25,85	26,01	26,95
CCL1	I-309/P500	24,69	26,98	29,02	28,36	26,17	24,87	29,35
CCL11	SCYA11	25,52	25,22	25,80	26,36	24,66	24,84	28,84
CCL13	Ckb10/MCP-4	25,02	27,32	35,92	29,50	26,27	26,25	29,18
CCL15	HCC-2/HMRP-2B	26,31	30,68	22,80	29,05	28,82	27,38	27,93
CCL16	Ckb12/HCC-4	24,48	29,86	29,22	26,83	23,09	29,04	29,02
CCL17	ABCD-2/SCYA17	32,97	30,20	30,63	30,40	31,22	32,01	33,77
CCL18	AMAC-1/AMAC1	31,72	35,41	37,12	35,00	32,06	33,93	34,86
CCL19	Ckb11/ELC	26,95	31,85	36,66	35,00	29,11	28,15	31,04
CCL2	GDCF-2/GDCF-2 HC1	23,19	29,68	29,20	33,38	26,95	24,12	29,21
CCL3	GOS19-1/LD78ALPHA	22,86	26,15	26,39	28,51	21,64	23,21	21,17
CCL4	ACT2/G-26	23,52	22,39	26,13	27,40	20,70	23,23	21,25
CCL5	D175136E/RANTES	22,28	23,88	23,13	23,92	19,71	20,17	19,51
CCL7	FIC/MARC	27,16	31,48	37,72	34,29	29,74	25,99	31,59
CCL8	HCC14/MCP-2	25,20	30,35	33,70	33,56	28,17	27,21	34,98
CCR1	CD191/CKR-1	21,77	25,04	24,57	27,30	21,60	22,92	23,61
CCR10	GPR2	28,21	29,95	28,42	28,15	28,20	29,54	30,42
CCR2	CC-CKR-2/CCR2A	24,52	25,27	26,00	27,70	25,09	25,87	25,43
CCR3	CC-CKR-3/CD193	25,47	30,00	29,39	31,41	28,64	27,07	30,18
CCR4	CC-CKR-4/CKR4	24,62	24,17	26,55	29,12	23,58	24,00	22,83
CCR5	CC-CKR-5/CCCKR5	24,49	29,17	30,66	34,29	28,14	26,02	30,32
CCR6	BN-1/CD196	25,54	27,71	28,07	29,25	25,03	26,31	24,21
CCR7	BLR2/CD197	23,77	23,06	26,95	29,12	21,10	22,01	20,42
CCR8	CDw198/CKR-L1	25,35	28,39	29,75	31,06	26,92	26,25	27,67
CCR11	CC-CKR-11/CCBP2	24,18	28,04	30,88	30,20	25,08	25,47	25,56
CCR2L2	CKRX/CRAM-A	24,87	28,33	29,54	35,00	25,01	25,26	26,15
CKLF	C32/CKLF1	23,89	23,01	25,78	27,31	23,68	23,81	22,86
CMTM1	CKLFH/CKLFH1	32,49	35,50	37,34	35,00	33,84	34,47	35,40
CMTM2	CKLFSF2	26,04	30,03	33,05	33,16	27,42	27,34	29,09
CMTM3	BNAS2/CKLFSF3	23,57	22,81	26,22	28,00	22,32	23,19	21,28
CMTM4	CKLFSF4	25,72	29,02	29,19	31,09	26,39	26,39	25,96
CMKLR1	ChemR23/DEZ	25,76	26,31	29,42	29,89	21,26	26,32	23,77
CSF3	G-CSF/GCSF	28,52	29,32	31,96	33,30	29,00	28,55	27,57
CX3CL1	ABCD-3/C3Xkine	32,89	32,15	33,48	34,07	33,39	32,35	32,37
CX3CR1	CCR11/CMKBRL1	27,43	27,42	27,95	28,18	20,25	26,53	23,90
CXCL1	GRO1/GROa	24,75	28,79	29,26	34,64	30,05	26,35	26,68
CXCL10	C7/IFI10	25,87	27,51	30,01	32,99	22,37	26,86	27,11
CXCL11	H174/I-TAC	24,12	29,37	30,27	35,00	26,04	25,92	29,40
CXCL12	PBSF/SCYB12	29,64	33,01	34,26	35,00	30,68	31,86	33,49
CXCL13	ANGIE/ANGIE2	31,56	31,49	31,18	35,00	32,63	33,19	32,43
CXCL2	CINC-2a/GRO2	26,01	32,25	30,38	35,00	28,74	25,69	26,06
CXCL3	CINC-2b/GRO3	24,20	30,93	31,12	34,20	27,77	25,15	26,92
CXCL5	ENA-78/SCYB5	24,18	24,51	29,29	27,93	24,80	23,79	27,24
CXCL6	CKA-3/GCP-2	25,22	31,39	34,16	35,00	28,58	26,75	30,81
CXCL9	CMK/Humig	24,66	28,94	29,36	34,28	27,75	26,15	28,65
CXCR3	CD182/CD183	26,19	26,23	25,90	27,20	24,92	25,37	25,72
CXCR4	CD184/D2S201E	20,15	18,85	20,92	24,23	17,25	19,13	16,76
CXCR6	BONZO/CD186	25,96	27,78	25,36	30,57	24,69	25,44	25,20
CYFIP2	PIR121	23,18	24,09	24,24	26,08	19,87	21,99	20,96
ECGF1	MNGIE/PDECGF	20,06	23,15	22,73	25,83	19,24	20,50	20,47
GDF5	CDMP1/LAP4	29,56	31,09	31,75	33,03	29,96	32,53	31,47
GPR31	GPR31	26,49	27,44	29,59	29,47	27,58	27,43	29,32
GPR81	FKSG80/GPR104	27,80	31,19		35,00	29,29	28,27	34,01
HIF1A	HIF-1alpha/HIF1-ALP	19,98	22,49	23,49	26,26	20,88	18,77	20,26
IL13	ALRH/BHR1	28,28	30,38	30,90	32,86	28,79	29,66	31,34
IL16	HsT19289/IL-16	24,20	24,18	24,55	26,76	21,88	23,59	20,65

IL18	IGIF/IL-18	26,29	26,95	29,06	29,90	26,13	27,16	25,20
IL1A	IL-1A/IL1	25,00	30,51	30,41	34,00	28,19	26,38	26,94
IL4	BSF1/IL-4	26,10	31,72	38,01	35,00	29,19	27,61	32,65
IL8	3-10C/AMCF-I	17,86	21,08	22,89	26,07	24,20	17,32	18,46
IL8RA	C-C/C-C CKR-1	23,35	29,40	25,85	30,54	25,00	25,23	27,30
LTB4R	BLT1/BLTR	23,95	26,23	26,53	28,60	23,42	24,73	22,36
MMP2	CLG4/CLG4A	25,73	31,64	31,38	35,00	29,12	28,10	30,91
MMP7	MMP-7/MPSL1	30,71	31,39	30,73	33,06	30,96	32,32	30,66
MYD88	MyD88	21,64	23,58	23,61	26,16	19,70	21,91	20,32
NFKB1	DKFZp686C01211/EB	22,85	25,58	26,38	28,82	21,82	21,07	22,28
SCYE1	AIMP1/EMAP II	23,48	23,95	25,09	28,22	22,31	22,81	21,09
SDF2	SDF2	24,70	24,47	27,89	29,64	23,24	24,91	23,51
SLIT2	SLIL3/Slit-2	26,14	32,02	34,96	35,00	29,97	27,65	36,37
TCP10	MGC34049	25,79	31,03		35,00	28,97	26,12	29,93
TLR2	CD282/TIL4	21,52	23,49	25,17	26,19	22,58	22,03	22,85
TLR4	CD284/TOLL	27,05	29,88	30,28	31,87	26,70	27,04	28,03
TNF	DIF/TNF-alpha	21,95	25,13	25,23	26,98	23,28	21,93	22,53
TNFRSF1A	CD120a/FPF	25,75	27,80	27,06	30,08	25,06	25,37	24,79
TNFSF14	CD258/HVEML	31,88	32,07	30,81	34,39	32,45	31,94	34,08
TREM1	TREM-1	22,37	24,18	24,65	26,35	24,70	21,21	22,07
VHL	HRC1/RCA1	25,13	28,02	27,16	28,31	23,39	24,42	23,38
XCL1	ATAC/LPTN	23,20	24,98	27,02	26,74	23,50	23,63	23,61
XCR1	CCXCR1/GPRS5	32,45	35,10	34,30	35,00	34,04	37,69	
B2M	B2M	15,97	14,31	17,18	19,87	14,18	15,11	14,43
HPRT1	HGPRT/HPRT	24,88	23,46	26,95	28,40	23,62	24,29	23,57
RPL13A	RPL13A	22,09	24,70	23,62	25,03	20,54	20,60	19,07
GAPDH	G3PD/GAPD	18,56	19,76	20,29	22,87	18,95	18,19	17,61
ACTB	PS1TP5BP1	17,13	19,32	18,62	20,82	15,39	16,05	15,70
GDC	GDC	15,43	21,99	31,10	24,88	18,36	17,73	24,01
RTC	RTC	21,58	21,38	28,62	22,51	21,05	21,23	21,94
RTC	RTC	21,62	21,44	28,54	22,53	21,14	21,13	21,10
RTC	RTC	21,40	21,50	29,90	22,33	20,80	21,03	20,82
RTC (mean)		21,53	21,44	29,02	17,25	21,00	21,13	21,28
PPC	PPC	17,26	17,17	16,99	17,19	17,08	17,08	17,41
PPC	PPC	17,20	17,07	17,25	17,11	17,00	17,06	17,46
PPC	PPC	17,18	17,06	17,21	21,38	16,94	16,98	17,53
PPC (Mean)		17,21	17,10	17,15	21,44	17,01	17,04	17,47

RTC : Reverse Transcription Control

PPC :

GDC : Genomic DNA Contamination

***Article 4: Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defence.***

L'apoptose suite à une infection virale, est un mécanisme classique de défense, l'auto-destruction cellulaire constituant un des moyens de limiter la production et la dissémination du virus. Néanmoins, nombre de virus ont développé des stratégies d'évasion, de contournement ou de contrôle de l'apoptose : bloquer l'apoptose peut favoriser une infection persistante ou faciliter la dissémination virale, contrôler et activer la phase terminale de l'apoptose peut empêcher ou gêner la réponse immune et inflammatoire (Everett and McFadden 1999). Plusieurs travaux font état de la capacité des alphavirus à causer de l'apoptose impliquée dans la pathogénèse (Glasgow, McGee et al. 1998; Galluzzi, Brenner et al. 2008 ). Parmi les cibles du CHIKV, la cellule principale reconnue est le fibroblaste du tissu conjonctif, bien que le virus infecte aussi le foie, le muscle et le cerveau (Sourisseau, Schilte et al. 2007; Couderc, Chretien et al. 2008). Il est établi que le virus CHIKV se cache dans les macrophages, contribuant ainsi à l'inflammation chronique des articulations chez les macaques (Labadie, Larcher et al. 2010) et chez l'homme (Article 3) et avec l'observation de nombreuses cellules apoptotiques. L'objet de ce travail a été d'étudier les mécanismes de l'apoptose développés par la cellule en réponse au CHIKV en utilisant le modèle cellulaire Hela, ainsi que les fibroblastes primaires humains et de définir le rôle de l'apoptose dans le contrôle de l'infection, ainsi que dans la persistance virale.

1 – Caractérisation de l'apoptose sur le modèle Hela:

L'utilisation du modèle cellulaire Hela, connu pour être sensible au CHIKV, nous a permis de définir le phénomène d'apoptose dans l'effet cytopathique développé par le virus. Cette activité cytopathique est dose-dépendante. Les voies d'activation de l'apoptose ont été suivies de T0 à 48



heures, et les marqueurs de l'apoptose étudiés par immun marquages et Western-blot. Nous avons utilisé l'étoposide, inducteur d'apoptose, comme contrôle positif.

L'engagement de l'apoptose par le CHIKV est dépendant de sa capacité de réplication car il n'a pas été observé avec du CHIKV inactivé au UVs. De façon séquentielle, l'infection par le CHIKV entraîne l'apparition du cytochrome c cytosolique à 8h dans les cellules en même temps que la présence du virus (immunodétection d'E1) ; à 24h, on observe une infection CHIKV dans 20% des cellules, dont 50% d'entre elles présentent une relocalisation mitochondriale de Bax ; quelques cellules présentent PARP clivé (PARP étant le substrat des caspases). A 48h post-infection, plus de 95% des cellules sont apoptotiques (PARP clivé). Nous avons observé, de façon remarquable, que parmi les cellules apoptotiques, une partie d'entre elles (2% à 16h, 65% à 48h) n'est pas infectée par le virus CHIKV, ce qui suggère que les cellules voisines des cellules infectées ont reçu un signal d'induction d'apoptose (phénomène 'bystander'). Les caractéristiques mitochondriales observées à partir de la 16<sup>e</sup> heure post-infection, sont typiques des phases précoces de l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. L'apparition du cytochrome c dans le cytoplasme des cellules infectées entraîne la formation de l'apoptosome et le recrutement de la Caspase 9 effectrice. La voie de la Caspase 8 extrinsèque est plus tardive, détectée vers la 24/32<sup>e</sup> heure. De façon intéressante, la Caspase 8 est détectée aussi bien dans les cellules CHIKV+ que CHIKV-. Ces résultats suggèrent que la voie extrinsèque de l'apoptose est ultérieure à la voie intrinsèque précoce, et que le mécanisme d'apoptose par effet 'bystander' des cellules CHIKV- implique la voie extrinsèque (caspase 8 dépendante).

## 2 – Caractérisation de l'apoptose sur les fibroblastes primaires :

Nous avons réalisé les mêmes tests sur des cultures primaires de fibroblastes humains issus de ligaments et de synoviales. La majorité des fibroblastes CD90+ sont infectés par CHIKV ;

l'immunofluorescence est localisée essentiellement au niveau du réticulum endoplasmique et dans les corps apoptotiques après bourgeonnement des cellules infectées. Les fibroblastes infectés montrent rapidement un effet cytopathique et rentrent en apoptose (cytochrome c + et Bax+ dès la 16<sup>e</sup> heure, et PARP clivé à partir de la 24<sup>e</sup> heure). De façon singulière, une sous-population de fibroblastes a été identifiée, étant doublement marquée CD90+ CD141+ (thrombomoduline) et s'avère complètement réfractaire à l'infection CHIKV.

### 3 – Inhibition de l'apoptose :

L'inhibition de l'apoptose a été réalisée à différents niveaux par l'utilisation :

d'inhibiteurs de caspase : z-VAD, DEVD-cho

d'inhibiteurs de bourgeonnement de corps apoptotiques (blebbistéine, génistéine, Y-27632) et de la macropinocytose : cytochalasine B, Annexine V.

L'inhibition de la formation des corps apoptotiques et de la macropinocytose affecte l'infection par CHIKV des cellules Hela voisines. En effet, les résultats montrent une diminution du nombre de cellules apoptotiques, mais aussi une diminution du nombre de cellules infectées. Ceci est un argument en faveur d'un certain contrôle de l'apoptose par le virus qui l'utilise afin de disséminer dans les autres cellules. La capacité du CHIKV à passer d'une cellule à une autre tout en étant 'relativement protégé' avait été observée depuis les années 1970 par Hahon *et al* (Hahon and Zimmerman 1970). En effet, ce dernier avait décrit que l'infection des cellules BHK21 se faisait en micro-foyer cellulaire et sans que ce phénomène soit inhibé par des anticorps anti-CHIKV neutralisants.

#### 4 – Infection des macrophages par les corps apoptotiques :

Les tests ont été réalisés sur des macrophages dérivés des lignées cellulaires humaines MM6 et THP-1 traitées à la PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) ainsi que sur les macrophages primaires issus de donneurs volontaires. Le taux de macrophages infectés augmente de façon significative lorsqu'ils sont exposés au virus contenus dans les corps apoptotiques (surnageant de culture non filtré) comparé au virus seul (surnageant de culture filtré). La phagocytose des corps apoptotiques (Casp3+, CHIKV+) favorise donc l'infection des macrophages, et ce de façon non inflammatoire (absence d'expression de TNF- $\alpha$ , d'IL1- $\beta$ ) 24h post-infection. Cette infection est bloquée par le pré-traitement des cellules par l'Annexine V (qui bloque les phosphatidylsérines exposés par les corps apoptotiques et impliqués dans la phagocytose) ou la cytochalasine B (inhibiteur de la mobilité du cytosquelette et donc de la macropinocytose).

Nous avons dans ce travail, décrit pour la première fois précisément les voies d'activation de l'apoptose et montré que les deux voies intrinsèque mitochondriale et extrinsèque Caspase 8-dépendante sont impliquées. Nous avons montré que le virus exerce aussi un effet cytopathique par une voie bystander. Il nous reste à identifier les ligands de mort (par exemple FasL, TRAIL) qui activeraient le récepteur de mort FADD couplé à la caspase 8. Nous avons aussi montré que le virus CHIKV détourne et contrôle l'apoptose pour infecter les autres cellules, en particulier les macrophages. Ces macrophages ne sont pas ou très peu infectés par le virus seul, mais ils s'infectent en phagocytant les corps apoptotiques dans un contexte non inflammatoire (Savill, Dransfield et al. 2002).

Ma participation dans ce travail :

recueil des consentements pour les prélèvements per-opératoires (ligaments, synoviales) de sujets non-infectés, confirmation de leur état non immun vis-à-vis du CHIKV.

Isolement et culture des fibroblastes humains

Infection des cellules

Réalisation de RT-PCR semi-quantitative

## Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses

Pascale Krejbich-Trotot,<sup>\*†,1</sup> Melanie Denizot,<sup>\*‡</sup> Jean-Jacques Hoarau,<sup>\*‡</sup> Marie-Christine Jaffar-Bandjee,<sup>\*†,‡</sup> Trina Das,<sup>\*‡</sup> and Philippe Gasque<sup>\*†,1</sup>

<sup>\*</sup>Groupe de Recherche Immunopathologies et Maladies Infectieuses (GRI), Infection and Immunopathology Research Grouping, and <sup>†</sup>Biology, Microbiology, Virology, and Biochemistry Units, Centre Hospitalier Régional (CHR) North Felix Guyon, St. Denis, Reunion Island; and

<sup>‡</sup>University of La Reunion, Cyclotron Réunion Océan Indien (CYROI), St. Denis, Reunion Island

**ABSTRACT** Chikungunya virus (CHIKV) surprised medical workers by a massive outbreak in the Indian Ocean region, reaching Europe in 2007, with exceptional pathologies in infants and elderly patients. Although CHIKV was recently shown to persist in myoblasts, monocytes, and macrophages, we argued that robust antiviral mechanisms, including apoptosis, are essential to ward off the virus. Herein, we tested the capacity of CHIKV to mobilize the apoptotic machinery in HeLa cells as well as primary fibroblasts, making use of several inhibitors of caspases, cell blebbing, and engulfment of the apoptotic blebs by neighboring cells. CHIKV triggered apoptosis through intrinsic and extrinsic pathways. Bystander apoptosis was also evidenced in neighboring cells in a caspase-8-dependent manner. Remarkably, by hiding in apoptotic blebs, CHIKV was able to infect neighboring cells. In HeLa cells, these events were inhibited specifically by zVAD-fmk and DEVD-cho (caspase inhibitors), blebbistatin, Y-27632 (ROCK inhibitor), and genistein, annexin V, and cytochalasin B (inhibitors of blebbing and engulfment). These CHIKV-apoptotic blebs were also capable of infecting macrophages (primary cultures, MM6- and THP1-PMA differentiated cells) otherwise refractory to infection by CHIKV alone. Remarkably, viral replication in macrophages did not yield a proinflammatory response. We describe a novel infectious mechanism by which CHIKV invades host cells and escapes the host response.—Krebich-Trotot, P., Denizot, M., Hoarau, J.-J., Jaffar-Bandjee, M.-C., Das, T., Gasque, P. Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses. *FASEB J.* 25, 000–000 (2011). [www.fasebj.org](http://www.fasebj.org)

*Key Words:* alphavirus · blebs · macrophages · innate immunity · caspases · persistence

CELL DEATH INDUCED BY VIRUSES can exhibit multiple faces, with necrotic, autophagic, or apoptotic features, and this mechanism of autoelimination is a crucial element of the immune innate host response (1, 2). Thus, various signals can underlie apoptosis, including, besides viral intrusion, death receptor signaling, growth factor withdrawal, and different types of cellular or nuclear

injury. Each of these signals converges to a “point of no return” where the cell is subjected to membrane modification, cellular constituent cleavage, and DNA fragmentation, due to a cascade of activation of the caspase family of proteases. Final products are then released as membrane-delimited apoptotic corpses or bodies and small blebs that are further engulfed and eliminated by neighboring cells and professional phagocytes in a noninflammatory manner (3). Two main and well-described pathways are involved in apoptosis. One is the intrinsic pathway, in which mitochondrial events precede and provoke the activation of the initiating caspase-9. The other is called the extrinsic pathway, because activation of the initiating caspase-8 or -10 is due to signal transduction through death receptor signaling. Both lead to the activation of executioner caspases (caspase-3, -6, and -7; refs. 4, 5). A caspase-8- or -10-dependent pathway could also be activated by innate immune receptors, such as TNFR, FAS, or RIG (retinoic acid inducible gene I) signaling through the IPS1/TRADD/RIP/FADD supercomplex, but the exact molecular mechanisms remain largely ill-characterized (6, 7).

Apoptosis following viral infection is a classic first-line defense mechanism, since cell autodestruction appears to be one of the best ways to limit virus production and spreading (8). Most viruses deal with this defensive reaction and have evolved strategies to evade or delay apoptosis (9, 10). Control of the apoptotic process by the viruses is key, either to establish a permanent infection when they are able to block apoptosis, or to facilitate their dissemination and prevent inflammatory and immune response when they are able to control and activate the late phase of apoptosis (8, 11).

Chikungunya virus (CHIKV), an alphavirus of the *Togaviridae* family transmitted to humans through arthropod bites (mosquitoes of the *Aedes* genus), was recently responsible for a massive reemerging outbreak

<sup>1</sup> Correspondence: GRI/IRG Immunopathology and Infection Research Grouping, University of La Réunion, CYROI, 2 rue Maxime Rivière, 97491, Ste Clotilde, Reunion. E-mail: P.G., [gasque@univ-reunion.fr](mailto:gasque@univ-reunion.fr); P.K.T., [pascale.krebich-trotot@chr-reunion.fr](mailto:pascale.krebich-trotot@chr-reunion.fr)

doi: 10.1096/fj.10-164178

in a large tropical area (East Africa and Indian Ocean in 2006; India, Thailand, and Indonesia in 2005–2007), along with a limited epidemic in Italy in 2007 (12, 13).

The severe forms of the disease observed in Reunion Island during the outbreak, such as encephalopathy and arthritis, highly warranted studies to gain a better understanding of the physiopathology of this little-known virus. CHIKV belongs to a family of human pathogens otherwise well described, including O’Nyong-Nyong virus (ONNV), the Australian Ross River virus (RRV), and American encephalitic alphaviruses (12, 14). Interestingly, several reports have highlighted the capacity of alphaviruses to cause apoptosis, which may be associated with pathogenesis (15–21). Hence, virus-induced cell death may be a crucial event in the manifestations observed during the acute phase of CHIKV disease. *In vivo*, CHIKV mainly targets the connective tissue (fibroblast cells), but infection has also been reported in the liver, muscle, and brain in humans and mice (14, 22–25). In the macaque model, it has recently been shown that CHIKV hides in macrophages, but to what extent this a contributing factor of chronic inflammation remains to be ascertained (26, 27). *In vitro*, CHIKV is able to infect a wide range of cells and cell lines, including blood monocytes, fibroblasts, and HeLa cells (22, 28–30).

In the present work, we used a HeLa cell line and primary cultures of human fibroblasts to ascertain the apoptosis mechanisms mobilized in response to CHIKV infection. Mitochondrial events, attesting a commitment in the early steps of apoptosis, were characterized by the Bax and cytochrome *c* immunolocalizations. Cytochrome *c* which becomes cytosolic, associates within the apoptosome and therefore initiates apoptosis *via* the upstream caspase-9. This cascade can be alternately activated through the upstream caspase-8 in response to an extrinsic cell death receptor pathway. The latest steps of the death program, meaning the executive phase of apoptosis, were analyzed by the detection of a cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), a well known target of the executive caspases.

Herein, we highlight a novel mechanism used by CHIKV to infect neighboring cells. Thus, the role of apoptotic blebs containing CHIKV to spread from cell to cell was established using HeLa cells and also primary cultures of human monocytes and PMA-differentiated THP1 and MM6 cell lines that were shown to be refractory to infection by CHIKV alone. Several inhibitors of caspases, apoptotic blebbing, and bleb endocytosis/micropinocytosis were tested and could interfere with CHIKV infection. This “Trojan horse” scenario may take place in tissue, allowing CHIKV to escape the immune response and cause chronic pathologies, such as arthritis.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents and antibodies

Caspase inhibitors z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone (zVAD-fmk; catalog no. G7232) and Ac-DEVD-cho (G5961) were

from Promega (Charbonnières les Bains, France). Pharmacological inhibitors of blebbing (blebbistatin, genistein Y-27632) and engulfment (cytochalasin B and annexin V) were from Sigma (Sigma Diagnostics, St. Quentin Fallavier, France). We used a human antiserum (FDO, in house) and 2 mouse monoclonal lines [clones C6 and 4F, a kind gift from Biomérieux, Marcy l’Etoile, France, and IMTSSA (Armed Forces Institute of Tropical Medicine, Pharo), Marseille, France] to detect CHIKV. The other antibodies were mouse anti-human Bax clone 2D2 (146996; eBiosciences; Clinisciences, Montrouge, France), monoclonal mouse anti-cytochrome *c* clone 6H2.B4 (G742A; Promega), polyclonal rabbit anti-cleaved caspase-3 (3015; BioVision; Clinisciences), polyclonal rabbit anti-cleaved PARP (3140; BioVision; G7381, Promega), monoclonal mouse anti-PARP clone C-2-10 (3001; BioVision), monoclonal rabbit anti-cleaved caspase-8 (3158; BioVision), polyclonal rabbit anti-cleaved caspase-9 (3149; BioVision), rabbit anti-RIG-I (4520; Cell Signaling, Ozyme, St. Quentin-Yvelines, France) and rabbit anti-TLR7 (IMG581A; Imgenex; Clinisciences), and polyclonal rabbit anti-CD14 (sc-9150; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Antibodies to human CD18 and CD11b were kindly provided by Prof. Václav Hořejší (Institute of Molecular Genetics, Prague, Czech Republic). Secondary antibodies were goat anti-rabbit or anti-mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase (HRP)-conjugate (172-1019 and 170-1011; Bio-Rad) and goat anti-human IgG (Fc specific) HRP-conjugate (A-0170, Sigma). Goat anti-mouse Alexa Fluor-488 or -594, or goat anti-rabbit Alexa Fluor-488 or -594 were from Invitrogen Molecular Probes (Gergy Pontoise, France). Rhodamine- or FITC-conjugated goat or donkey anti-rabbit or anti-mouse Ig were from Jackson ImmunoResearch (Immunotech, Marseille, France). Goat anti-human IgG Fab-specific FITC-conjugate was from Sigma.

### Cells and culture conditions

All cell lines (human HeLa ovarian carcinoma cells, MM6 and THP1 macrophages, African green monkey Vero cells) and primary cultures of human fibroblasts and macrophages were maintained at 37°C in humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in medium supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum together with penicillin (100 µg/ml), streptomycin (100 U/ml), sodium pyruvate (1 mM), L-glutamine (5 mM), and fungizone (0.5 µg/ml), available from Dutscher (Brumath, France). Collection of surgical biopsy samples was conducted with the informed consent of the donors and with local ethical approval (CHR Felix Guyon, St. Denis, Reunion). Serum sample of patient 4 was obtained as part of a cohort study approved by CHR Felix Guyon. Primary macrophages were obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from fresh blood samples by Ficoll-Histopaque (Sigma) density-gradient centrifugation. Nonadherent PBMCs were removed by washing with sterile Mg<sup>2+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-free PBS after 2 h adherence at 37°C in tissue culture plates. Human macrophages (>95% stained for CD18 and CD14), MM6 and THP1, were cultured for 3 d in medium supplemented with 10 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) to induce their differentiation toward a phagocytic phenotype (as confirmed by elevated phagocytosis of fluorescent latex beads and high expression of CD11b, data not shown). Fibroblasts were prepared from collagenase I-dissociated human synovial or ligament tissues and cultured in DMEM. Flasks were coated with poly-L-lysine to favor cell adhesion. Fibroblasts were identified as adherent CD90 (Thy-1)<sup>+</sup> and CD14<sup>-</sup> cells.

### CHIKV titration and ultraviolet (UV) inactivation

We used a clinical isolate (clone CHIKV 4) amplified from a patient’s serum sample (isolated during the 2006 epidemic)

by a single passage on Vero cells (31). One-step RT-PCR was used to amplify the E1 gene. The amplicon was sequenced, and the nucleotide sequence of this clone was found to be 100% identical (between positions 10387–10575, EU-037962.1) to that of the Reunion strain (E1-A226V; ref. 32). After complete cell death, the culture medium was centrifuged (2000 rpm for 10 min to remove cell debris), filtered (0.2 µm), portioned into aliquots, and stored at -80°C until used. The viral titer of the CHIKV suspension was established by serial dilutions on Vero cells [to evaluate the tissue culture infective dose median (TCID<sub>50</sub>) per milliliter] and by quantitative RT-PCR (qRT-PCR).

For the TCID<sub>50</sub> assays, serially diluted (10<sup>-1</sup> to 10<sup>-7</sup>) samples of the virus were added to confluent Vero cells cultured in 96-well plates. Cytopathic effect at 24 and 48 h was evaluated in each well using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Quantification of the viral RNA of the infected cell culture supernatants was performed by real-time PCR with an LC480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) after RNA extraction with MagNA Pure LC nucleic acid isolation kit (Roche Diagnostics) and standardization using a plasmid containing the E1 insert (kindly provided by Prof. Xavier de Lamballerie, Unité des Virus Emergents, Marseille, France). UV inactivation of the virus was performed essentially as described previously (33) by exposure of the viral suspension to UV light (2 J over 10 min at room temperature) from a UV transilluminator (254 nm; Uvitec CLE508G; Dutscher).

#### CHIKV infection and test of inhibitors of apoptosis, blebbing, and engulfment

Adherent cells (primary fibroblasts, HeLa; primary macrophages, THP1- and MM6-PMA treated) plated at ~25% confluence were exposed to the virus at the indicated multiplicity of infection (MOI; defined as the amount of CHIKV infectious units, calculated as TCID<sub>50</sub> per target cell) for 2–4 h at 37°C, washed, and cultivated for various periods (8, 16, 24, 32, 40 and 48 h) for further analysis, with the medium alone (control) or with biochemical inhibitors.

The infectivity and viral replication in HeLa cells were analyzed in response to the treatment with different inhibitors at 24 and 48 h postinfection (MOI 1). All inhibitors were selected and used as described previously (34, 35). Caspase inhibitors z-VAD-fmk or Ac-DEVD-cho were both used at 10 and 100 µM. Blebbistatin (50 and 100 nM), Y-27632 (10 µM), genistein (50 and 100 nM) and cytochalasin B (5 and 10 ng/ml) were used to control blebbing of the infected cell or endocytosis by the surrounding cells (34, 36). Annexin V (10 µg/ml) was used to interfere specifically with the apoptotic uptake process and was added to the cell culture 4 h postinoculation with CHIKV (MOI 1) (37, 38).

For macrophage infection experiments, inoculation was done using the viral isolate (clone CHIKV 4) or supernatants collected from HeLa cultures at 72 h after CHIKV infection (MOI 1). In some experiments, HeLa cells were stained with CFSE (green staining of cell membrane; Invitrogen) before preparing the inoculums. CHIKV inoculums derived from HeLa cells were used either crude (nonfiltered) or filtered at 0.2 µm. In some experiments, viral inoculums were preincubated for 15 min with annexin V (10 µg/ml) before loading onto the cells. Nonfiltered inoculum was also used on macrophages incubated in the presence of cytochalasin B (10 ng/ml). At 2 to 4 h after inoculation, cells were washed and further cultivated for various periods in medium with or without inhibitors. None of the inhibitors used at the stated concentrations significantly modified the cell viability (MTT assay) from 2 to 48 h when compared to untreated cells. Viability was 93 ± 2% for untreated cells vs. 91 ± 4% for

inhibitor-treated cells ( $P > 0.05$ ). Of note, cytochalasin B was toxic at the dose of 10 ng/ml after 48 h incubation (82 ± 5% viable cells), and only the 24 h time point will be considered in our analysis.

#### Cell immunofluorescence staining

Adherent cells were grown and infected on glass coverslips, fixed and permeabilized at different times postinfection by immersion in frozen ethanol for 5 min, and conserved at -20°C. Coverslips were incubated in primary antibodies (1:200) in 1% PBS-BSA and then with Alexa488, Alexa594, or FITC-conjugated anti-mouse or anti-human Ig (1:1000). Nucleus morphology was revealed by DAPI staining (final concentration 100 ng/ml). Coverslips were mounted in Vectashield (Vector Labs; Clinisciences), and fluorescence was observed using a Nikon Eclipse E2000-U microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Images were obtained using the Nikon Digital sight PS-U1 camera system and the imaging software NIS-Element AR (Nikon).

#### Western blotting

Cells were harvested with a scraper and resuspended in lysis buffer (1× PBS, 1% Triton X-100, and 1 mM EDTA with a cocktail of protease inhibitors, all at 1 µg/ml: PMSF, pepstatin A, leupeptin, and aprotinin). Protein extracts were added with 1 vol of loading buffer (0.1 M Tris, 10% glycerol, and 2% SDS) according to Laemmli's protocol. About 50 µg of each sample was loaded onto 4–12% precast NuPAGE gels (Invitrogen). After electrophoretic migration, proteins were electrotransferred onto a nitrocellulose membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were incubated with primary antibodies followed by HRP-conjugated secondary antibody and revealed with the Vector NovaRed detection kit (Vector Labs).

#### RT-PCR and real-time qRT-PCR

Total RNA was extracted directly from various cells or cell culture supernatant using Trizol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). For RT-PCR, a 1-step RT-PCR was performed in a final volume of 20 µl containing 0.5 µg of extracted total RNA per reaction, 10 µl of 2× ThermoScript Reaction Mix buffer (Invitrogen), 10 µM of each primer, 8 U of RNase Inhibitor (Rnasin; lot no. 552302; Promega), 0.5 U of uracil-DNA-glycosylase (UDG; lot no. 12958220; Roche Diagnostics) and 0.8 µl of ThermoScript plus/Platinum *Taq* Enzyme Mix (lot no. 1321725; Invitrogen). RT-PCRs were carried out in Mastercycler gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) with the following steps: RT at 50°C for 30 min, PCR for initial denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, amplification at 72°C for 1.5 min. Final extension was carried out at 72°C for 4 min, and samples were then kept at 4°C. The size of the RT-PCR product was checked on 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized with ethidium bromide. Image-Quant TL v2005 software (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) was used to calculate the size and to semiquantify the amount of each PCR product. GAPDH was used as the housekeeping gene, and all data were expressed compared to GAPDH signal.

#### Primers used for RT-PCR

The following primers were used:

Hu GAPDH\_F, 5'-GAACGGGAAGCTTGTCATCA-3' (position 291–310), and Hu GAPDH\_R, 5'-TGACCTTGCCCA-

CAGCCTTG-3' (position 744–763); sequence reference NM\_002046; amplicon 473 bp.

CHIK E1\_F, 5'-AAGCTYCGCGTCCTTTACCAAG-3' (position 10387-1040), and CHIK E1\_R, 5'-CCAAATTGTCCYGTCTTCCT-3' (position 10595–10575); sequence reference EU-037962.1; amplicon 209 bp.

#### Statistics

All results are expressed as means  $\pm$  SD and as percentages of 3 independent experiments, each using triplicate culture plates. Comparisons between different treatment regimes have been analyzed by the Mann-Whitney exact test (GraphPad, San Diego, CA, USA). Values of  $P \leq 0.05$  were considered statistically significant. Degrees of significance are indicated in the figure captions.

## RESULTS

### HeLa cells are susceptible to infection by CHIKV

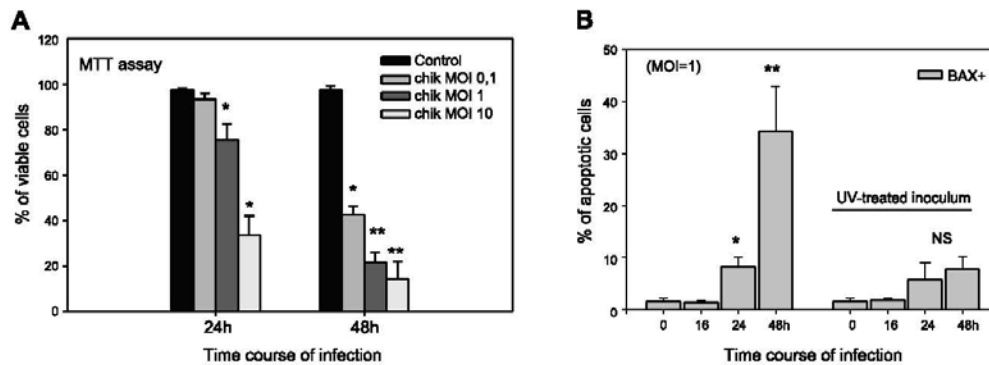
To evaluate their susceptibility to the virus and their ability to produce viral progeny, HeLa cells were incubated with different MOIs of the clinical CHIKV isolate clone 4, isolated in our safety level laboratory during the 2006 Reunion Island epidemic. This inoculum was obtained after a single passage on VERO cells and displayed strong cytopathic activity (not shown). At MOI 1, CHIKV was detected on few HeLa cells (2%) as early as 8 h after infection, and almost 90% of the cells were CHIKV<sup>+</sup> (E1 protein) 48 h postinfection (not shown). The cytopathic activity of CHIKV is dose dependent, as depicted in Fig. 1A, using the MTT assay to assess the level of cell viability. This effect was particularly prominent at high MOI at 24 h and also at 48 h, with a significant effect even at low MOI (MOI 0.1,  $P < 0.05$ ). The loss of cell viability was associated with typical apoptotic features, with the observation that  $33 \pm 12\%$  of HeLa cells were strongly stained for mitochondrial Bax when exposed to CHIKV (MOI 1,

48 h). By subjecting the viral inoculum to UV inactivation, we demonstrated that viral gene expression/replication was essential for causing apoptosis (Fig. 1B).

### CHIKV infection triggers apoptosis in HeLa cells

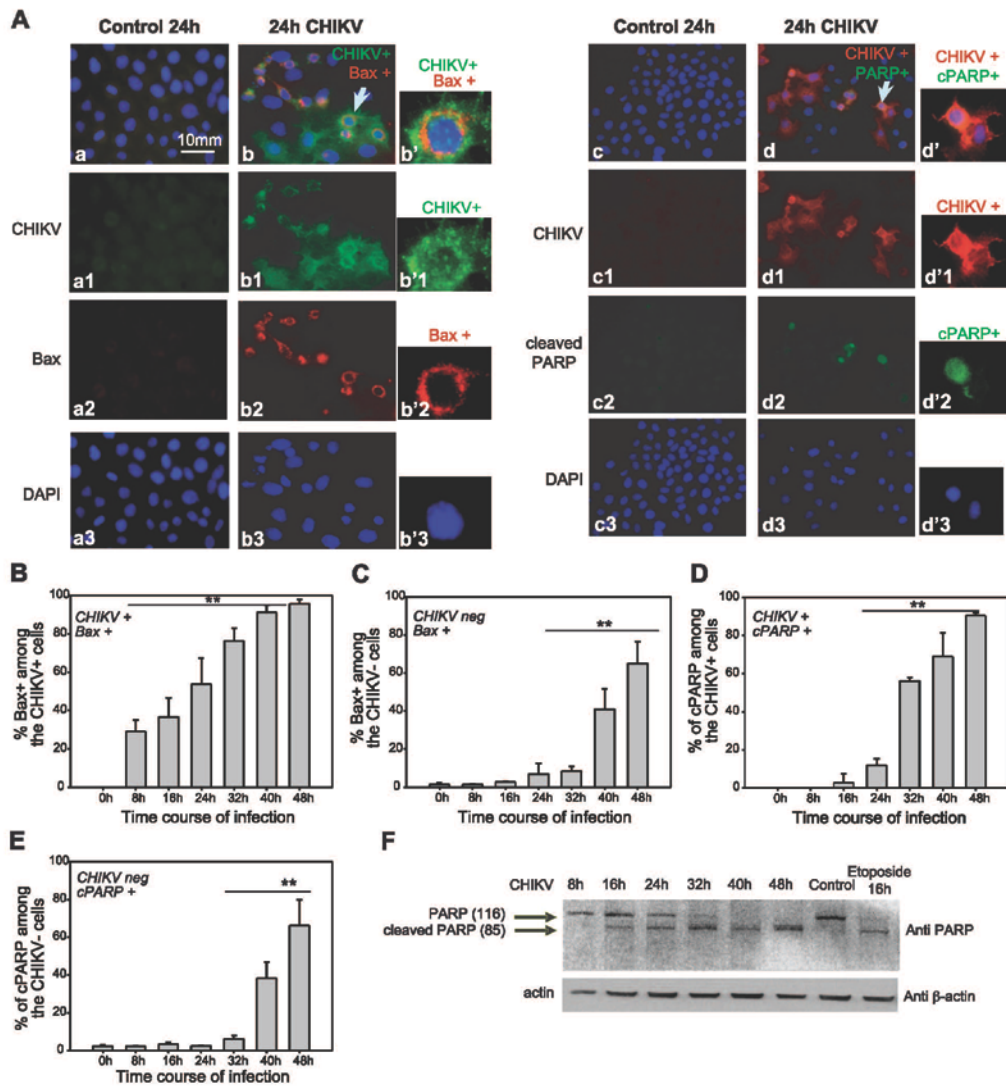
The cytopathic activity of CHIKV was further characterized at the cellular level by immunocytochemistry to screen for other surrogate markers of apoptosis. CHIKV was detected by immunofluorescence using either a human polyclonal antibody or a monoclonal antibody directed against the E1 CHIKV envelope protein. The staining pattern and fluorescence intensity were identical when we used different monoclonal anti-E1 and anti-capsid antibodies (data not shown). Morphological and cytological changes indicative of cell death were examined in CHIKV<sup>+</sup> and CHIKV<sup>-</sup> cells.

To establish the molecular mechanisms of CHIKV-induced cell death, mitochondrial events attesting a commitment in apoptosis were characterized by the Bax and cytochrome *c* immunolocalizations. The latest steps of the death program, meaning the executive phase of apoptosis, were analyzed by the detection of the cleaved caspase-3 and cleaved PARP by specific polyclonal antibodies. Among the belated signs of apoptosis, chromatin condensation (displayed by nucleus DAPI staining) and cell shrinkage with rounding up were taken into account to comprehensively define a dying cell by apoptosis. The etoposide treatment was used here as a positive control of apoptosis (not shown). In viable healthy cells at 24 h, Bax and cleaved PARP and active caspase-3 were not detectable (Fig. 2A and data not shown). When HeLa cells were exposed to CHIKV, we observed, at 24 h postinfection (Fig. 2A), a mitochondrial relocation of Bax paired with the presence of CHIKV in the cell (Fig. 2Ab, arrow). Cleaved PARP could be detected in some but not all CHIKV<sup>+</sup> cells at 24 h (Fig. 2Ad, d').



**Figure 1.** CHIKV-induced cytopathic activity in HeLa cells is characterized by apoptotic hallmarks. *A*) Cytopathic activity of CHIKV was established at different MOI (0.1–10) at 24 and 48 h postinfection by measuring the level of viable cells (MTT assay) after 24 and 48 h. *B*) Number of early apoptotic cells was quantified by immunostaining for Bax. We also compared untreated CHIKV inoculums vs. UV-treated inoculums to inactivate the virus ( $n=3$ ).





**Figure 2.** Characterization of apoptosis pathways during CHIKV infection. *A*) HeLa cells were infected with CHIKV (MOI 1; *b, d*) or mock-infected (control; *a, c*) and analyzed for markers of apoptosis at 24 h. *a–b3'*) Double-immunofluorescence staining for CHIKV E1 (green fluorescence; *a1, b1*), Bax (red fluorescence; *a2, b2*), and DAPI (nuclei; blue fluorescence; *a3, b3*), view  $\times 200$ ; with magnified details of panels *b–b3* (*b'–b3'*, respectively;  $\times 600$ ). *c–d3'*) Immunostainings for CHIKV E1 (red fluorescence; *c1, d1*), cleaved PARP (green fluorescence; *c2, d2*), and DAPI (blue fluorescence; *c3, d3*), view  $\times 200$ ; with magnified details of panels *d–d3* (*d'–d3'*, respectively;  $\times 600$ ). *B–E*) Percentage of cells with either a mitochondrial-relocalized Bax (Bax<sup>+</sup>; *B, C*) or cleaved PARP (cPARP<sup>+</sup>; *D, E*) among the CHIKV-infected cells (CHIKV<sup>+</sup>; *B, D*) or noninfected cells (CHIKV<sup>neg</sup>; *C, E*) calculated from experience in *A* at different time points (0 h, control mock-infected; and 8, 16, 24, 32, 40 and 48 h postinoculation). Results from 3 individual experiments and 3 different fields (total > 600 cells) were counted for each time point. *F*) PARP immunoblot during the CHIKV time course of infection. Protein extracts from control HeLa cell cultures (48 h) or cultures infected with CHIKV (MOI 1, over the time course) were separated by SDS-PAGE electrophoresis and analyzed by Western blot using the mouse monoclonal anti-PARP (clone C-2-10) to detect the entire form (116 kDa) and the apoptosis-related cleavage fragment (85 kDa) of PARP. Etoposide treatment of HeLa cells for 16 h was used as an internal apoptotic control. Immunodetection of  $\beta$ -actin controlled for protein loading.

For each time point, the percentage of cells presenting a mitochondrial Bax (Bax<sup>+</sup>) was determined among the CHIKV-infected cells (CHIKV<sup>+</sup>; Fig. 2B) and among the noninfected cells (CHIKV<sup>-</sup>; Fig. 2C). Cells presenting a cleaved PARP (cPARP) were also counted among the CHIKV<sup>+</sup> (Fig. 2D) and CHIKV<sup>-</sup> cells (Fig. 2E). At 24 h postinfection, almost 20% of the cells were CHIKV<sup>+</sup>; half of these cells had a mitochondrial relocalized Bax, and 12% presented a cleaved PARP. At 48 h postinfection, almost 90% of the cells that still adhered on coverslips were infected, and <5% of them were not presenting apoptosis features. These immunocytochemistry results were confirmed by the immunodetection of PARP processing by Western blotting (Fig. 2F). We detected cleavage of PARP as soon as 16 h postinfection and foremost at 24 h postinfection. The entire form of PARP was cleaved after 40 h, as in the etoposide control.

Remarkably, the percentage of dying apoptotic cells among the cells that were not stained for CHIKV antigenic materials increased with time, from 2% at 16 h to 65% at 48 h (Fig. 2E). The percentage even dramatically shifted from 8 to 40% between 32 and 40 h postinfection. This suggests that cells neighboring infected cells were receptive to an apoptosis induction signal.

#### Apoptosis engagement during CHIKV infection involves both intrinsic and extrinsic pathways

The mitochondrial hallmarks observed from 16 h postinfection in the CHIKV-infected cells are typical of the early steps of an intrinsic activated pathway of apoptosis. The cytochrome *c* outing allows the apoptosome formation and the caspase-9 recruitment. Early active caspase-9 in CHIKV-infected cells was confirmed by immunostaining at 16 h (Fig. 3A). Interestingly, we found that caspase-8, the initiating caspase of the extrinsic pathway, was also processed in response to CHIKV infection (Fig. 3B, C). The active caspase-8 was not detected at 16 h, but was present in CHIKV<sup>+</sup> as well as CHIKV<sup>-</sup> cells (Fig. 3B, white arrows). This would support the idea that the extrinsic pathway of apoptosis is subsequent to the early intrinsic pathway and that the bystander apoptosis mechanism in CHIKV<sup>-</sup> cells involves a caspase-8-associated pathway. Moreover, the delay observed between the earliest mitochondrial events (8 h) and caspase-8 processing (24 or 32 h) is not in favor of an activation of the caspase-8/tBid pathway of permeabilization of the mitochondria as the first step in the initiation of the apoptotic machinery.

#### Apoptosis hallmarks are confirmed in CHIKV-infected human fibroblasts

Fibroblasts are the main targets of CHIKV in disease settings (23), and we were wondering whether CHIKV could also have cytopathic and proapoptotic activities on cells of the connective and synovial tissues. The majority of CD90<sup>+</sup> fibroblasts (not shown) were infected by CHIKV even at MOI 0.1, but some fibroblasts identified as double CD90<sup>+</sup> CD141<sup>+</sup> cells were highly refractory to CHIKV infection and replication (Fig. 4A). The CHIKV

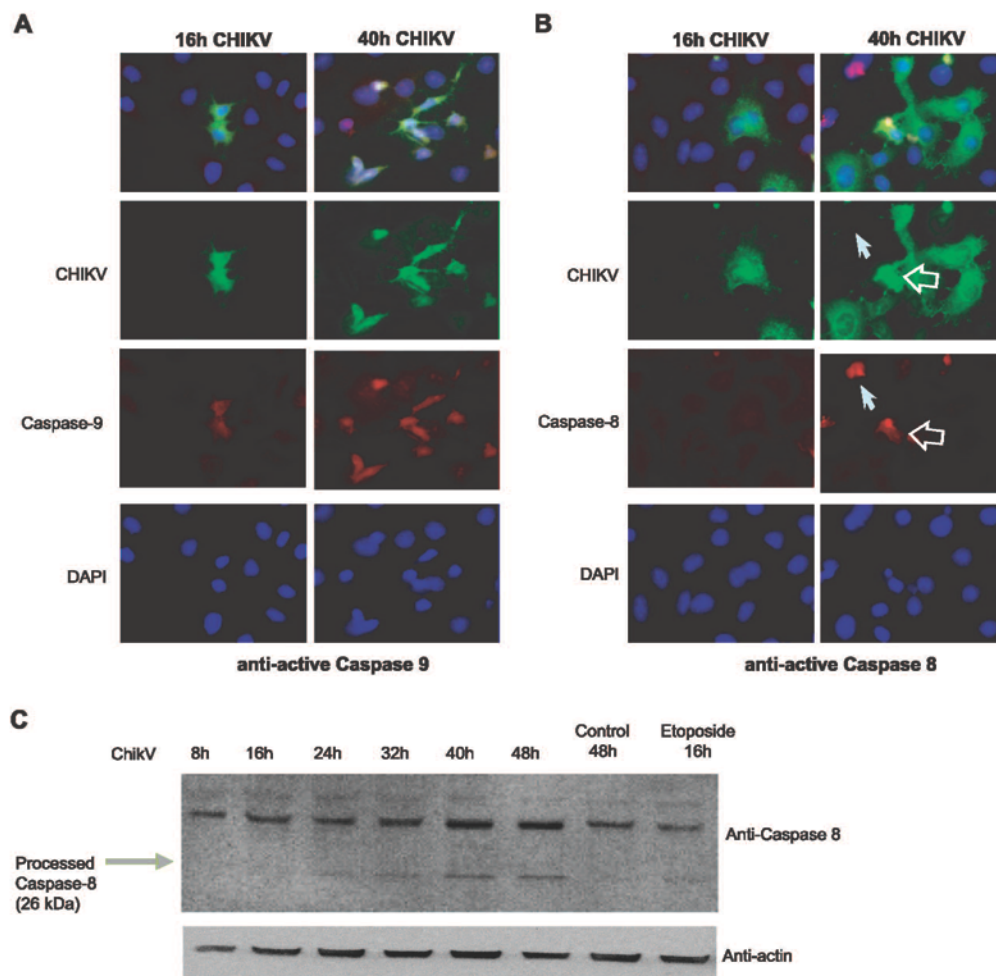
immunofluorescence staining was prominent in either the endoplasmic reticulum (Fig. 4A) or in bleb-like structures budding from infected cells (Fig. 4A, white arrow). In addition to the profound cytopathic activity depicted in Fig. 4B, we found that CHIKV-infected fibroblasts were rapidly undergoing apoptosis (Fig. 4C). CHIKV<sup>+</sup> cells were Bax<sup>+</sup>, relocalized their cytochrome *c* to the cytoplasm, and presented strong cleaved-PARP staining (particularly at 40 h). Moreover, and as observed for HeLa cells, we found CHIKV<sup>-</sup> cells stained for cleaved PARP (Fig. 4E). Quantitative analysis indicated that >80% of the CHIKV<sup>-</sup> cells were cPARP<sup>+</sup> at 48h. We were not able to perform triple staining to ascertain whether the CHIKV<sup>-</sup> cPARP<sup>+</sup> cells were expressing CD141 (also known as thrombomodulin, a marker of a subpopulation of fibroblasts).

#### Inhibition of the apoptotic process affects CHIKV infection

The z-VAD-fmk inhibitor, targeting a large spectrum of caspases, was added during the time course of infection. Figure 5A shows CHIKV E1 staining of HeLa cells at 24 and 40 h after infection in the presence or not of the inhibitor. Remarkably, and counterintuitively, we observed that the number of CHIKV<sup>+</sup> cells was dramatically reduced on the z-VAD-fmk treatment, which will argue against a protective role of programmed cell death to ward off CHIKV infection. The percentage of CHIKV<sup>+</sup> cells significantly dropped to <20% at 40 h in the presence of the inhibitor ( $P < 0.001$ ) when compared to control ( $76 \pm 13\%$ ; Fig. 5B). Moreover, the percentage of CHIKV<sup>-</sup> cells engaged in an apoptotic process (Bax<sup>+</sup>) was similarly affected in the presence of the caspase inhibitor (Fig. 5C). The dramatic effect of the z-VAD on the production of infectious viral particles was confirmed by viral titration of the supernatants and expressed as TCID<sub>50</sub> per milliliter (Fig. 5D). This effect was also confirmed by QRT-PCR quantification of viral RNAs released in the supernatants (Fig. 5E). The same experiment was performed with DEVD-cho, a specific executive caspase inhibitor and with identical inhibitory effects on CHIKV infection and replication (data not shown).

#### Inhibitors of apoptotic blebbing or of the engulfment of apoptotic remnants affect the dissemination of CHIKV to neighboring cells

In light of the aforementioned findings, we hypothesized that CHIKV-induced programmed cell death contributes to perpetuate virus spreading through the formation of apoptotic blebs containing CHIKV engulfed by neighboring cells. This is a mechanism that was first reported for Sindbis alphavirus in 1995 (39) and which was rediscovered and comprehensively studied by Mercer and Helenius (34) in 2008 for vaccinia virus. In the former study, it was shown that nucleocapsids were observed within the apoptotic blebs budding from infected HeLa cells (39). Several inhibitors inter-

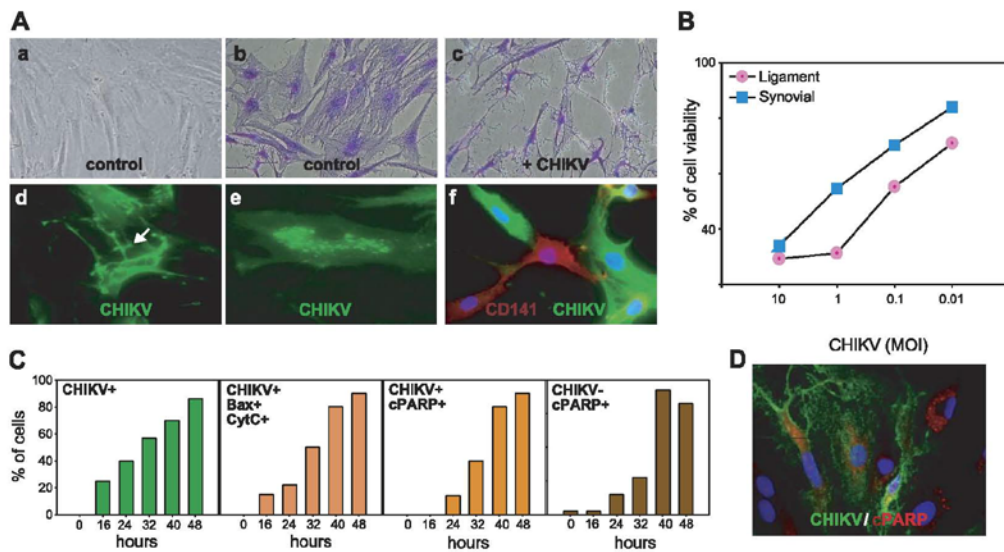


**Figure 3.** CHIKV-induced apoptosis is mediated through both intrinsic caspase-9 and caspase-8 extrinsic pathways. HeLa cells were either mock infected (control, 48 h), infected with CHIKV (MOI 1), or treated with etoposide. *A, B*) At 16 and 40 h postinfection, double immunofluorescence staining was performed for E1 (green, mouse antibody) and either active cleaved-caspase-9 (*A*) or active cleaved-caspase-8 (*B*) detected by rabbit polyclonal specific antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Of note, we detected HeLa cells stained for cleaved-caspase-8 (40 h time point, solid white arrow) but which were not stained for CHIKV. Other caspase-8<sup>+</sup> cells were stained for CHIKV (open white arrow). *C*) Late cleavage of caspase-8 during the course of CHIKV infection. Caspase-8 was detected with a polyclonal antibody that detects the 55-kDa proenzyme and the 26-kDa processed fragment.

fering with either membrane blebbing or apoptotic body engulfment by macropinocytosis were tested as described previously (34, 40–42). We used blebbistatin, a myosin II inhibitor; genistein, a specific tyrosine kinase inhibitor; Y-27632, a ROCK inhibitor that prevents cell fragmentation during apoptosis; and cytochalasin B, an inhibitor of actin polymerization, required in the formation of dynamic membrane protrusions during blebbing and for phagocytosis and macropinocytosis processes (36). All these drugs were used at nontoxic doses, as validated by the MTT assay (see

Materials and Methods). More important, the inhibitors failed to affect the number of CHIKV<sup>+</sup> cells (intensity and percentage of CHIKV<sup>+</sup> cells) from 2 to 12 h postinfection. We also tested what could be the effect of blocking specifically a typical “eat me” signal produced during the apoptotic process [*i.e.*, phosphatidylserine (PS)] using recombinant annexin V, as described previously (40, 43). **Figure 6** indicates that all inhibitors as well as the annexin V treatment contributed to a robust reduction of the percentage of CHIKV<sup>+</sup> cells at 48 h ( $P < 0.001$ ) when compared to





**Figure 4.** Human fibroblasts from primary cultures display the same cytopathic and apoptotic characteristics as HeLa cells during CHIKV infection. *A*) Primary cultures of human fibroblasts (*a*: synovial tissues obtained from local surgery; bright-field image) were exposed to different MOI of CHIKV and analyzed to ascertain cell density (Cresyl violet staining) in control cells (*b*: 48 h) or CHIKV-infected cells (*c*: MOI 0.1, 48 h). Infection was validated by double immunofluorescence staining using anti-CHIKV (green) and mouse anti-CD141 (red; *d-f*); of note, >98% of cells were CD90<sup>+</sup> (marker of fibroblasts, not shown). *B*) Level of cell viability was measured using the MTT assay and using primary fibroblasts from two different sources, while the level of apoptosis in synovial fibroblasts (passage P1) was assessed after staining for cytosolic cytochrome *c*, mitochondrial Bax, and cleaved PARP. *C*) Quantification of data. *D*) CHIKV<sup>+</sup> (green) synovial fibroblasts were stained for cleaved PARP (red). DAPI-stained nuclei are blue.

control cells infected with CHIKV (MOI 1). Moreover, we found that all inhibitors dramatically impaired the production of viral progeny, as indicated by the measure of the viral load in TCS by QRT-PCR (not shown) and TCID<sub>50</sub> per milliliter (Fig. 6B). These data would support the paradigm that inhibition of apoptotic bleb formation, as well as their engulfment by the surrounding cells, severely affects CHIKV infection.

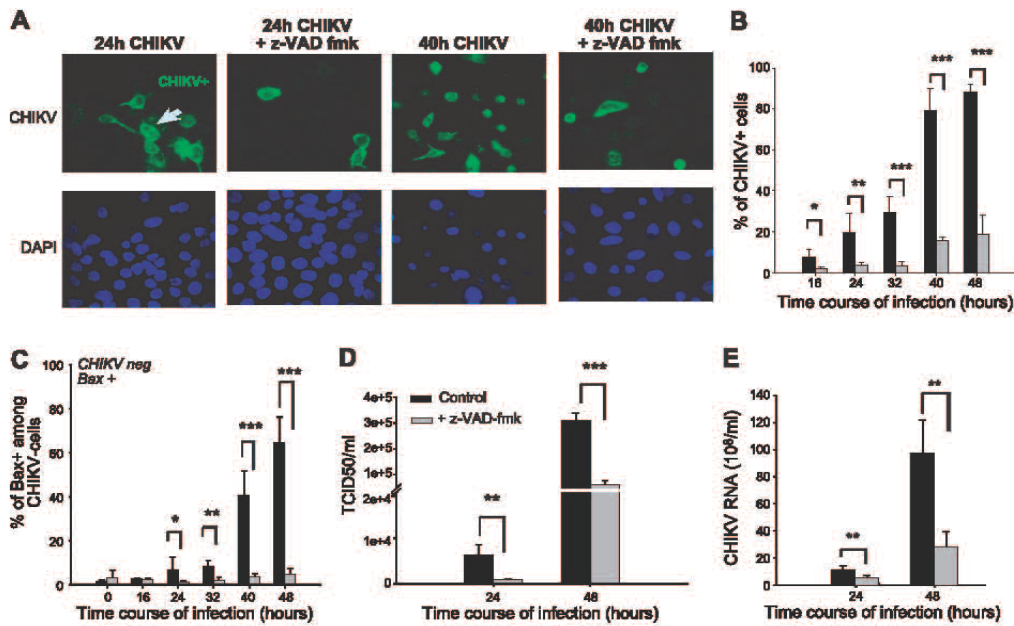
#### Engulfment of apoptotic blebs containing CHIKV materials promotes infection of macrophage cells

We prepared inoculums either enriched for CHIKV-containing apoptotic blebs (denoted CHIKV nonfiltered; Fig. 7) or depleted of these apoptotic blebs by 0.2- $\mu$ m filtering (denoted CHIKV filtered). The viral load (as assessed by qRT-PCR and TCID<sub>50</sub> assay) was equivalent in both inoculums. Primary cultures of macrophages (double-stained for CD14/CD18, not shown, or for TLR7, Fig. 7A), as well as macrophages derived from PMA-treated MM6 or THP-1 cell lines, were tested for CHIKV infection using the two different inoculums at MOI 1. Figure 7B (white arrows) shows that apoptotic blebs stained for cleaved caspase-3 and CHIKV (E1 antigen) could interact with macrophages. To confirm that these blebs were originally from HeLa cells undergoing apoptosis, cells were pre-labeled with CFSE to stain cell membranes in fluorescent green. Figure 7C clearly illustrates that the

CFSE-labeled blebs are associated with THP1 macrophages (at T 0) and lead to the replication of the virus inside the phagocytic cells at 24 h PI. The level of CHIKV infection in PMA-differentiated THP1 macrophages was also increased following exposure to apoptotic blebs containing CHIKV when compared to CHIKV alone, as tested by quantitative immunostaining (percentage of CHIKV THP1 cells; Fig. 7D) and by RT-PCR (Fig. 7E). This infection was readily blocked by pretreatment of PMA-treated THP1 cells with annexin V or cytochalasin B (Fig. 7D). Of critical note, the annexin V inhibition was maintained only for the first 24 h and was superseded at 48 h, indicating a possible PSR-independent phagocytic pathway. At 48 h, the cytochalasin B treatment was toxic (MTT data; not shown, as discussed in Materials and Methods).

#### DISCUSSION

Very high levels of CHIKV replicates in target cells, such as fibroblasts and epithelial cells, and up to 10<sup>9</sup>-10<sup>12</sup> viral RNA copies/ml of blood have been reported in the acute setting of the infection (12). Hence, it is critical that protective mechanisms are in place to control viral spreading and tissue injuries that could otherwise lead to severe arthritis and encephalitis in acute settings (27, 31). More-

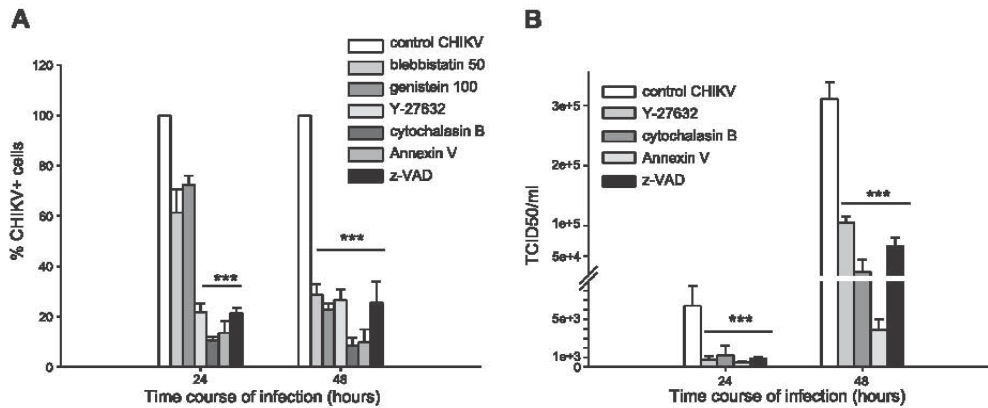


**Figure 5.** Inhibition of apoptosis with z-VAD strongly interferes with the CHIKV infection. Viral replication in presence of z-VAD\_fmk (10  $\mu$ M), a wide-spectrum inhibitor of caspases, was analyzed over the time course of infection, either by immunofluorescence (A–C), or by viral titration of the tissue culture supernatants to determine TCID<sub>50</sub> per milliliter (D) and by direct quantification of the viral EI mRNA by qRT-PCR (E). Immunostaining revealed that the number of CHIKV<sup>+</sup> but apoptotic cells (Bax<sup>+</sup>) was dramatically reduced in the presence of the caspase inhibitor. Results are from 3 independent experiments.

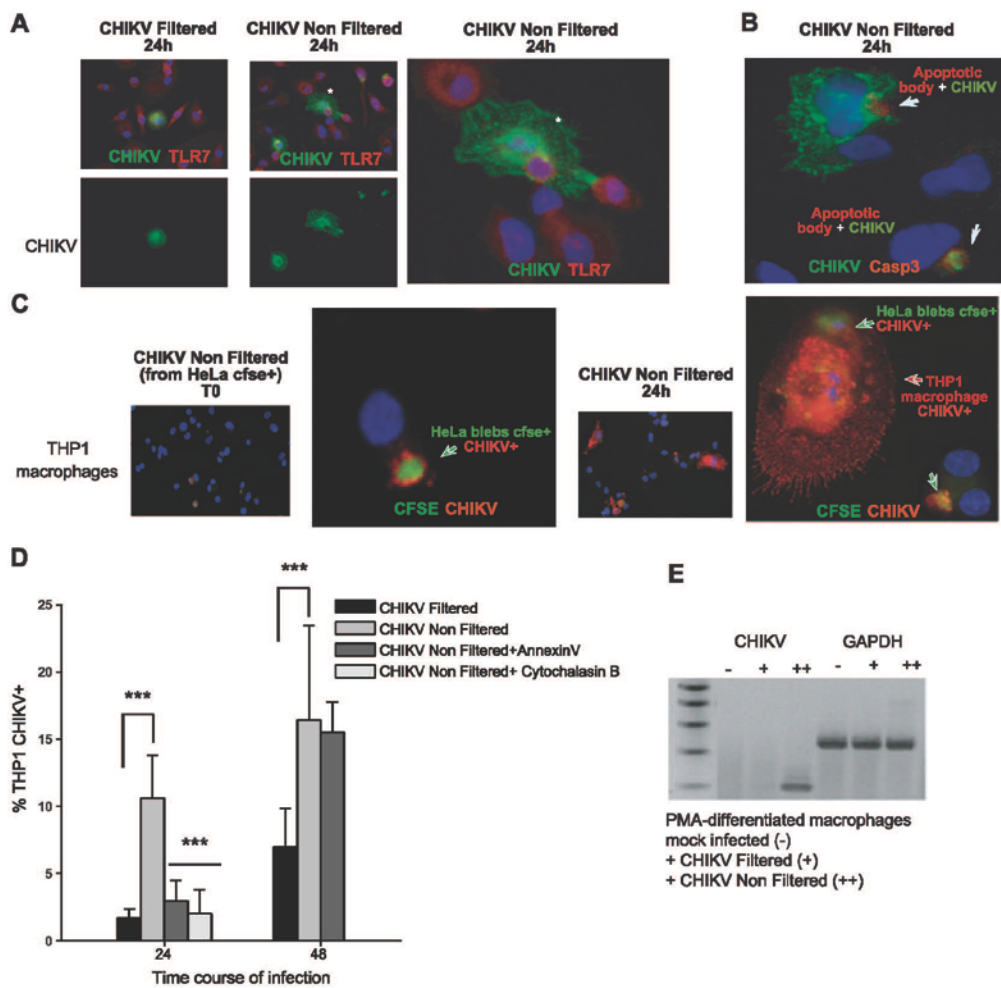
over, the description of persisting joint and skin injuries months to years after the initial insult argues for the capacity of CHIKV to subvert the host cell response even in the face of a robust acquired immune response, but by mechanisms largely ill-characterized.

In this comprehensive study, we have analyzed the

interaction between CHIKV and host cells to decipher the mechanisms either controlling viral infection or, on the contrary, promoting viral spreading and pathogenicity. We show the following results for the first time: 1) CHIKV (MOI 0.1–1) infects HeLa cells as well as primary cultures of fibroblasts and causes robust apopto-



**Figure 6.** Drugs that inhibit the production of apoptotic blebs or their macropinocytosis by neighboring cells control viral replication and spreading. Several inhibitors were tested to block either apoptotic blebbing (blebbistatin, genistein, and Y-27632) or engulfment of apoptotic blebs (cytochalasin B and annexin V). Viral replication was analyzed over the time course of infection, either by estimation of the number of CHIKV<sup>+</sup> cells by immunofluorescence (A) or by titration of the viral particles to determine TCID<sub>50</sub> per milliliter (B).



**Figure 7.** Engulfment of apoptotic blebs contributes to CHIKV infection of macrophages. *A, B*) Primary cultures of human macrophages (>95% of CD18<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> amoeboid cells; not shown) were infected with different inoculums of CHIKV. CHIKV inoculums were from HeLa cell culture supernatants collected at 72 h after CHIKV infection (MOI 1). Before exposure to macrophages for 4 h and then 20 h in medium alone (24 h time point), these inoculums were either used directly (CHIKV nonfiltered) or 0.2- $\mu$ m filtered to eliminate apoptotic blebs (CHIKV filtered). *A*) Macrophages were double stained for TLR7 (rabbit; red) and CHIKV (mouse; green). *B*) Macrophages were stained for cleaved caspase-3 (rabbit; red) and CHIKV E1 (mouse; green) to identify apoptotic blebs containing the virus (and/or viral proteins). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). *C*) Same experiments were carried out with PMA-differentiated THP1 cells but using nonfiltered inoculums prepared from CFSE-labeled infected HeLa cells. CFSE<sup>+</sup> (green) blebs containing CHIKV (red) are contacting THP1 macrophages at T 0. At 24 h, the engulfment of CFSE<sup>+</sup> CHIKV<sup>+</sup> blebs leads to the infection of THP1 macrophages. *D*) Percentage of THP1 macrophages stained for CHIKV E1 detected by immunofluorescence was evaluated 24 and 48 h after incubation with either filtered or nonfiltered inoculums. In some experiments, cells were preincubated with either annexin V or cytochalasin B, an inhibitor of phagocytosis. *E*) RT-PCR analyses for CHIKV E1 and GAPDH housekeeping gene from mock-infected PMA-treated MM6 (-) or incubated with filtered (+) or nonfiltered (++) inoculums.

sis, and this was inhibited by UV treatment of the virus; 2) CHIKV-induced apoptosis is engaged through an early caspase-9-dependent intrinsic mitochondrial pathway followed by an extrinsic caspase-8-dependent pathway; 3) CHIKV also exerts cytopathic activity through bystander apoptosis; 4) the apoptosis machinery is subverted

by CHIKV through the release of viral materials (stained for E1 and capsid) shielded into membrane vesicles (*i.e.*, apoptotic blebs); and 5) remarkably, engulfment of these CHIKV-apoptotic blebs promotes the infection of neighboring cells and macrophages in a noninflammatory (dormant) manner.



The first step of CHIKV infection is to enter target cells by a receptor-mediated mechanism yet to be characterized. Several intracellular recognition receptors (*e.g.*, RIG, TLR7 involved in the detection of viral RNA) will next be involved in triggering the antiviral response, as recently described in mouse embryonic fibroblasts (44).

Interestingly, we found that the capacity of CHIKV to elicit apoptosis in HeLa was dependent on the ability of the virus to replicate. UV-treated virus failed to cause apoptosis; this would indicate that viral replication products (RNA or protein) are essential to trigger apoptosis; and this is in contrast to earlier observations reported for Sindbis virus on neuroendocrine cells (33). Surely, CHIKV-induced cell death mechanisms were first shown to involve caspase-9 mitochondrial events with Bax relocalization and cytochrome *c* release. The involvement of the mitochondrial pathway was already described for several alphaviruses, as in Sindbis- or Semliki-induced apoptosis, which delayed Bcl2-transfected cells, or in Bax/Bak/caspase-9 mouse embryonic fibroblast (MEF) double-knockout cells (15, 45, 46).

Subsequently, from 24 h postinfection, we could observe activation of the initiator caspase-8, as indicated by immunocytochemistry and Western blotting of cell lysates. The nature of the signals that initiate the extrinsic pathway needs to be identified. We also showed that bystander induction of apoptosis (CHIKV<sup>-</sup> and cPARP<sup>+</sup> cells) relied on caspase activities.

Unequivocally, the expected purpose of the cell suicide in response to infection is to short-circuit the viral expansion and to promote the clearance of dead infected cells by professional phagocytes (47, 48). Nevertheless, it is admitted that some viruses can turn apoptosis to their benefit. Dissemination of viral particles through the production of apoptotic blebs from host cells could confer protection from the immune system (11, 49). Conversely, it has been proposed that phagocytosis of these pathogen-enriched apoptotic blebs by antigen-presenting cells (*e.g.*, dendritic cells) could contribute to a robust and uncontrolled adaptive immune response, leading to autoimmunity against self-antigens contained within the blebs (39).

In the case of CHIKV, we provided evidence that completion of the apoptotic process is an important element for efficient virus propagation. We showed that inhibition of the apoptosis process by pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk and executive caspase inhibitor DEVD-cho limited the number of CHIKV-infected HeLa cells. Remarkably, the same inhibitory effects could be obtained with several different drugs, such as blebbistatin, genistein, and Y-27632, that are known to interfere with apoptotic bleb formation or engulfment. More than being opportunistic, CHIKV was revealed to exploit, perhaps in parallel to classic means of cell entry and exit, an ingenious way of camouflaging in apoptotic blebs to enhance viral spreading to neighboring cells. From a therapeutic standpoint, available drugs controlling apoptosis could be used to limit CHIKV spreading (50).

In summary, CHIKV has profound acute cytopathic activities, possibly leading to the persistence of the virus in

macrophages, and hence shielded from the immune system. Our recent published data show that apoptosis and persistence of CHIKV in macrophages are key events taking place in synovial tissues years after the initial insult and contributing to long-lasting arthritis (27, 51). Hence, prevention measures, such as vaccination, are even more warranted, particularly for elderly and very young patients, together with measures to boost innate immune responses at sites of viral persistence to thwart latent infection. F

The authors thank Prof. Xavier de Lamballerie (Unité des Virus Emergents, Marseille, France), Biomérieux (Marcy l'Etoile, France), Prof. Václav Hořejší (Institute of Molecular Genetics, Prague, Czech Republic), and Dr. Marc Grandadam for kindly providing reagents used in this study. (Institut Pasteur, CNR Arbovirus, Paris, France). Financial support was provided by an Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Contrat d'Interface to P.G., a Regional Council fellowship to T.D., and laboratory funding from Contrat de Projets État-Région/Fonds Européen de Développement Régional, Ministère de l'Outre Mer, and Programme Hospitalier de Recherche Clinique. The authors declare no commercial connections that may pose a conflict of interest.

## REFERENCES

1. Wertz, I. E., and Hanley, M. R. (1996) Diverse molecular provocation of programmed cell death. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 359–364
2. Lee, H. K., and Iwasaki, A. (2008) Autophagy and antiviral immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 23–29
3. Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C., and Haslett, C. (2002) A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 965–975
4. Danial, N. N., and Korsmeyer, S. J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205–219
5. Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* **87**, 99–163
6. Michallet, M. C., Meylan, E., Ermolaeva, M. A., Vazquez, J., Rebsamen, M., Curran, J., Poeck, H., Bscheider, M., Hartmann, G., König, M., Kalinke, U., Pasparakis, M., and Tschopp, J. (2008) TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. *Immunity* **28**, 651–661
7. Wilson, N. S., Dixit, V., and Ashkenazi, A. (2009) Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat. Immunol.* **10**, 348–355
8. Griffin, D. E., and Hardwick, J. M. (1997) Regulators of apoptosis on the road to persistent alphavirus infection. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 565–592
9. Galluzzi, L., Brenner, C., Morselli, E., Touat, Z., and Kroemer, G. (2008) Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathog.* **4**, e1000018
10. Teodoro, J. C., and Branton, P. E. (1997) Regulation of apoptosis by viral gene products. *J. Virol.* **71**, 1739–1746
11. Chen, Y. B., Seo, S. Y., Kirsch, D. G., Sheu, T. T., Cheng, W. C., and Hardwick, J. M. (2006) Alternate functions of viral regulators of cell death. *Cell Death Differ.* **13**, 1318–1324
12. Pialoux, G., Gauzere, B. A., Jaureguierry, S., and Strobel, M. (2007) Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect. Dis.* **7**, 319–327
13. Rezza, G., Nicoletti, L., Angelini, R., Romi, R., Finarelli, A. C., Panning, M., Cordioli, P., Fortuna, C., Boros, S., Magurano, F., Silvi, G., Angelini, P., Dottori, M., Ciufolini, M. G., Majori, G. C., and Cassone, A. (2007) Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* **370**, 1840–1846
14. Powers, A. M., and Logue, C. H. (2007) Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J. Gen. Virol.* **88**, 2363–2377
15. Levine, B., Huang, Q., Isaacs, J. T., Reed, J. C., Griffen, D. E., and Hardwick, J. M. (1993) Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the bcl-2 cellular oncogene. *Nature* **361**, 739–742

16. Cheng, E. H., Levine, B., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Hardwick, J. M. (1996) Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* **379**, 554–556
17. Jackson, A. C., and Rossiter, J. P. (1997) Apoptotic cell death is an important cause of neuronal injury in experimental Venezuelan equine encephalitis virus infection of mice. *Acta Neuropathol.* **93**, 349–353
18. Glasgow, G. M., McGee, M. M., Tarbatt, C. J., Mooney, D. A., Sheahan, B. J., and Atkins, G. J. (1998) The Semliki Forest virus vector induces p53-independent apoptosis. *J. Gen. Virol.* **79**(Pt. 10), 2405–2410
19. Garen, P. D., Tsai, T. F., and Powers, J. M. (1999) Human eastern equine encephalitis: immunohistochemistry and ultrastructure. *Mod. Pathol.* **12**, 646–652
20. Sammin, D. J., Butler, D., Atkins, G. J., and Sheahan, B. J. (1999) Cell death mechanisms in the olfactory bulb of rats infected intranasally with Semliki forest virus. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **25**, 236–243
21. Fazakerley, J. K., and Allsopp, T. E. (2001) Programmed cell death in virus infections of the nervous system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **253**, 95–119
22. Ozden, S., Huerre, M., Riviere, J. P., Coffey, L. L., Afonso, P. V., Mouly, V., de Monredon, J., Roger, J. C., El Amrani, M., Yvin, J. L., Jaffar, M. C., Frenkiel, M. P., Sourisseau, M., Schwartz, O., Butler-Browne, G., Despres, P., Gessain, A., and Ceccaldi, P. E. (2007) Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection. *PLoS ONE* **2**, e527
23. Couderc, T., Chretien, F., Schilte, C., Disson, O., Brigitte, M., Guivel-Benhassine, F., Touret, Y., Barau, G., Cayet, N., Schuffenecker, I., Despres, P., Arenzana-Seisdedos, F., Michault, A., Albert, M. L., and Lecuit, M. (2008) A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathog.* **4**, e29
24. Wang, E., Volkova, E., Adams, A. P., Forrester, N., Xiao, S. Y., Frolov, I., and Weaver, S. C. (2008) Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya. *Vaccine* **26**, 5030–5039
25. Ziegler, S. A., Lu, L., da Rosa, A. P., Xiao, S. Y., and Tesh, R. B. (2008) An animal model for studying the pathogenesis of chikungunya virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **79**, 133–139
26. Labadie, K., Larcher, T., Joubert, C., Mannioui, A., Delache, B., Brochard, P., Guigand, L., Dubreil, L., Lebon, P., Verrier, B., de Lamballerie, X., Suhrbier, A., Cherel, Y., Le Grand, R., and Roques, P. (2010) Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *J. Clin. Invest.* **120**, 894–906
27. Jaffar-Bandjee, M. C., Das, T., Hoarau, J. J., Krejbich Trotot, P., Denizot, M., Ribera, A., Roques, P., and Casque, P. (2009) Chikungunya virus takes centre stage in virally induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis. *Microbes Infect.* **11**, 1206–1218
28. Solignat, M., Gay, B., Higgs, S., Briant, L., and Devaux, C. (2009) Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology* **393**, 183–197
29. Sourisseau, M., Schilte, C., Casartelli, N., Trouillet, C., Guivel-Benhassine, F., Rudnicka, D., Sol-Foulon, N., Le Roux, K., Prevost, M. C., Fsihi, H., Frenkiel, M. P., Blanchet, F., Afonso, P. V., Ceccaldi, P. E., Ozden, S., Gessain, A., Schuffenecker, I., Verhasselt, B., Zamborlini, A., Saib, A., Rey, F. A., Arenzana-Seisdedos, F., Despres, P., Michault, A., Albert, M. L., and Schwartz, O. (2007) Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog.* **3**, e89
30. Her, Z., Malleret, B., Chan, M., Ong, E. K., Wong, S. C., Kwek, D. J., Tolou, H., Lin, R. T., Tambyah, P. A., Renia, L., and Ng, L. F. (2010) Active infection of human blood monocytes by Chikungunya virus triggers an innate immune response. *J. Immunol.* **184**, 5903–5913
31. Das, T., Jaffar-Bandjee, M. C., Hoarau, J. J., Krejbich Trotot, P., Denizot, M., Lee-Pat-Yuen, C., Sahoo, R., Guiraud, P., Ramful, D., Robin, S., Alessandri, J. L., Gauzere, B. A., and Casque, P. (2010) Chikungunya fever: CNS infection and pathologies of a re-emerging arbovirus. *Prog. Neurobiol.* **91**, 121–129
32. Schuffenecker, I., Iteanu, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M. C., Lavenir, R., Pardigon, N., Reynes, J. M., Pettinelli, F., Biscornet, L., Diancourt, L., Michel, S., Duquerroy, S., Guigon, G., Frenkiel, M. P., Brehin, A. C., Cubito, N., Despres, P., Kunst, F., Rey, F. A., Zeller, H., and Brisse, S. (2006) Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* **3**, e263
33. Jan, J. T., and Griffin, D. E. (1999) Induction of apoptosis by Sindbis virus occurs at cell entry and does not require virus replication. *J. Virol.* **73**, 10296–10302
34. Mercer, J., and Helenius, A. (2008) Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* **320**, 531–535
35. Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., and Olson, M. F. (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* **3**, 339–345
36. Ndozangue-Tourigui, O., Hamelin, J., and Breard, J. (2008) Cytoskeleton and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 11–18
37. Kenis, H., van Genderen, H., Deckers, N. M., Lux, P. A., Hofstra, L., Narula, J., and Reutelingsperger, C. P. (2006) Annexin A5 inhibits engulfment through internalization of PS-expressing cell membrane patches. *Exp. Cell Res.* **312**, 719–726
38. Van Engeland, M., Ramaekers, F. C., Schutte, B., and Reutelingsperger, C. P. (1996) A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* **24**, 131–139
39. Rosen, A., Casciola-Rosen, L., and Ahearn, J. (1995) Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis. *J. Exp. Med.* **181**, 1557–1561
40. Ravichandran, K. S., and Lorenz, U. (2007) Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 964–974
41. Orlando, K. A., Stone, N. L., and Pittman, R. N. (2006) Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells. *Exp. Cell Res.* **312**, 5–15
42. Poon, I. K., Hulett, M. D., and Parish, C. R. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Differ.* **17**, 381–397
43. Hoffmann, P. R., deCathelineau, A. M., Ogden, C. A., Leverrier, Y., Bratton, D. L., Daleke, D. L., Ridley, A. J., Fadok, V. A., and Henson, P. M. (2001) Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J. Cell Biol.* **155**, 649–659
44. Schilte, C., Couderc, T., Chretien, F., Sourisseau, M., Gangneux, N., Guivel-Benhassine, F., Krasner, A., Tschopp, J., Higgs, S., Michault, A., Arenzana-Seisdedos, F., Colonna, M., Peduto, L., Schwartz, O., Lecuit, M., and Albert, M. L. (2010) Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. *J. Exp. Med.* **207**, 429–442
45. Urban, C., Rheme, C., Maerz, S., Berg, B., Pick, R., Nitschke, R., and Borner, C. (2008) Apoptosis induced by Semliki Forest virus is RNA replication dependent and mediated via Bak. *Cell Death Differ.* **15**, 1396–1407
46. Morishi, K., Koura, M., and Matsuura, Y. (2002) Induction of Bad-mediated apoptosis by Sindbis virus infection: involvement of pro-survival members of the Bcl-2 family. *Virology* **292**, 258–271
47. Hashimoto, Y., Moki, T., Takizawa, T., Shiratsuchi, A., and Nakanishi, Y. (2007) Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice. *J. Immunol.* **178**, 2448–2457
48. Fujimoto, I., Pan, J., Takizawa, T., and Nakanishi, Y. (2000) Virus clearance through apoptosis-dependent phagocytosis of influenza A virus-infected cells by macrophages. *J. Virol.* **74**, 3399–3403
49. Everett, H., and McFadden, G. (1999) Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol.* **7**, 160–165
50. Callus, B. A., and Vaux, D. L. (2007) Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. *Cell Death Differ.* **14**, 73–78
51. Hoarau, J. J., Jaffar Bandjee, M. C., Krejbich Trotot, P., Das, T., Li-Pat-Yuen, G., Dassa, B., Denizot, M., Guichard, E., Ribera, A., Henni, T., Tallet, F., Moiton, M. P., Gauzere, B. A., Bruniquet, S., Jaffar Bandjee, Z., Morbidelli, P., Martigny, C., Jolivet, M., Cay, F., Grandadam, M., Tolou, H., Vieillard, V., Debre, P., Autran, B., and Casque, P. (2010) Persistent chronic inflammation and infection by chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. *J. Immunol.* **184**, 5914–5927

Received for publication June 12, 2010.  
Accepted for publication September 16, 2010.



## X. Discussion générale

Le virus CHIKV, tout comme d'autres alphavirus de l'Ancien Monde, tels que le virus Ockelbo scandinave du groupe SINV, ONNV, MAYV et les virus australiens Barmah Forest et RRV, est reconnu être à l'origine d'épidémies d'arthrites et d'arthralgies aiguës et chroniques (Flexman, Smith et al. 1998; Jacups, Whelan et al. 2008). Le suivi de patients inclus lors de leur maladie aiguë et également plusieurs mois après la primo-infection, nous a permis de confronter nos résultats avec les données des modèles souris et macaque, ainsi que les données d'autres alphavirus, afin de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et d'en tirer des conséquences thérapeutiques.

La réponse immune et inflammatoire engagée par l'infection CHIKV:

La réponse immunitaire innée constitue sans aucun doute la première ligne de défense contre CHIKV, et contribue à l'installation de l'immunité spécifique secondaire des cellules B et T. On observe une disparition de la virémie en 7-10 jours ainsi qu'une disparition du virus dans les tissus chez la souris (Couderc, Chretien et al. 2008), chez le NHP (Labadie, Larcher et al. 2010) et chez l'homme (Laurent, Le Roux et al. 2007) (notre article 3). La réponse anticorps dirigée contre les protéines E1, E2 et capsid est efficace, et pourrait prévenir toute réinfection par une nouvelle piqûre de moustique ou la recirculation virale à partir de gîtes sanctuaires (Article 3). La réponse tissulaire est également importante comme le souligne les travaux de Schilte *et al.* avec l'observation qu'un transfert de cellules immunes IFNAR<sup>+/+</sup> dans des souris IFNAR<sup>-/-</sup> irradiées ne protège pas de l'infection CHIK. C'est donc bien la réponse IFN de type I engagée au niveau des cellules du stroma (fibroblastes, myoblastes...) qui contribue à limiter la

réplication virale. Le rôle clef d'IPS-1 indique clairement la contribution de RIG-I ou de MDA-5 dans la détection de l'ARN du CHIKV mais on ne peut pas exclure la contribution également de MyD88 et donc des TLRs dans cette reconnaissance (Schilte, Couderc et al. 2010).

Les données préliminaires sur les souris RAG KO ne permettent pas de considérer que les réponses T et anticorps (LB) ont un rôle protecteur permettant de contrôler l'infection et il conviendra de vérifier le rôle des cellules NK qui sont par ailleurs massivement activées chez les souris et les patients CHIKV. En effet plus de 80% des cellules NK humaines sont activées dès les premiers jours qui suivent l'infection (article 3). Les cellules DCs ne sont pas infectées par le CHIKV et elles ne répondent pas au challenge infectieux pour des raisons encore obscures. Bien que les PBMCs (notamment les monocytes circulants) ne soient pas infectées par le CHIKV, nous avons montré que l'infection aiguë à CHIKV mobilise une réponse inflammatoire de type Th1/>Th2 très modérée. Deux cytokines de l'immunité innée, IL-12 et IFN- $\gamma$  qui vont agir de façon synergique et activer les cellules immunes T et B, sont particulièrement abondantes dans la phase aiguë CHIK. Cette sécrétion d'IFN- $\gamma$  est retrouvée dans le modèle macaque, associée à une augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans les tous premiers jours de l'infection (Labadie, Larcher et al. 2010). D'une manière générale, le contexte inflammatoire engagée par le CHIKV est beaucoup moins prononcé que celui que l'on a pu observer chez des patients avec une bactériémie ou encore après des infections virales à CMV (article 2, données non-publiées). En particulier, l'absence d'IL-1 $\beta$  et le faible taux de TNF- $\alpha$  ne nous permettent pas d'expliquer l'épisode fébrile.

Nous avons confirmé, comme chez la souris (Couderc, Chretien et al. 2008), que le CHIKV infecte et se multiplie dans des lignées fibroblastiques (HS633T, HT1080, MRC5) et des fibroblastes humains issus de biopsies de ligaments et de synoviale (article 4 et données préliminaires). Le fibroblaste, considéré comme cellule immunitaire « non professionnelle »,

serait engagé dans la réponse immunitaire innée par une production d'IFN  $\alpha/\beta$  (Schilte, Couderc et al. 2010).

Pas tous les fibroblastes ne semblent présenter la même sensibilité à l'infection et l'identification de sous-populations de fibroblastes CD141+ (lectine thrombomoduline) résistants à l'infection est une observation très intéressante (article 4). L'étude de leur transcriptome devrait permettre l'identification du récepteur pour le CHIKV ou encore d'identifier de nouveaux mécanismes de défense développés par la cellule face à l'infection. RIG-I, MDA-5, PKR sont tous exprimés par les différentes lignées et cultures primaires de fibroblastes humains *in vitro* et des expériences de shRNA nous a permis de valider le rôle également de TLR7 dans la reconnaissance et le contrôle de l'infection par le CHIKV (données non-publiées de MC Jaffar-Bandjee et M Denizot). La réponse IFN- $\alpha$  et - $\beta$  des fibroblastes est engagée mais sans que les ISGs (15, 54, 56) soient fortement exprimés. Cette observation est à rapprocher des données récentes de Fros *et al* qui montrent que le CHIKV est capable d'interférer dans la voie de signalisation IFNAR/STAT (Fros, Liu et al. 2010).

Dans le modèle souris de Gardner et al (Gardner, Anraku et al. 2010), l'infection du modèle adulte C57BL/6 avec une souche de CHIKV réunionnaise a reproduit l'atteinte articulaire humaine avec un important œdème local associé à une impotence fonctionnelle, comme cela a déjà été décrit pour RRV (Morrison, Whitmore et al. 2006). Du CHIKV a été isolé du tissu œdémateux articulaire ainsi que dans le muscle, et d'autres tissus (rate, ganglion, foie). L'analyse histologique des tissus de l'articulation associait une réaction cellulaire mononucléée, un exsudat fibrineux des tissus synoviaux ainsi qu'une nécrose musculaire. Ces lésions avaient déjà été décrites dans l'atteinte à RRV chez des souris adultes C57BL6 (Lidbury, Simeonovic et al. 2000; Morrison, Whitmore et al. 2006).

Les mêmes atteintes fonctionnelles et histologiques ont été retrouvées en utilisant le modèle macaque infecté par le CHIKV (Labadie, Larcher et al. 2010).

Le ou les mécanismes impliqués dans les arthralgies au cours de l'infection CHIKV en phase aiguë restent obscurs. La réponse inflammatoire au site infectieux reste très faible et polarisée (IFN- $\alpha$ , MCP1, IL-6, IL-8, mais pas de TNF- $\alpha$  et d'IL1- $\beta$ , ni d'IL10). Un des éléments qui pourrait contribuer aux lésions tissulaires, est l'apoptose associée à une destruction de la matrice extracellulaire par des métalloprotéases. Ces données n'ont pas encore été décrites dans les modèles animaux. Le virus ou d'autres facteurs libérés par exemple par les cellules NK ou les macrophages infectés par le CHIKV, pourraient contribuer à cette apoptose.

#### Le rôle de l'apoptose au cours de l'infection par le CHIKV

Nous avons montré que l'infection des fibroblastes entraîne un effet cytopathogène caractérisé par un engagement rapide de l'apoptose dont les deux voies intrinsèque et extrinsèque sont impliquées. Cette induction de l'apoptose serait liée à la capacité de réplication du virus car le virus inactivé aux UV est inefficace. La voie intrinsèque est la plus précoce engagée vers la 8<sup>e</sup> heure PI avec l'activation de la Caspase 9 mitochondriale entraînant la relocalisation de Bax et la libération du cytochrome C. La voie extrinsèque est activée dès la 24<sup>e</sup> heure PI par la voie de la Caspase 8. Nos résultats préliminaires montrent une augmentation des niveaux de transcription de plusieurs molécules pro-apoptotiques, comme TNF- $\alpha$ , FasL, IFN- $\alpha$  et TRAIL en réponse à l'infection CHIKV dans le modèle de la cellule Hela. La capacité de l'IFN- $\alpha$  à déclencher l'apoptose a été décrite par plusieurs auteurs (Schuffenecker, Iteanu et al. 2006; Sourisseau, Schilte et al. 2007; Salignat, Gay et al. 2009). Nous avons aussi montré l'induction de l'apoptose par effet 'bystander' (cellules CHIKV- et PARP clivé+). La possibilité que ces cellules aient été initialement infectées mais qu'elles aient contrôlé la réplication virale reste à être vérifiée. L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, fait partie des modes de réponse de l'hôte à une

infection afin de limiter la dissémination du pathogène et de favoriser l'élimination des cellules mortes par les cellules phagocytaires professionnelles (Teodoro and Branton 1997). Néanmoins, certains virus détournent l'apoptose à leur bénéfice, en profitant de cet état protégé à l'intérieur des corps apoptotiques pour disséminer d'une cellule à l'autre. Par ailleurs, la phagocytose des corps apoptotiques par les cellules présentatrices d'antigène, comme les cellules dendritiques, pourrait être à l'origine d'une réponse immunitaire exagérée et incontrôlée, conduisant à des phénomènes d'auto-immunité (Powers and Logue 2007). Dans le cas du CHIKV, nous avons montré que l'aboutissement du phénomène d'apoptose est une condition pour une propagation efficace du virus. En effet, l'inhibition de l'apoptose par des molécules intervenant à différents niveaux ( Z-VAD-fmk pan-inhibiteur, DEVD-cho inhibiteur des caspases exécutrices), ou des inhibiteurs de la formation des corps apoptotiques ou de la phagocytose (blebbistatin, génistein et Y-27632), entraîne une diminution significative du nombre de cellules Hela infectées. Il apparaît donc que le CHIKV ait développé des mécanismes de contrôle de l'apoptose, qui lui permettent de se cacher dans les corps apoptotiques afin de se disséminer dans les cellules voisines. D'un point de vue thérapeutique, on pourrait envisager que l'utilisation de molécules inhibant l'apoptose puissent limiter la dissémination du virus.

#### Arthrite chronique post-CHIKV

Les données chez la souris et le macaque n'ont pas permis de décrire ces atteintes chroniques car les phénomènes associés (douleurs) ne sont pas faciles à explorer et les animaux devront être suivis sur des périodes beaucoup plus longues. Par ailleurs, nous avons montré chez les patients qui souffrent d'arthrite chronique post-CHIKV l'absence de phénomènes inflammatoires et biologiques évidents. Le phénotypage des PBMCs ne montre pas de différences notables avec celui des sujets guéris. Les deux paramètres qui restent élevés chez les chroniques alors qu'ils

reviennent à des taux de base chez les guéris sont l'IL-12 et l'IFN- $\alpha$ . La persistance d'IL-12 sérique et de l'expression de l'IFN- $\alpha$  dans les PBMCs constituent des témoins d'une activation persistante des cellules immunes innées chez les patients chroniques.

Nos données histologiques du patient chronique M18 post-CHIKV sont à rapprocher de celles observées au cours de l'arthrite épidémique à RRV. Classiquement, l'infection RRV s'accompagne d'une réaction de type mononucléée, avec des monocytes, des macrophages vacuolés, des cellules B et T, quelques cellules NK et qui sont détectées dans le liquide synovial (Clarris, Doherty et al. 1975; Fraser, Cunningham et al. 1981). Du matériel viral a pu être détecté dans les monocytes et macrophages, sans qu'on ait pu néanmoins isoler le RRV en culture cellulaire (Fraser, Cunningham et al. 1981). Par ailleurs, l'analyse histologique de biopsies de lésions érythémato-papuleuses lors de la phase aiguë retrouve la présence des monomacrophages et des lymphocytes T, essentiellement des lymphocytes CD8<sup>+</sup> et plus rarement des lymphocytes CD4 (Fraser, Ratnamohan et al. 1983). On ne retrouve pas de polynucléaires ni de complexes immuns. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> jouent probablement un rôle important en éliminant les cellules infectées par mécanisme cytolytique et aussi par production de facteurs antiviraux (Hazelton, Hughes et al. 1985). Ce schéma est sensiblement le même pour l'infection CHIKV au niveau du tissu synovial avec néanmoins une très faible contribution des cellules CD8<sup>+</sup> et l'absence de neutrophiles (article 3). Nous n'avons pas pu isoler du virus (le matériel avait été fixé immédiatement après exérèse) mais nous avons pu détecter du matériel génétique et protéique du CHIKV dans les macrophages périvasculaires et présents dans le liquide synovial.

Soden *et al* avaient montré la présence d'ARN de RRV dans le tissu synovial de patients atteints de polyarthrite épidémique un mois après l'épisode aigu (Soden, Vasudevan et al. 2000). Le rôle des macrophages dans les lésions post-RRV avait été démontré par Rulli *et al.* sur le modèle souris (Rulli, Melton et al. 2007). Ils avaient noté une bonne corrélation entre l'afflux massif des

macrophages dans le muscle, qui disparaissait lors d'injection d'agents toxiques (silice), et les nécroses tissulaires (Lidbury, Simeonovic et al. 2000). L'infection à long-terme des macrophages murins par du RRV a été démontré 50 jours PI et elle est caractérisée par une absence d'effet cytopathogène (Linn, Aaskov et al. 1996) (Way, Lidbury et al. 2002). Concernant le CHIKV, l'analyse des tissus synoviaux de macaques infectés présentant un œdème des articulations a retrouvé la présence du CHIKV dans les cellules mononuclées, et dans une moindre mesure dans les cellules endothéliales (Labadie, Larcher et al. 2010). Les travaux de Gardner et al sur la souris (Gardner, Anraku et al. 2010) confirment cette persistance à long-terme de CHIKV dans les macrophages au niveau des lésions articulaires, associée à une transcription d'IFN- $\gamma$  et de MCP-1 qui est probablement à l'origine de l'activation et du recrutement des macrophages.

La persistance virale pourrait, comme cela a été démontré pour RRV, altérer les propriétés immunorégulatrices des macrophages, en particulier en dérégulant la sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires (Way, Lidbury et al. 2002). Par ailleurs, l'infection chronique des macrophages pourrait entraîner une reprogrammation de leur différenciation vers un phénotype dit « alternatif », associé à une réponse immune de type Th2 anti-inflammatoire (fortes expressions d'IL-10 et de TGF- $\beta$ 1/2) qui contribuerait à la formation de fibrose tissulaire (Gangadharan, Hovee et al. 2008). A ce titre, il est intéressant de noter que notre étude histologique de la synoviale de patients chroniques a mis en évidence une hyperplasie fibroblastique, une prolifération vasculaire (CD31/PECAM1) ainsi qu'une infiltration macrophagique CD18+ essentiellement périvasculaire. La présence de taux élevé de métalloprotéase MMP2 devrait aussi participer aux lésions tissulaires et à la fibrose. Au niveau du tissu synovial, nous avons aussi noté la présence de lymphocytes CD4+ et CD56+, et l'extrême rareté des lymphocytes CD8+ cytotoxiques alors que les lymphocytes B CD19+ étaient indétectables.

L'absence de l'activité cytotoxique par les lymphocytes CD8+ pourrait contribuer à une élimination incomplète des cellules infectées et donc de leur persistance, comme cela a été évoqué pour d'autres Togavirus (Kagi and Hengartner 1996 ; Colin de Verdiere and Molina 2007). Notre étude des mécanismes cellulaires de l'apoptose nous a conforté dans l'hypothèse que les macrophages s'infecteraient en phagocytant les corps apoptotiques libérés par les fibroblastes et ceci sans induire un contexte non inflammatoire. Indéniablement, le macrophage chroniquement infecté, semble constituer le phénomène central à l'origine de l'arthrite chronique à CHIKV. Les prochaines études devront s'attacher à définir plus précisément le transcriptome de ces macrophages pour identifier les éléments pouvant contribuer à l'arthrite chronique post-CHIK



## XI. Perspectives

La poursuite des travaux au sein de notre groupe de recherche (GRI, Groupe de recherche Immunopathologie et maladies Infectieuses) vise à apporter des éléments d'informations pour résoudre les points encore obscurs de la physiopathologie du CHIKV.

De façon immédiate, nous allons poursuivre la compréhension des formes chroniques et du rhumatisme par l'analyse du transcriptome des PBMCs des patients, en comparant les chroniques aux guéris. La production chronique d'IFN $\alpha$  et d'IL-12 laisserait suggérer que la persistance virale entretient une stimulation chronique d'une inflammation polarisée car elle ne semble pas impliquer de composante pro-inflammatoire (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ). La compréhension physiopathologique aura des conséquences sur l'attitude thérapeutique.

Par la suite, plusieurs axes de recherche sont déjà tracés et concernent :

- i) l'identification des voies de reconnaissance du virus par la cellule fibroblaste (TLRs/RLR/NLR) pour engager la réponse IFN et également l'apoptose.
- ii) L'étude de la réponse immune (cytokines, chimiokines) des sous-populations de fibroblastes CD141+ réfractaires à l'infection par le CHIKV comparée à celle des fibroblastes sensibles nous permettra probablement de comprendre l'hétérogénéité de la maladie chez les individus.
- iii) Nous poursuivons notre étude sur les mélanocytes, qui sont très sensibles à l'infection par le CHIK et pour essayer de mieux comprendre les phénomènes

inflammatoires cutanés, notamment dans les épidermolyses bulleuses chez le nourrisson associées à des dépigmentations et des séquelles à long-terme.

- iv) Les complications neurologiques post-CHIKV sont certes rares mais graves, entraînant chez les nourrissons infectés au moment de l'accouchement des atteintes neurologiques, des retards d'acquisition. Nous avons montré que les neurones étaient sensibles au CHIKV ainsi que les cellules astrocytes (modèles souris et lignées humaines). L'étude de la réponse immunitaire offrirait une meilleure compréhension des atteintes du SNC et périphérique.
  
- v) Le phénomène de l'ADE est décrit comme étant impliqué dans la persistance du RRV dans les macrophages et nous envisageons de vérifier si ce même phénomène serait aussi impliqué pour le CHIKV.
  
- vi) Concernant l'immunité acquise, l'étude des fonctions effectrices des cellules T spécifiques pourra déterminer par ELISPOT les épitopes antigéniques reconnus par les lymphocytes CD4 et CD8. Ce travail fait déjà l'objet d'une collaboration avec l'Unité INSERM U945 du Pr Brigitte Autran, et il est en cours de finalisation. L'identification du ou des épitopes immunodominants permettrait de formuler un vaccin recombinant. Nous avons également prévu d'étudier la réponse B spécifique en identifiant les antigènes responsables ainsi que l'étude cinétique de la réponse IgG sur le long terme.

Une grande partie de ces axes de recherche sera développée dans le cadre du projet Européen PCRD7 : ICRES

Participant no.	Participant organisation name	Country
1 Pr Fazakerley	University of Edinburgh	UK
2 Pr Liljestrom	Karolinska Institute	Sweden
3 Pr Merits	University of Tartu	Estonia
4 Pr Ahola	University of Helsinki	Finland
5 Pr Lecuit	Pasteur Institute	France
6 Pr Gasque	University of La Réunion	France
7 Dr Roques	Commissariat a L'energie Atomique (CEA)	France
8 Dr Drostén	University of Bonn	Germany
9 Pr Meyer	University of Berlin	Germany
10 Dr Ng	A*Star	Singapore
11 Pr Abubaka	University of Malaya	Malaysia

## **XII. Conclusions générales**

Les données dans la littérature concernant les mécanismes immunopathologiques du CHIKV, voire même des alphavirus d'une manière générale sont décrits essentiellement chez l'animal, la souris, et plus récemment chez le macaque. Peu de données sont disponibles sur la physiopathologie dans sa forme aiguë et chronique chez l'homme. Ceci explique une prise en charge thérapeutique essentiellement symptomatique, dirigée contre la douleur, et contre la fièvre pendant la phase aiguë. Plus de trois années après l'épidémie, la principale caractéristique des complications de cette infection est représentée par l'arthralgie/arthritis chronique, qui est devenue une préoccupation de santé publique dans les zones d'endémie.

Les résultats que nous avons obtenus contribuent à une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques de la maladie en décrivant la réaction immunitaire systémique lors de la phase aiguë, qui se définit comme une réponse innée dominée par une activation massive de cellules NK, associée à une augmentation des cellules T activées, ainsi qu'une mobilisation des cellules effectrices/mémoires B. L'évolution vers l'arthrite chronique ne s'accompagne pas d'une réaction inflammatoire marquée (absence de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8), ni de réaction auto-immune (FR, anti-CPP).

L'étude des tissus et liquides synoviaux de patients chroniques nous a permis de dévoiler le conflit virus-hôte et la réaction inflammatoire 'polarisée' se déroulant au niveau des tissus-cibles de la maladie. Cette réaction diffère de celle de la polyarthrite rhumatoïde et avec des conséquences importantes pour le traitement. L'analyse histologique des tissus synoviaux a probablement permis d'identifier la source de cette stimulation persistante comme étant des macrophages hébergeant du matériel viral. Ces macrophages, essentiellement périvasculaires, font partie d'une réaction tissulaire faite d'hyperplasie fibroblastique et d'angiogénèse qu'il

conviendra d'analyser plus dans le détail. On notera la présence de cellules NK, mais l'extrême rareté des lymphocytes CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et l'absence de lymphocytes B. L'hyperplasie fibroblastique s'accompagne de façon intéressante d'une activité apoptotique, témoin direct ou indirect de la présence virale. Nos données indiquent que CHIKV peut mobiliser l'apoptose pour infecter d'autres cellules tout en échappant à la réponse immune cellulaire (NK) et humorale.

La comparaison des données clinico-biologiques des patients chroniques comparés aux patients guéris, nous a permis de définir des facteurs prédictifs d'évolution vers la chronicité comme l'âge > 60 ans et la charge virale initiale. Le système immunitaire des personnes âgées peut être fragilisé comme cela a été décrit dans l'infection par WNV et permettant d'aboutir à des infections et complications chroniques (Kong, Delroux et al. 2008). Cet aspect devra notamment être pris en compte dans les différents modèles expérimentaux.

Beaucoup de points restent à être élucidés et avec le bénéfice de la cohorte que nous avons pu établir au cours de ces quatre dernières années. Néanmoins, nos premières données permettent d'avoir une réflexion sur l'orientation du traitement (effet antiprolifératif du méthotrexate), sachant que la composante inflammatoire est modérée, mais surtout qu'il faudra poursuivre les études afin de définir comment détecter le virus dans les gîtes sanctuaires *in vivo*, et comment l'éradiquer, sachant que dans quelques cas, les signes cliniques locaux d'atteinte articulaire ont disparu avec l'exérèse chirurgicale.

Bibliographie:

- 1 - Aaskov, J. G., D. A. Dalglisch, et al. (1987). "Natural killer cells in viral arthritis." Clin Exp Immunol **68**(1): 23-32.
- 2 - Adesina, O. A. and H. A. Odelola (1991). "Ecological distribution of Chikungunya haemagglutination inhibition antibodies in human and domestic animals in Nigeria." Trop Geogr Med **43**(3): 271-5.
- 3 - Aguilar, P. V., S. C. Weaver, et al. (2007). "Capsid protein of eastern equine encephalitis virus inhibits host cell gene expression." J Virol **81**(8): 3866-76.
- 4 - Ahola, T., A. Lampio, et al. (1999). "Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity." Embo J **18**(11): 3164-72.
- 5 - Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- 6 - Allen, I. C., M. A. Scull, et al. (2009). "The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA." Immunity **30**(4): 556-65.
- 7 - Alsharif, M., M. Lobigs, et al. (2006). "NK cell-mediated immunopathology during an acute viral infection of the CNS." Eur J Immunol **36**(4): 887-96.
- 8 - Amor, S., M. F. Scallan, et al. (1996). "Role of immune responses in protection and pathogenesis during Semliki Forest virus encephalitis." J Gen Virol **77** ( Pt 2 ): 281-91.
- 9 - Anderson, S. G. and E. L. French (1957). "An epidemic exanthem associated with polyarthritis in the Murray valley, 1956." Med J Aust **44**(4): 113-7.
- 10 - Andoniou, C. E., S. L. van Dommelen, et al. (2005). "Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity." Nat Immunol **6**(10): 1011-9.

- 11 - Appel, E., A. Katzoff, et al. (2000). "Differential regulation of Bcl-2 and Bax expression in cells infected with virulent and nonvirulent strains of sindbis virus." Virology **276**(2): 238-42.
- 12 - Assuncao-Miranda, I., M. T. Bozza, et al. (2010). "Pro-inflammatory response resulting from sindbis virus infection of human macrophages: implications for the pathogenesis of viral arthritis." J Med Virol **82**(1): 164-74.
- 13 - Baggiolini, M., B. Dewald, et al. (1997). "Human chemokines: an update." Annu Rev Immunol **15**: 675-705.
- 14 - Bagny, L., H. Delatte, et al. (2009). "Aedes (Diptera: Culicidae) vectors of arboviruses in Mayotte (Indian Ocean): distribution area and larval habitats." J Med Entomol **46**(2): 198-207.
- 15 - Baize, S., E. M. Leroy, et al. (2002). "Inflammatory responses in Ebola virus-infected patients." Clin Exp Immunol **128**(1): 163-8.
- 16 - Barral, P. M., D. Sarkar, et al. (2009). "Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: key regulators of innate immunity." Pharmacol Ther **124**(2): 219-34.
- 17 - Barrera, R. (1996). "Competition and resistance to starvation in larvae of container-inhabiting *Aedes* mosquitoes." Ecol Entomol **21**: 117-127.
- 18 - Barry, G., L. Breakwell, et al. (2009). "PKR acts early in infection to suppress Semliki Forest virus production and strongly enhances the type I interferon response." J Gen Virol **90**(Pt 6): 1382-91.
- 19 - Bernard, E., M. Solignat, et al. (2010). "Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: role of clathrin and early endosomal compartments." PLoS One **5**(7): e11479.
- 20 - Bernstein, E., A. M. Denli, et al. (2001). "The rest is silence." Rna **7**(11): 1509-21.
- 21 - Bessaud, M., C. N. Peyrefitte, et al. (2006). "Chikungunya virus strains, Reunion Island outbreak." Emerg Infect Dis **12**(10): 1604-6.
- 22 - Beutler, B. A. (2009). "TLRs and innate immunity." Blood **113**(7): 1399-407.

- 23 - Biggerstaff, B. J. and L. R. Petersen (2003). "Estimated risk of transmission of the West Nile virus through blood transfusion in the US, 2002." Transfusion **43**(8): 1007-17.
- 24 - Binn, L. N., V. R. Harrison, et al. (1967). "Patterns of viremia and antibody observed in rhesus monkeys inoculated with chikungunya and other serologically related group A arboviruses." Am J Trop Med Hyg **16**(6): 782-5.
- 25 - Black, W. C. t., K. E. Bennett, et al. (2002). "Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*." Arch Med Res **33**(4): 379-88.
- 26 - Bonjardim, C. A., P. C. Ferreira, et al. (2009). "Interferons: signaling, antiviral and viral evasion." Immunol Lett **122**(1): 1-11.
- 27 - Borgherini, G., P. Poubeau, et al. (2008). "Persistent arthralgia associated with chikungunya virus: a study of 88 adult patients on reunion island." Clin Infect Dis **47**(4): 469-75.
- 28 - Borgherini, G., P. Poubeau, et al. (2007). "Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients." Clin Infect Dis **44**(11): 1401-7.
- 29 - Bouquillard, E. and B. Combe (2009). "A report of 21 cases of rheumatoid arthritis following Chikungunya fever. A mean follow-up of two years." Joint Bone Spine **76**(6): 654-7.
- 30 - Brehin, A. C., I. Casademont, et al. (2009). "The large form of human 2',5'-Oligoadenylate Synthetase (OAS3) exerts antiviral effect against Chikungunya virus." Virology **384**(1): 216-22.
- 31 - Briegel, H. and S. E. Timmermann (2001). "*Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): physiological aspects of development and reproduction." J Med Entomol **38**(4): 566-71.
- 32 - Brighton, S. W. (1984). "Chloroquine phosphate treatment of chronic Chikungunya arthritis. An open pilot study." S Afr Med J **66**(6): 217-8.
- 33 - Brighton, S. W., O. W. Prozesky, et al. (1983). "Chikungunya virus infection. A retrospective study of 107 cases." S Afr Med J **63**(9): 313-5.
- 34 - Browne, E. P. and D. R. Littman (2009). "Myd88 is required for an antibody response to retroviral infection." PLoS Pathog **5**(2): e1000298.



- 35 - Burke, C. W., C. L. Gardner, et al. (2009). "Characteristics of alpha/beta interferon induction after infection of murine fibroblasts with wild-type and mutant alphaviruses." Virology **395**(1): 121-32.
- 36 - Burteau C, W. L., Kettmann R. (2007). "Les chémokines et leurs récepteurs : rôle dans les infections virales et dans les pathologies cancéreuses." Biotechnol Agron Soc Environ **11**(2): 141-150.
- 37 - Calisher, C. H., A. O. el-Kafrawi, et al. (1986). "Complex-specific immunoglobulin M antibody patterns in humans infected with alphaviruses." J Clin Microbiol **23**(1): 155-9.
- 38 - Caplen, N. J., Z. Zheng, et al. (2002). "Inhibition of viral gene expression and replication in mosquito cells by dsRNA-triggered RNA interference." Mol Ther **6**(2): 243-51.
- 39 - Carey, D. E. (1971). "Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity?" J Hist Med Allied Sci **26**(3): 243-62.
- 40 - Carrieri, M., Bacchi M, Bellini R, Maini S (2003). "On the competition occurring between *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Italy. ." Environ Entomol **32**: 1313-1321.
- 41 - Catteau, C., D. Sissoko, et al. (2005). "[Health status and issues on Reunion Island in 2005]." Med Trop (Mars) **65**(6): 515-24.
- 42 - CDC (2004). " Information and guidance for clinicians \_ West Nile virus: clinical description, 2004 [://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/clinicians/pdf/wnv-clinicaldescription.pdf](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/clinicians/pdf/wnv-clinicaldescription.pdf)."
- 43 - Chahar, H. S., P. Bharaj, et al. (2009). "Co-infections with chikungunya virus and dengue virus in Delhi, India." Emerg Infect Dis **15**(7): 1077-80.
- 44 - Chanas, A. C., E. A. Gould, et al. (1982). "Monoclonal antibodies to Sindbis virus glycoprotein E1 can neutralize, enhance infectivity, and independently inhibit haemagglutination or haemolysis." J Gen Virol **58 Pt 1**: 37-46.

- 45 - Chanas, A. C., Z. Hubalek, et al. (1979). "A comparative study of O'nyong nyong virus with Chikungunya virus and plaque variants." Arch Virol **59**(3): 231-8.
- 46 - Charles, P. C., J. Trgovcich, et al. (2001). "Immunopathogenesis and immune modulation of Venezuelan equine encephalitis virus-induced disease in the mouse." Virology **284**(2): 190-202.
- 47 - Charrel, R. N., X. de Lamballerie, et al. (2007). "Chikungunya outbreaks--the globalization of vectorborne diseases." N Engl J Med **356**(8): 769-71.
- 48 - Chastel, C. (1963). "[Human Infections in Cambodia by the Chikungunya Virus or an Apparently Closely Related Agent. Ii. Experimental Pathological Anatomy.]" Bull Soc Pathol Exot Filiales **56**: 915-24.
- 49 - Chastel, C. (1964). "[Human Infections in Cambodia by the Chikungunya Virus or a Closely Related Agent. 3. Epidemiology.]" Bull Soc Pathol Exot Filiales **57**: 65-82.
- 50 - Chatterjee, S. N., S. K. Chakravarti, et al. (1965). "Virological investigation of cases with neurological complications during the outbreak of haemorrhagic fever in Calcutta." J Indian Med Assoc **45**(6): 314-6.
- 51 - Chen, G., M. H. Shaw, et al. (2009). "NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease." Annu Rev Pathol **4**: 365-98.
- 52 - Chopra, A., V. Anuradha, et al. (2008). "Chikungunya virus aches and pains: An emerging challenge." Arthritis Rheum **58**(9): 2921-2.
- 53 - Chu, J. J. and M. L. Ng (2004). "Interaction of West Nile virus with alpha v beta 3 integrin mediates virus entry into cells." J Biol Chem **279**(52): 54533-41.
- 54 - Clarris, B. J., R. L. Doherty, et al. (1975). "Epidemic polyarthritis: a cytological, virological and immunochemical study." Aust N Z J Med **5**(5): 450-7.
- 55 - Clemens, M. J. and A. Elia (1997). "The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function." J Interferon Cytokine Res **17**(9): 503-24.

- 56 - Clouston, W. M. and J. F. Kerr (1985). "Apoptosis, lymphocytotoxicity and the containment of viral infections." Med Hypotheses **18**(4): 399-404.
- 57 - Coccia, E. M., M. Severa, et al. (2004). "Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells." Eur J Immunol **34**(3): 796-805.
- 58 - Colin de Verdiere, N. and J. M. Molina (2007). "Rheumatic manifestations caused by tropical viruses." Joint Bone Spine **74**(5): 410-3.
- 59 - Colonna, M., G. Trinchieri, et al. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." Nat Immunol **5**(12): 1219-26.
- 60 - Condreay, L. D., R. H. Adams, et al. (1988). "Effect of actinomycin D and cycloheximide on replication of Sindbis virus in *Aedes albopictus* (mosquito) cells." J Virol **62**(8): 2629-35.
- 61 - Costanzo, K. S., B. Kesavaraju, et al. (2005). "Condition-specific competition in container mosquitoes: the role of noncompeting life-history stages." Ecology **86**(12): 3289-95.
- 62 - Couderc, T., F. Chretien, et al. (2008). "A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease." PLoS Pathog **4**(2): e29.
- 63 - Couderc, T., N. Khandoudi, et al. (2009). "Prophylaxis and therapy for Chikungunya virus infection." J Infect Dis **200**(4): 516-23.
- 64 - D'Ortenzio, E., M. Grandadam, et al. (2009). "Sporadic cases of chikungunya, Reunion Island, August 2009." Euro Surveill **14**(35).
- 65 - Dalla Pozza, G. and G. Majori (1992). "First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy." J Am Mosq Control Assoc **8**(3): 318-20.
- 66 - Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." Cell **116**(2): 205-19.
- 67 - Das, T., M. C. Jaffar-Bandjee, et al. (2010). "Chikungunya fever: CNS infection and pathologies of a re-emerging arbovirus." Prog Neurobiol **91**(2): 121-9.

- 68 - Dash, P. K., M. Tiwari, et al. (2008). "RNA interference mediated inhibition of Chikungunya virus replication in mammalian cells." Biochem Biophys Res Commun **376**(4): 718-22.
- 69 - De Franco, L. R., Robertson M (2009). *Immunité. La réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires*. Bruxelles.
- 70 - de Groot, R. J., W. R. Hardy, et al. (1990). "Cleavage-site preferences of Sindbis virus polyproteins containing the non-structural proteinase. Evidence for temporal regulation of polyprotein processing in vivo." Embo J **9**(8): 2631-8.
- 71 - De Lamballerie, X., V. Boisson, et al. (2008). "On chikungunya acute infection and chloroquine treatment." Vector Borne Zoonotic Dis **8**(6): 837-9.
- 72 - de Lamballerie, X., E. Leroy, et al. (2008). "Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come?" Virologia **5**: 33.
- 73 - De Ranitz, C. M., R. M. Myers, et al. (1965). "Clinical impressions of chikungunya in Vellore gained from study of adult patients." Indian J Med Res **53**(8): 756-63.
- 74 - Dehecq JS, T. J., Fohr G, Delatte H, Fontenille D, Domerg C, Billot E, Chaussade C, Gauzere BA (2008). "Impact entomologique des campagnes de sensibilisation à la destruction des gîtes larvaires d'Aedes albopictus à la Réunion (ass'Moustik)." InVS/BEH n°38: 39-40.
- 75 - Delatte, H., J. S. Dehecq, et al. (2008). "Geographic distribution and developmental sites of Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) during a Chikungunya epidemic event." Vector Borne Zoonotic Dis **8**(1): 25-34.
- 76 - Delatte, H., G. Gimonneau, et al. (2009). "Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of Aedes albopictus, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean." J Med Entomol **46**(1): 33-41.
- 77 - Deller, J. J., Jr. and P. K. Russell (1968). "Chikungunya disease." Am J Trop Med Hyg **17**(1): 107-11.

- 78 - Desmyter, J., J. L. Melnick, et al. (1968). "Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero)." J Virol **2**(10): 955-61.
- 79 - Diallo, M., J. Thonnon, et al. (1999). "Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles." Am J Trop Med Hyg **60**(2): 281-6.
- 80 - Diaz-Guerra, M., C. Rivas, et al. (1997). "Activation of the IFN-inducible enzyme RNase L causes apoptosis of animal cells." Virology **236**(2): 354-63.
- 81 - Economopoulou, A., M. Dominguez, et al. (2009). "Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Reunion." Epidemiol Infect **137**(4): 534-41.
- 82 - Edelman, R., C. O. Tacket, et al. (2000). "Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218." Am J Trop Med Hyg **62**(6): 681-5.
- 83 - Ernould, S., H. Walters, et al. (2008). "[Chikungunya in paediatrics: epidemic of 2005-2006 in Saint-Denis, Reunion Island]." Arch Pediatr **15**(3): 253-62.
- 84 - Espert, L., G. Degols, et al. (2003). "ISG20, a new interferon-induced RNase specific for single-stranded RNA, defines an alternative antiviral pathway against RNA genomic viruses." J Biol Chem **278**(18): 16151-8.
- 85 - Everett, H. and G. McFadden (1999). "Apoptosis: an innate immune response to virus infection." Trends Microbiol **7**(4): 160-5.
- 86 - Fauconnier, B. (1970). "[Increase of viral pathogenicity by use of anti-interferon serum in vivo]." C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D **271**(16): 1464-6.
- 87 - Fazakerley, J. K., C. L. Cotterill, et al. (2006). "Virus tropism, distribution, persistence and pathology in the corpus callosum of the Semliki Forest virus-infected mouse brain: a novel system to study virus-oligodendrocyte interactions." Neuropathol Appl Neurobiol **32**(4): 397-409.

- 88 - Filipe, A. F. and M. R. Pinto (1973). "Arbovirus studies in Luanda, Angola. 2. Virological and serological studies during an outbreak of dengue-like disease caused by the Chikungunya virus." Bull World Health Organ **49**(1): 37-40.
- 89 - Fleischer, J., E. Soeth, et al. (1996). "Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes." Immunology **89**(4): 592-8.
- 90 - Flexman, J. P., D. W. Smith, et al. (1998). "A comparison of the diseases caused by Ross River virus and Barmah Forest virus." Med J Aust **169**(3): 159-63.
- 91 - Fourie, E. D. and J. G. Morrison (1979). "Rheumatoid arthritic syndrome after chikungunya fever." S Afr Med J **56**(4): 130-2.
- 92 - Francois, C., G. Duverlie, et al. (2000). "Expression of hepatitis C virus proteins interferes with the antiviral action of interferon independently of PKR-mediated control of protein synthesis." J Virol **74**(12): 5587-96.
- 93 - Fraser, J. R. (1986). "Epidemic polyarthritis and Ross River virus disease." Clin Rheum Dis **12**(2): 369-88.
- 94 - Fraser, J. R. and G. J. Becker (1984). "Mononuclear cell types in chronic synovial effusions of Ross River virus disease." Aust N Z J Med **14**(4): 505-6.
- 95 - Fraser, J. R., A. L. Cunningham, et al. (1981). "Cytology of synovial effusions in epidemic polyarthritis." Aust N Z J Med **11**(2): 168-73.
- 96 - Fraser, J. R., V. M. Ratnamohan, et al. (1983). "The exanthem of Ross River virus infection: histology, location of virus antigen and nature of inflammatory infiltrate." J Clin Pathol **36**(11): 1256-63.
- 97 - Fredericksen, B. L., B. C. Keller, et al. (2008). "Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1." J Virol **82**(2): 609-16.
- 98 - Friedman, R. M. (1964). "Role of Interferon in Viral Interference." Nature **201**: 848-9.

- 99 - Fritel, X., O. Rollot, et al. (2010). "Chikungunya virus infection during pregnancy, Reunion, France, 2006." Emerg Infect Dis **16**(3): 418-25.
- 100 - Frolov, I. (2004). "Persistent infection and suppression of host response by alphaviruses." Arch Virol Suppl(18): 139-47.
- 101 - Frolov, I., R. Hardy, et al. (2001). "Cis-acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis." Rna **7**(11): 1638-51.
- 102 - Frolov, I. and S. Schlesinger (1996). "Translation of Sindbis virus mRNA: analysis of sequences downstream of the initiating AUG codon that enhance translation." J Virol **70**(2): 1182-90.
- 103 - Frolova, E. I., R. Z. Fayzulin, et al. (2002). "Roles of nonstructural protein nsP2 and Alpha/Beta interferons in determining the outcome of Sindbis virus infection." J Virol **76**(22): 11254-64.
- 104 - Fros, J. J., W. J. Liu, et al. (2010). "Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling." J Virol.
- 105 - Gaedigk-Nitschko, K. and M. J. Schlesinger (1990). "The Sindbis virus 6K protein can be detected in virions and is acylated with fatty acids." Virology **175**(1): 274-81.
- 106 - Galluzzi, L., C. Brenner, et al. (2008). "Viral control of mitochondrial apoptosis." PLoS Pathog **4**(5): e1000018.
- 107 - Ganesan, K., A. Diwan, et al. (2008). "Chikungunya encephalomyelorradiculitis: report of 2 cases with neuroimaging and 1 case with autopsy findings." AJNR Am J Neuroradiol **29**(9): 1636-7.
- 108 - Gangadharan, B., M. A. Hoeve, et al. (2008). "Murine gammaherpesvirus-induced fibrosis is associated with the development of alternatively activated macrophages." J Leukoc Biol **84**(1): 50-8.

- 109 - Gardner, C. L., C. W. Burke, et al. (2008). "Eastern and Venezuelan equine encephalitis viruses differ in their ability to infect dendritic cells and macrophages: impact of altered cell tropism on pathogenesis." J Virol **82**(21): 10634-46.
- 110 - Gardner, J., I. Anraku, et al. (2010). "Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice." J Virol **84**(16): 8021-32.
- 111 - Garmashova, N., R. Gorchakov, et al. (2007). "The Old World and New World alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff." J Virol **81**(5): 2472-84.
- 112 - Garnier P, B. E., Reix G, Kwiatek S, Reboux A, Huguenin B, Faulquier B, Gauzere B, Becquart J. (2006). "Severe acute hepatitis during Chikungunya virus infection on Reunion island: case report from 14 observations." J. Clin. Virol. **36**(S60).
- 113 - Gauzere, B. A., Martinet O, Reboux A.H., Lebrun G., Jaffar-Bandjee MC (2007). "Infections à chikungunya à la Réunion : Formes graves "émergentes" de l'adulte en service de réanimation du Centre Hospitalier Départemental de Saint-Denis, de mai 2005 à mai 2006." Feuillets de Biologie N° 276 XXXXVIII: 65-69.
- 114 - Gelfand, M. (1948). "A few of the rarer diseases seen in Africa." East Afr Med J **25**(12): 447-53.
- 115 - Gerardin, P., G. Barau, et al. (2008). "Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Reunion." PLoS Med **5**(3): e60.
- 116 - Gerardin, P., V. Guernier, et al. (2008). "Estimating Chikungunya prevalence in La Reunion Island outbreak by serosurveys: two methods for two critical times of the epidemic." BMC Infect Dis **8**: 99.
- 117 - Gil, J. and M. Esteban (2000). "Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action." Apoptosis **5**(2): 107-14.



- 118 - Glasgow, G. M., M. M. McGee, et al. (1998). "The Semliki Forest virus vector induces p53-independent apoptosis." J Gen Virol **79** ( Pt 10): 2405-10.
- 119 - Glasgow, L. A. (1966). "Leukocytes and interferon in the host response to viral infections. II. Enhanced interferon response of leukocytes from immune animals." J Bacteriol **91**(6): 2185-91.
- 120 - Gomez de Cedron, M., N. Ehsani, et al. (1999). "RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2." FEBS Lett **448**(1): 19-22.
- 121 - Gorchakov, R., E. Frolova, et al. (2005). "Inhibition of transcription and translation in Sindbis virus-infected cells." J Virol **79**(15): 9397-409.
- 122 - Gougeon, M. L. (2003). "Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack." Nat Rev Immunol **3**(5): 392-404.
- 123 - Gould, E. A. and S. Higgs (2009). "Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases." Trans R Soc Trop Med Hyg **103**(2): 109-21.
- 124 - Grakoui, A., R. Levis, et al. (1989). "A cis-acting mutation in the Sindbis virus junction region which affects subgenomic RNA synthesis." J Virol **63**(12): 5216-27.
- 125 - Green, S., D. W. Vaughn, et al. (1999). "Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity." J Med Virol **59**(3): 329-34.
- 126 - Grieder, F. B., B. K. Davis, et al. (1997). "Kinetics of cytokine expression and regulation of host protection following infection with molecularly cloned Venezuelan equine encephalitis virus." Virology **233**(2): 302-12.
- 127 - Griffin, D., Hardwick, JM (1998). "Apoptosis in Alphavirus encephalitis." Seminars in Virology **8**: 481-489.
- 128 - Griffin, D. E. (1995). "Roles and reactivities of antibodies to alphavirus." seminars in Virology **6**: 249-255.

- 129 - Griffin, D. E. and J. M. Hardwick (1997). "Regulators of apoptosis on the road to persistent alphavirus infection." Annu Rev Microbiol **51**: 565-92.
- 130 - Grivard, P., K. Le Roux, et al. (2007). "Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection." Pathol Biol (Paris) **55**(10): 490-4.
- 131 - Gubler, D. (1997). Dengue and dengue hemorrhagic fever : its history and resurgence as a global public health problem. Wallingford, United Kingdom.
- 132 - Guilherme, J. M., C. Gonella-Legall, et al. (1996). "Seroprevalence of five arboviruses in Zebu cattle in the Central African Republic." Trans R Soc Trop Med Hyg **90**(1): 31-3.
- 133 - Hahon, N. and W. A. Hankins (1970). "Assay of Chikungunya virus in cell monolayers by immunofluorescence." Appl Microbiol **19**(2): 224-31.
- 134 - Hahon, N. and W. D. Zimmerman (1970). "Chikungunya virus infection of cell monolayers by cell-to-cell and extracellular transmission." Appl Microbiol **19**(2): 389-91.
- 135 - Haller, O. and G. Kochs (2002). "Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity." Traffic **3**(10): 710-7.
- 136 - Halstead, S. B. (1979). "In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody." J Infect Dis **140**(4): 527-33.
- 137 - Halstead, S. B., S. Udomsakdi, et al. (1969). "Dengue chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. 3. Clinical, epidemiologic, and virologic observations on disease in non-indigenous white persons." Am J Trop Med Hyg **18**(6): 984-96.
- 138 - Hamon, J. (1953). "[Appearance in Ile de Reunion of resistance to DDT among *Culex fatigans* Wiedemann, principal vector of *Wuchereria bancrofti* filariasis in Ile.]." Bull Soc Pathol Exot Filiales **46**(3): 454-63.
- 139 - Han, J., P. Sabbatini, et al. (1996). "The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein." Genes Dev **10**(4): 461-77.

- 140 - Harley, D., A. Sleight, et al. (2001). "Ross River virus transmission, infection, and disease: a cross-disciplinary review." Clin Microbiol Rev **14**(4): 909-32, table of contents.
- 141 - Harrison, V. R., L. N. Binn, et al. (1967). "Comparative immunogenicities of chikungunya vaccines prepared in avian and mammalian tissues." Am J Trop Med Hyg **16**(6): 786-91.
- 142 - Harrison, V. R., K. H. Eckels, et al. (1971). "Production and evaluation of a formalin-killed Chikungunya vaccine." J Immunol **107**(3): 643-7.
- 143 - Hawley, A. H. (1988). "The biology of *Aedes albopictus*." J. Am. Mosq. Control. Assoc **4 Suppl**: 2-39.
- 144 - Hazelton, R. A., C. Hughes, et al. (1985). "The inflammatory response in the synovium of a patient with Ross River arbovirus infection." Aust N Z J Med **m15**(3): 336-9.
- 145 - Hemmi, H., O. Takeuchi, et al. (2004). "The roles of two I $\kappa$ B kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection." J Exp Med **199**(12): 1641-50.
- 146 - Her, Z., Y. W. Kam, et al. (2009). "Chikungunya: a bending reality." Microbes Infect **11**(14-15): 1165-76.
- 147 - Her, Z., B. Malleret, et al. (2010). "Active infection of human blood monocytes by Chikungunya virus triggers an innate immune response." J Immunol **184**(10): 5903-13.
- 148 - Hidmark, A. S., G. M. McInerney, et al. (2005). "Early alpha/beta interferon production by myeloid dendritic cells in response to UV-inactivated virus requires viral entry and interferon regulatory factor 3 but not MyD88." J Virol **79**(16): 10376-85.
- 149 - Higashi, N., A. Matsumoto, et al. (1967). "Electron microscope study of development of Chikungunya virus in green monkey kidney stable (VERO) cells." Virology **33**(1): 55-69.
- 150 - Hirsch, R. L. (1981). "Natural killer cells appear to play no role in the recovery of mice from Sindbis virus infection." Immunology **43**(1): 81-9.

- 151 - Hoarau, J. J., M. C. Jaffar Bandjee, et al. (2010). "Persistent chronic inflammation and infection by chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response." J Immunol **184**(10): 5914-27.
- 152 - Hochedez, P., A. Canestri, et al. (2008). "Management of travelers with fever and exanthema, notably dengue and chikungunya infections." Am J Trop Med Hyg **78**(5): 710-3.
- 153 - Hochedez, P., S. Jaureguiberry, et al. (2006). "Chikungunya infection in travelers." Emerg Infect Dis **12**(10): 1565-7.
- 154 - Honda, K., H. Yanai, et al. (2005). "IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses." Nature **434**(7034): 772-7.
- 155 - Huang, J. H., C. F. Yang, et al. (2009). "Imported chikungunya virus strains, Taiwan, 2006-2009." Emerg Infect Dis **15**(11): 1854-6.
- 156 - Igarashi, A. (1978). "Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses." J Gen Virol **40**(3): 531-44.
- 157 - Inoue, S., K. Morita, et al. (2003). "Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines." J Med Primatol **32**(2): 89-94.
- 158 - Jordanov, M. S., J. M. Paranjape, et al. (2000). "Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase by double-stranded RNA and encephalomyocarditis virus: involvement of RNase L, protein kinase R, and alternative pathways." Mol Cell Biol **20**(2): 617-27.
- 159 - Isaacs, A. and J. Lindenmann (1957). "Virus interference. I. The interferon." Proc R Soc Lond B Biol Sci **147**(927): 258-67.
- 160 - Ivanov, A. P., O. E. Ivanova, et al. (1992). "Serological investigations of Chikungunya virus in the Republic of Guinea." Ann Soc Belg Med Trop **72**(1): 73-4.

- 161 - Jackson, A. C., T. R. Moench, et al. (1987). "The pathogenesis of spinal cord involvement in the encephalomyelitis of mice caused by neuroadapted Sindbis virus infection." Lab Invest **56**(4): 418-23.
- 162 - Jacobs, B. L. and J. O. Langland (1996). "When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA." Virology **219**(2): 339-49.
- 163 - Jacups, S. P., P. I. Whelan, et al. (2008). "Ross River virus and Barmah Forest virus infections: a review of history, ecology, and predictive models, with implications for tropical northern Australia." Vector Borne Zoonotic Dis **8**(2): 283-97.
- 164 - Jaffar-Bandjee, M. C., T. Das, et al. (2009). "Chikungunya virus takes centre stage in virally induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis." Microbes Infect **11**(14-15): 1206-18.
- 165 - Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- 166 - Jeandel, P., R. Josse, et al. (2004). "[Exotic viral arthritis: role of alphavirus]." Med Trop (Mars) **64**(1): 81-8.
- 167 - Johnson, B. (1988). O'nyong-nyong virus disease. . Boca Raton, CRC Press.
- 168 - Johnson, B. K. (1988). The Arboviruses : Epidemiology and Ecology, vol.3.
- 169 - Jones, M., A. Davidson, et al. (2005). "Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression." J Virol **79**(9): 5414-20.
- 170 - Josseran, L., C. Paquet, et al. (2006). "Chikungunya disease outbreak, Reunion Island." Emerg Infect Dis **12**(12): 1994-5.
- 171 - Juliano, S. A., L. P. Lounibos, et al. (2004). "A field test for competitive effects of *Aedes albopictus* on *A. aegypti* in South Florida: differences between sites of coexistence and exclusion?" Oecologia **139**(4): 583-93.

- 172 - Jupp, P. G. and A. Kemp (1996). "What is the potential for future outbreaks of chikungunya, dengue and yellow fever in southern Africa?" S Afr Med J **86**(1): 35-7.
- 173 - Jupp, P. G. and B. M. McIntosh (1990). "Aedes furcifer and other mosquitoes as vectors of chikungunya virus at Mica, northeastern Transvaal, South Africa." J Am Mosq Control Assoc **6**(3): 415-20.
- 174 - Jupp PG., M. B. (1988). Chikungunya virus disease. The arboviruses: epidemiology and ecology., Boca Raton: CRC Press.
- 175 - Kaariainen, L. and T. Ahola (2002). "Functions of alphavirus nonstructural proteins in RNA replication." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **71**: 187-222.
- 176 - Kagi, D. and H. Hengartner (1996). "Different roles for cytotoxic T cells in the control of infections with cytopathic versus noncytopathic viruses." Curr Opin Immunol **8**(4): 472-7.
- 177 - Kam, Y. W., E. K. Ong, et al. (2009). "Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention." Microbes Infect **11**(14-15): 1186-96.
- 178 - Kang, D. C., R. V. Gopalkrishnan, et al. (2002). "mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 637-42.
- 179 - Kariuki Njenga, M., L. Nderitu, et al. (2008). "Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa." J Gen Virol **89**(Pt 11): 2754-60.
- 180 - Kaschula, V. R., A. F. Van Dellen, et al. (1978). "Some infectious diseases of wild vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops pygerythrus*) in South Africa." J S Afr Vet Assoc **49**(3): 223-7.
- 181 - Kato, H., O. Takeuchi, et al. (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." Nature **441**(7089): 101-5.
- 182 - Kawai, T., K. Takahashi, et al. (2005). "IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction." Nat Immunol **6**(10): 981-8.

- 183 - Kennedy, A. C., J. Fleming, et al. (1980). "Chikungunya viral arthropathy: a clinical description." J Rheumatol **7**(2): 231-6.
- 184 - Kerr, I. M. and R. E. Brown (1978). "pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(1): 256-60.
- 185 - Khan, A. H., K. Morita, et al. (2002). "Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site." J Gen Virol **83**(Pt 12): 3075-84.
- 186 - Klimstra, W. B., E. M. Nangle, et al. (2003). "DC-SIGN and L-SIGN can act as attachment receptors for alphaviruses and distinguish between mosquito cell- and mammalian cell-derived viruses." J Virol **77**(22): 12022-32.
- 187 - Knudsen, A. B. (1995). "Global distribution and continuing spread of *Aedes albopictus*." Parassitologia **37**(2-3): 91-7.
- 188 - Kobayashi, M., N. Nihei, et al. (2002). "Analysis of northern distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Japan by geographical information system." J Med Entomol **39**(1): 4-11.
- 189 - Kolokoltsov, A. A., E. H. Fleming, et al. (2006). "Venezuelan equine encephalitis virus entry mechanism requires late endosome formation and resists cell membrane cholesterol depletion." Virology **347**(2): 333-42.
- 190 - Kong, K. F., K. Delroux, et al. (2008). "Dysregulation of TLR3 impairs the innate immune response to West Nile virus in the elderly." J Virol **82**(15): 7613-23.
- 191 - Konstantinov, O. K. (1990). "[Ticks of the Ixodidae family as reservoir of arboviruses in the Republic of Guinea. II. Arboviruses]." Rev Elev Med Vet Pays Trop **43**(1): 15-22.
- 192 - Koonin, E. V. and V. V. Dolja (1993). "Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences." Crit Rev Biochem Mol Biol **28**(5): 375-430.

- 193 - Krilov, L. R., L. J. Anderson, et al. (1989). "Antibody-mediated enhancement of respiratory syncytial virus infection in two monocyte/macrophage cell lines." J Infect Dis **160**(5): 777-82.
- 194 - Kumar, H., T. Kawai, et al. (2006). "Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses." J Exp Med **203**(7): 1795-803.
- 195 - Kuno, G. (2001). "Persistence of arboviruses and antiviral antibodies in vertebrate hosts: its occurrence and impacts." Rev Med Virol **11**(3): 165-90.
- 196 - Kupper, T. S. and R. C. Fuhlbrigge (2004). "Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences." Nat Rev Immunol **4**(3): 211-22.
- 197 - Labadie, K., T. Larcher, et al. (2010). "Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages." J Clin Invest **120**(3): 894-906.
- 198 - Lam, S. K., K. B. Chua, et al. (2001). "Chikungunya infection--an emerging disease in Malaysia." Southeast Asian J Trop Med Public Health **32**(3): 447-51.
- 199 - Laras, K., N. C. Sukri, et al. (2005). "Tracking the re-emergence of epidemic chikungunya virus in Indonesia." Trans R Soc Trop Med Hyg **99**(2): 128-41.
- 200 - Larrieu, S., N. Poudroux, et al. (2010). "Factors associated with persistence of arthralgia among Chikungunya virus-infected travellers: report of 42 French cases." J Clin Virol **47**(1): 85-8.
- 201 - Laurent, P., K. Le Roux, et al. (2007). "Development of a sensitive real-time reverse transcriptase PCR assay with an internal control to detect and quantify chikungunya virus." Clin Chem **53**(8): 1408-14.
- 202 - Ledrans M, Q. I., Renault P, Pierre V (2007 ). "Outbreak of chikungunya in the French Territories, 2006: lessons learned." Eurosurveillance **September 6**.
- 203 - Lee, H., P. D. Ricker, et al. (1994). "The configuration of Sindbis virus envelope proteins is stabilized by the nucleocapsid protein." Virology **204**(1): 471-4.



- 204 - Lemant, J., V. Boisson, et al. (2008). "Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the Reunion Island outbreak in 2005-2006." Crit Care Med **36**(9): 2536-41.
- 205 - Lemm, J. A., A. Bergqvist, et al. (1998). "Template-dependent initiation of Sindbis virus RNA replication in vitro." J Virol **72**(8): 6546-53.
- 206 - Lenardo, M. J., C. M. Fan, et al. (1989). "The involvement of NF-kappa B in beta-interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction." Cell **57**(2): 287-94.
- 207 - Lenschow, D. J., C. Lai, et al. (2007). "IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(4): 1371-6.
- 208 - Leo, Y. S., A. L. Chow, et al. (2009). "Chikungunya outbreak, Singapore, 2008." Emerg Infect Dis **15**(5): 836-7.
- 209 - Levine, B., J. M. Hardwick, et al. (1994). "Persistence of alphaviruses in vertebrate hosts." Trends Microbiol **2**(1): 25-8.
- 210 - Levitt, N. H., H. H. Ramsburg, et al. (1986). "Development of an attenuated strain of chikungunya virus for use in vaccine production." Vaccine **4**(3): 157-62.
- 211 - Levraud, J. P., P. Boudinot, et al. (2007). "Identification of the zebrafish IFN receptor: implications for the origin of the vertebrate IFN system." J Immunol **178**(7): 4385-94.
- 212 - Levy, O. (2007). "Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates." Nat Rev Immunol **7**(5): 379-90.
- 213 - Lewthwaite, P., R. Vasanthapuram, et al. (2009). "Chikungunya virus and central nervous system infections in children, India." Emerg Infect Dis **15**(2): 329-31.
- 214 - Li, M. L. and V. Stollar (2004). "Alphaviruses and apoptosis." Int Rev Immunol **23**(1-2): 7-24.

- 215 - Lidbury, B. A., N. E. Rulli, et al. (2008). "Macrophage-derived proinflammatory factors contribute to the development of arthritis and myositis after infection with an arthrogenic alphavirus." J Infect Dis **197**(11): 1585-93.
- 216 - Lidbury, B. A., C. Simeonovic, et al. (2000). "Macrophage-induced muscle pathology results in morbidity and mortality for Ross River virus-infected mice." J Infect Dis **181**(1): 27-34.
- 217 - Linn, M. L., J. G. Aaskov, et al. (1996). "Antibody-dependent enhancement and persistence in macrophages of an arbovirus associated with arthritis." J Gen Virol **77** ( Pt 3): 407-11.
- 218 - Linn, M. L., L. Mateo, et al. (1998). "Alphavirus-specific cytotoxic T lymphocytes recognize a cross-reactive epitope from the capsid protein and can eliminate virus from persistently infected macrophages." J Virol **72**(6): 5146-53.
- 219 - Lounibos, L. P. (2002). "Invasions by insect vectors of human disease." Annu Rev Entomol **47**: 233-66.
- 220 - Lounibos, L. P., O'Meara GF, Escher RL, Nishimura N, Cutwa M, Nelson T, Campos RE, Juliano SA. (2001). "Testing prediction of displacement of native Aedes by the invasive Asian Tiger Mosquito Aedes albopictus in Florida, USA." Biol Invasions **3**: 151-166.
- 221 - Lourenco-de-Oliveira, R., M. G. Castro, et al. (2004). "The invasion of urban forest by dengue vectors in Rio de Janeiro." J Vector Ecol **29**(1): 94-100.
- 222 - Lu, Y. E., T. Cassese, et al. (1999). "The cholesterol requirement for sindbis virus entry and exit and characterization of a spike protein region involved in cholesterol dependence." J Virol **73**(5): 4272-8.
- 223 - Luers, A. J., S. D. Adams, et al. (2005). "A phylogenomic study of the genus Alphavirus employing whole genome comparison." Comp Funct Genomics **6**(4): 217-27.

- 224 - Lumsden, W. H. (1955). "An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology." Trans R Soc Trop Med Hyg **49**(1): 33-57.
- 225 - Luster, A. D. (1998). "Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation." N Engl J Med **338**(7): 436-45.
- 226 - Mackenzie, J. S., K. B. Chua, et al. (2001). "Emerging viral diseases of Southeast Asia and the Western Pacific." Emerg Infect Dis **7**(3 Suppl): 497-504.
- 227 - Mahalingam, S. and B. A. Lidbury (2002). "Suppression of lipopolysaccharide-induced antiviral transcription factor (STAT-1 and NF-kappa B) complexes by antibody-dependent enhancement of macrophage infection by Ross River virus." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(21): 13819-24.
- 228 - Mahesh, G., A. Giridhar, et al. (2009). "A case of bilateral presumed chikungunya neuroretinitis." Indian J Ophthalmol **57**(2): 148-50.
- 229 - Malvy, D., K. Ezzedine, et al. (2009). "Destructive arthritis in a patient with chikungunya virus infection with persistent specific IgM antibodies." BMC Infect Dis **9**: 200.
- 230 - Mamane, Y., C. Heylbroeck, et al. (1999). "Interferon regulatory factors: the next generation." Gene **237**(1): 1-14.
- 231 - Manimunda, S. P., P. Vijayachari, et al. (2010). "Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging." Trans R Soc Trop Med Hyg **104**(6): 392-9.
- 232 - Marchette, N. J., A. Rudnick, et al. (1978). "Alphaviruses in Peninsular Malaysia: I. Virus isolations and animal serology." Southeast Asian J Trop Med Public Health **9**(3): 317-29.
- 233 - Mateo, L., M. La Linn, et al. (2000). "An arthrogenic alphavirus induces monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8." Intervirology **43**(1): 55-60.

- 234 - Mavalankar, D., P. Shastri, et al. (2007). "Chikungunya epidemic in India: a major public-health disaster." Lancet Infect Dis **7**(5): 306-7.
- 235 - Mazaud, R., J. J. Salaun, et al. (1971). "[Acute neurologic and sensorial disorders in dengue and Chikungunya fever]." Bull Soc Pathol Exot Filiales **64**(1): 22-30.
- 236 - McCarthy, M. C., R. L. Haberberger, et al. (1996). "Evaluation of arthropod-borne viruses and other infectious disease pathogens as the causes of febrile illnesses in the Khartoum Province of Sudan." J Med Virol **48**(2): 141-6.
- 237 - McCartney, S. A. and M. Colonna (2009). "Viral sensors: diversity in pathogen recognition." Immunol Rev **227**(1): 87-94.
- 238 - McCrae, A. W., B. E. Henderson, et al. (1971). "Chikungunya virus in the Entebbe area of Uganda: isolations and epidemiology." Trans R Soc Trop Med Hyg **65**(2): 152-68.
- 239 - McGill, P. E. (1995). "Viral infections: alpha-viral arthropathy." Baillieres Clin Rheumatol **9**(1): 145-50.
- 240 - McGuire, T. C., D. S. Adams, et al. (1986). "Acute arthritis in caprine arthritis-encephalitis virus challenge exposure of vaccinated or persistently infected goats." Am J Vet Res **47**(3): 537-40.
- 241 - McIntosh, B. M., R. M. Harwin, et al. (1963). "An Epidemic of Chikungunya in South-Eastern Southern Rhodesia." Cent Afr J Med **43**: 351-9.
- 242 - Melville, M. W., W. J. Hansen, et al. (1997). "The molecular chaperone hsp40 regulates the activity of P58IPK, the cellular inhibitor of PKR." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(1): 97-102.
- 243 - Meurs, E., K. Chong, et al. (1990). "Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon." Cell **62**(2): 379-90.
- 244 - Meyer, B. J. and P. J. Southern (1997). "A novel type of defective viral genome suggests a unique strategy to establish and maintain persistent lymphocytic choriomeningitis virus infections." J Virol **71**(9): 6757-64.

- 245 - Mi, S., R. Durbin, et al. (1989). "Association of the Sindbis virus RNA methyltransferase activity with the nonstructural protein nsP1." Virology **170**(2): 385-91.
- 246 - Mims, C. A., F. A. Murphy, et al. (1973). "Pathogenesis of Ross River virus infection in mice. I. Ependymal infection, cortical thinning, and hydrocephalus." J Infect Dis **127**(2): 121-8.
- 247 - Moore, C. G. and B. R. Fisher (1969). "Competition in mosquitoes. Density and species ratio effects on growth, mortality, fecundity, and production of growth retardant." Ann Entomol Soc Am **62**(6): 1325-31.
- 248 - Moore, C. G. and C. J. Mitchell (1997). "Aedes albopictus in the United States: ten-year presence and public health implications." Emerg Infect Dis **3**(3): 329-34.
- 249 - Moore, D. L., S. Reddy, et al. (1974). "An epidemic of chikungunya fever at Ibadan, Nigeria, 1969." Ann Trop Med Parasitol **68**(1): 59-68.
- 250 - Moretta, L., C. Bottino, et al. (2002). "Human natural killer cells: their origin, receptors and function." Eur J Immunol **32**(5): 1205-11.
- 251 - Morrison, T. E., R. J. Fraser, et al. (2007). "Complement contributes to inflammatory tissue destruction in a mouse model of Ross River virus-induced disease." J Virol **81**(10): 5132-43.
- 252 - Morrison, T. E., A. C. Whitmore, et al. (2006). "Characterization of Ross River virus tropism and virus-induced inflammation in a mouse model of viral arthritis and myositis." J Virol **80**(2): 737-49.
- 253 - Moser, B. and K. Willmann (2004). "Chemokines: role in inflammation and immune surveillance." Ann Rheum Dis **63 Suppl 2**: ii84-ii89.
- 254 - Murphy, F. A., W. P. Taylor, et al. (1973). "Pathogenesis of Ross River virus infection in mice. II. Muscle, heart, and brown fat lesions." J Infect Dis **127**(2): 129-38.
- 255 - Muthumani, K., K. M. Lankaraman, et al. (2008). "Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against Chikungunya virus." Vaccine **26**(40): 5128-34.

- 256 - Muyembe-Tamfum, J. J., C. N. Peyrefitte, et al. (2003). "[Epidemic of Chikungunya virus in 1999 and 200 in the Democratic Republic of the Congo]." Med Trop (Mars) **63**(6): 637-8.
- 257 - Myers, R. M. and D. E. Carey (1967). "Concurrent isolation from patient of two arboviruses, Chikungunya and dengue type 2." Science **157**(794): 1307-8.
- 258 - Myles, K. M., C. L. Kelly, et al. (2006). "Effects of an opal termination codon preceding the nsP4 gene sequence in the O'Nyong-Nyong virus genome on *Anopheles gambiae* infectivity." J Virol **80**(10): 4992-7.
- 259 - Nagata, S. (2000). "Apoptotic DNA fragmentation." Exp Cell Res **256**(1): 12-8.
- 260 - Nakoune, E., C. Finance, et al. (2007). "[The Chikungunya virus]." Ann Biol Clin (Paris) **65**(4): 349-56.
- 261 - Nawrocki, S. J. and W. A. Hawley (1987). "Estimation of the northern limits of distribution of *Aedes albopictus* in North America." J Am Mosq Control Assoc **3**(2): 314-7.
- 262 - Ng, L. F., A. Chow, et al. (2009). "IL-1beta, IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity." PLoS One **4**(1): e4261.
- 263 - Nguyen, L. H., L. Espert, et al. (2001). "The human interferon- and estrogen-regulated ISG20/HEM45 gene product degrades single-stranded RNA and DNA in vitro." Biochemistry **40**(24): 7174-9.
- 264 - Niebylski, M. L., H. M. Savage, et al. (1994). "Blood hosts of *Aedes albopictus* in the United States." J Am Mosq Control Assoc **10**(3): 447-50.
- 265 - Nimmannitya, S., S. B. Halstead, et al. (1969). "Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. I. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever." Am J Trop Med Hyg **18**(6): 954-71.
- 266 - Novick, D., B. Cohen, et al. (1994). "The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning." Cell **77**(3): 391-400.

- 267 - O'Brien, L. (2007). "Inhibition of multiple strains of Venezuelan equine encephalitis virus by a pool of four short interfering RNAs." Antiviral Res **75**(1): 20-9.
- 268 - O'Neill, L. A. and A. G. Bowie (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **7**(5): 353-64.
- 269 - Olaleye, O. D., L. A. Oladosu, et al. (1989). "Complement fixing antibodies against arboviruses in horses at Lagos, Nigeria." Rev Elev Med Vet Pays Trop **42**(3): 321-5.
- 270 - Oldstone, M. B. (1998). "Viral persistence: mechanisms and consequences." Curr Opin Microbiol **1**(4): 436-41.
- 271 - Olsen, C. W., W. V. Corapi, et al. (1992). "Monoclonal antibodies to the spike protein of feline infectious peritonitis virus mediate antibody-dependent enhancement of infection of feline macrophages." J Virol **66**(2): 956-65.
- 272 - Olsen, G. H., M. J. Turell, et al. (1997). "Efficacy of eastern equine encephalitis immunization in whooping cranes." J Wildl Dis **33**(2): 312-5.
- 273 - Onoguchi, K., M. Yoneyama, et al. (2007). "Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism." J Biol Chem **282**(10): 7576-81.
- 274 - Ordemann, R., R. Hutchinson, et al. (2002). "Enhanced allostimulatory activity of host antigen-presenting cells in old mice intensifies acute graft-versus-host disease." J Clin Invest **109**(9): 1249-56.
- 275 - Osiak, A., O. Utermohlen, et al. (2005). "ISG15, an interferon-stimulated ubiquitin-like protein, is not essential for STAT1 signaling and responses against vesicular stomatitis and lymphocytic choriomeningitis virus." Mol Cell Biol **25**(15): 6338-45.
- 276 - Osterrieth, P., P. Deleplanque-Liegeois, et al. (1960). "[Research on the Chikungunya virus in the Belgian Congo. II. Serological investigation.]" Ann Soc Belg Med Trop (1920) **40**: 205-13.

- 277 - Owen, K. E. and R. J. Kuhn (1996). "Identification of a region in the Sindbis virus nucleocapsid protein that is involved in specificity of RNA encapsidation." J Virol **70**(5): 2757-63.
- 278 - Owen, K. E. and R. J. Kuhn (1997). "Alphavirus budding is dependent on the interaction between the nucleocapsid and hydrophobic amino acids on the cytoplasmic domain of the E2 envelope glycoprotein." Virology **230**(2): 187-96.
- 279 - Ozato, K., D. M. Shin, et al. (2008). "TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity." Nat Rev Immunol **8**(11): 849-60.
- 280 - Ozden, S., M. Lucas-Hourani, et al. (2008). "Inhibition of Chikungunya virus infection in cultured human muscle cells by furin inhibitors: impairment of the maturation of the E2 surface glycoprotein." J Biol Chem **283**(32): 21899-908.
- 281 - Padbidri, V. S. and T. T. Gnaneswar (1979). "Epidemiological investigations of chikungunya epidemic at Barsi, Maharashtra state, India." J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol **23**(4): 445-51.
- 282 - Panning, M., K. Grywna, et al. (2008). "Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006." Emerg Infect Dis **14**(3): 416-22.
- 283 - Paquet, C., I. Quatresous, et al. (2006). "Chikungunya outbreak in Reunion: epidemiology and surveillance, 2005 to early January 2006." Euro Surveill **11**(2): E060202 3.
- 284 - Pardigon, N. (2009). "The biology of chikungunya: a brief review of what we still do not know." Pathol Biol (Paris) **57**(2): 127-32.
- 285 - Parola, P., X. de Lamballerie, et al. (2006). "Novel chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands." Emerg Infect Dis **12**(10): 1493-9.
- 286 - Parrott, M. M., S. A. Sitariski, et al. (2009). "Role of conserved cysteines in the alphavirus E3 protein." J Virol **83**(6): 2584-91.



- 287 - Pastorino, B., M. Bessaud, et al. (2005). "Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses." J Virol Methods **124**(1-2): 65-71.
- 288 - Pastorino, B., J. J. Muyembe-Tamfum, et al. (2004). "Epidemic resurgence of Chikungunya virus in democratic Republic of the Congo: identification of a new central African strain." J Med Virol **74**(2): 277-82.
- 289 - Paul, S. D. and K. R. Singh (1968). "Experimental infection of *Macaca radiata* with Chikungunya virus and transmission of virus by mosquitoes." Indian J Med Res **56**(6): 802-11.
- 290 - Paupy, C., H. Delatte, et al. (2009). "Aedes albopictus, an arbovirus vector: from the darkness to the light." Microbes Infect **11**(14-15): 1177-85.
- 291 - Paz, S., Q. Sun, et al. (2006). "Induction of IRF-3 and IRF-7 phosphorylation following activation of the RIG-I pathway." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **52**(1): 17-28.
- 292 - Pestka, S., C. D. Krause, et al. (2004). "Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors." Immunol Rev **202**: 8-32.
- 293 - Peyrefitte, C. N., D. Rousset, et al. (2007). "Chikungunya virus, Cameroon, 2006." Emerg Infect Dis **13**(5): 768-71.
- 294 - Pfeffer, M., R. M. Kinney, et al. (1998). "The alphavirus 3'-nontranslated region: size heterogeneity and arrangement of repeated sequence elements." Virology **240**(1): 100-8.
- 295 - Pfeffer, M., Loescher, T (2006). "Cases of chikungunya imported into Europe." Eurosurveillance March **16**.
- 296 - Phalen, T. and M. Kielian (1991). "Cholesterol is required for infection by Semliki Forest virus." J Cell Biol **112**(4): 615-23.
- 297 - Pialoux, G., B. A. Gauzere, et al. (2007). "Chikungunya, an epidemic arbovirolosis." Lancet Infect Dis **7**(5): 319-27.

- 298 - Pichlmair, A. and C. Reis e Sousa (2007). "Innate recognition of viruses." Immunity **27**(3): 370-83.
- 299 - Pletnev, S. V., W. Zhang, et al. (2001). "Locations of carbohydrate sites on alphavirus glycoproteins show that E1 forms an icosahedral scaffold." Cell **105**(1): 127-36.
- 300 - Plumet, S., F. Herschke, et al. (2007). "Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response." PLoS One **2**(3): e279.
- 301 - Polson, A. G. and B. L. Bass (1994). "Preferential selection of adenosines for modification by double-stranded RNA adenosine deaminase." Embo J **13**(23): 5701-11.
- 302 - Porter, K. R., R. Tan, et al. (2004). "A serological study of Chikungunya virus transmission in Yogyakarta, Indonesia: evidence for the first outbreak since 1982." Southeast Asian J Trop Med Public Health **35**(2): 408-15.
- 303 - Powers, A. M., A. C. Brault, et al. (2001). "Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses." J Virol **75**(21): 10118-31.
- 304 - Powers, A. M., A. C. Brault, et al. (2000). "Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships." J Gen Virol **81**(Pt 2): 471-9.
- 305 - Powers, A. M. and C. H. Logue (2007). "Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus." J Gen Virol **88**(Pt 9): 2363-77.
- 306 - Prashant, S., A. S. Kumar, et al. (2009). "Cutaneous manifestations in patients suspected of chikungunya disease." Indian J Dermatol **54**(2): 128-31.
- 307 - Prevention., C. f. D. C. a. (2006). "Chikungunya fever diagnosed among international travelers - United States, 2005-2006." MMWR Morb Mortal WKLY REP **55**: 1040-2.
- 308 - Ramful, D., M. Carbonnier, et al. (2007). "Mother-to-child transmission of Chikungunya virus infection." Pediatr Infect Dis J **26**(9): 811-5.

- 309 - Ramshaw, I. A., A. J. Ramsay, et al. (1997). "Cytokines and immunity to viral infections." Immunol Rev **159**: 119-35.
- 310 - Ravetch, J. V. and R. A. Clynes (1998). "Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo." Annu Rev Immunol **16**: 421-32.
- 311 - Reiter, P., D. Fontenille, et al. (2006). "Aedes albopictus as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem?" Lancet Infect Dis **6**(8): 463-4.
- 312 - Reiter, P. and D. Sprenger (1987). "The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes." J Am Mosq Control Assoc **3**(3): 494-501.
- 313 - Renaudet, J., C. Jan, et al. (1978). "[A serological survey of arboviruses in the human population of Senegal]." Bull Soc Pathol Exot Filiales **71**(2): 131-40.
- 314 - Renault, P., J. L. Solet, et al. (2007). "A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006." Am J Trop Med Hyg **77**(4): 727-31.
- 315 - Rezza, G., L. Nicoletti, et al. (2007). "Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region." Lancet **370**(9602): 1840-6.
- 316 - Rice, C. M. and J. H. Strauss (1981). "Nucleotide sequence of the 26S mRNA of Sindbis virus and deduced sequence of the encoded virus structural proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(4): 2062-6.
- 317 - Richards, S. L., L. Ponnusamy, et al. (2006). "Host-feeding patterns of Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) in relation to availability of human and domestic animals in suburban landscapes of central North Carolina." J Med Entomol **43**(3): 543-51.
- 318 - Rikonen, M., J. Peranen, et al. (1992). "Nuclear and nucleolar targeting signals of Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2." Virology **189**(2): 462-73.
- 319 - Rinaldo, C. R., Jr., J. C. Overall, Jr., et al. (1975). "Viral replication and interferon production in fetal and adult ovine leukocytes and spleen cells." Infect Immun **12**(5): 1070-7.

- 320 - Robillard, P. Y., B. Boumahni, et al. (2006). "[Vertical maternal fetal transmission of the chikungunya virus. Ten cases among 84 pregnant women]." Presse Med **35**(5 Pt 1): 785-8.
- 321 - Robin, S., D. Ramful, et al. (2008). "Neurologic manifestations of pediatric chikungunya infection." J Child Neurol **23**(9): 1028-35.
- 322 - Robin, S., D. Ramful, et al. (2010). "Severe bullous skin lesions associated with Chikungunya virus infection in small infants." Eur J Pediatr **169**(1): 67-72.
- 323 - Robinson, M. C. (1955). "An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features." Trans R Soc Trop Med Hyg **49**(1): 28-32.
- 324 - Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." Blood **90**(3): 909-28.
- 325 - Ross, R. W. (1956). "The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic." J Hyg (Lond) **54**(2): 177-91.
- 326 - Rowell, J. F. and D. E. Griffin (1999). "The inflammatory response to nonfatal Sindbis virus infection of the nervous system is more severe in SJL than in BALB/c mice and is associated with low levels of IL-4 mRNA and high levels of IL-10-producing CD4+ T cells." J Immunol **162**(3): 1624-32.
- 327 - Rowell, J. F. and D. E. Griffin (2002). "Contribution of T cells to mortality in neurovirulent Sindbis virus encephalomyelitis." J Neuroimmunol **127**(1-2): 106-14.
- 328 - Rulli, N. E., J. Melton, et al. (2007). "The molecular and cellular aspects of arthritis due to alphavirus infections: lesson learned from Ross River virus." Ann N Y Acad Sci **1102**: 96-108.
- 329 - Rulli, N. E., A. Suhrbier, et al. (2005). "Ross River virus: molecular and cellular aspects of disease pathogenesis." Pharmacol Ther **107**(3): 329-42.
- 330 - Ryman, K. D. and W. B. Klimstra (2008). "Host responses to alphavirus infection." Immunol Rev **225**: 27-45.

- 331 - Ryman, K. D., W. B. Klimstra, et al. (2000). "Alpha/beta interferon protects adult mice from fatal Sindbis virus infection and is an important determinant of cell and tissue tropism." J Virol **74**(7): 3366-78.
- 332 - Sabbah, A., T. H. Chang, et al. (2009). "Activation of innate immune antiviral responses by Nod2." Nat Immunol **10**(10): 1073-80.
- 333 - Sadler, A. J. and B. R. Williams (2008). "Interferon-inducible antiviral effectors." Nat Rev Immunol **8**(7): 559-68.
- 334 - Salvan, M. and J. Mouchet (1994). "[Aedes albopictus and Aedes aegypti at Ile de la Reunion]." Ann Soc Belg Med Trop **74**(4): 323-6.
- 335 - Sammels, L. M., M. D. Lindsay, et al. (1999). "Geographic distribution and evolution of Sindbis virus in Australia." J Gen Virol **80** ( Pt 3): 739-48.
- 336 - Samson, M., Aubry F, Parmentier M (1999). "Que sont les chimiokines ?" Médecine/Sciences **15**: 966-973.
- 337 - Sarid, R., T. Ben-Moshe, et al. (2001). "vFLIP protects PC-12 cells from apoptosis induced by Sindbis virus: implications for the role of TNF-alpha." Cell Death Differ **8**(12): 1224-31.
- 338 - Sarid, R., T. Sato, et al. (1997). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional bcl-2 homologue." Nat Med **3**(3): 293-8.
- 339 - Savill, J., I. Dransfield, et al. (2002). "A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses." Nat Rev Immunol **2**(12): 965-75.
- 340 - Schilte, C., T. Couderc, et al. (2010). "Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells." J Exp Med **207**(2): 429-42.
- 341 - Scholte, E., Schaffner F. (2007). Waiting the tiger : establishment and spread of the Aedes albopictus mosquito in Europe, in: Emerging Pests and Vector-Borne Disease in europe. The Netherlands.

- 342 - Schuffenecker, I., I. Iteman, et al. (2006). "Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak." PLoS Med **3**(7): e263.
- 343 - Schwartz, O. and M. L. Albert (2010). "Biology and pathogenesis of chikungunya virus." Nat Rev Microbiol **8**(7): 491-500.
- 344 - Sergon, K., C. Njuguna, et al. (2008). "Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004." Am J Trop Med Hyg **78**(2): 333-7.
- 345 - Sergon, K., A. A. Yahaya, et al. (2007). "Seroprevalence of Chikungunya virus infection on Grande Comore Island, union of the Comoros, 2005." Am J Trop Med Hyg **76**(6): 1189-93.
- 346 - Shah, K. V., C. J. Gibbs, Jr., et al. (1964). "Virological Investigation of the Epidemic of Haemorrhagic Fever in Calcutta: Isolation of Three Strains of Chikungunya Virus." Indian J Med Res **52**: 676-83.
- 347 - Sharma, A., B. Bhattacharya, et al. (2008). "Venezuelan equine encephalitis virus infection causes modulation of inflammatory and immune response genes in mouse brain." BMC Genomics **9**: 289.
- 348 - Sheppard, P., W. Kindsvogel, et al. (2003). "IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R." Nat Immunol **4**(1): 63-8.
- 349 - Shu, P. Y., C. F. Yang, et al. (2008). "Two imported chikungunya cases, Taiwan." Emerg Infect Dis **14**(8): 1326-7.
- 350 - Sidenko, V. P., L. D. Stepankovskaia, et al. (1974). "[Results of a study of West Nile fever in the South of the European part of the USSR]." Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol **00**(5): 129.
- 351 - Simizu, B., K. Yamamoto, et al. (1984). "Structural proteins of Chikungunya virus." J Virol **51**(1): 254-8.
- 352 - Simmons, J. D., L. J. White, et al. (2009). "Venezuelan equine encephalitis virus disrupts STAT1 signaling by distinct mechanisms independent of host shutoff." J Virol **83**(20): 10571-81.

- 353 - Simon, F., P. Parola, et al. (2007). "Chikungunya infection: an emerging rheumatism among travelers returned from Indian Ocean islands. Report of 47 cases." Medicine (Baltimore) **86**(3): 123-37.
- 354 - Simpson, D. A., N. L. Davis, et al. (1996). "Complete nucleotide sequence and full-length cDNA clone of S.A.AR86 a South African alphavirus related to Sindbis." Virology **222**(2): 464-9.
- 355 - Sissoko, D., D. Malvy, et al. (2009). "Post-epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period." PLoS Negl Trop Dis **3**(3): e389.
- 356 - Sissoko, D., A. Moendandze, et al. (2008). "Seroprevalence and risk factors of chikungunya virus infection in Mayotte, Indian Ocean, 2005-2006: a population-based survey." PLoS One **3**(8): e3066.
- 357 - Sklan, E. H., P. Charuorn, et al. (2009). "Mechanisms of HCV survival in the host." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **6**(4): 217-27.
- 358 - Soden, M., H. Vasudevan, et al. (2000). "Detection of viral ribonucleic acid and histologic analysis of inflamed synovium in Ross River virus infection." Arthritis Rheum **43**(2): 365-9.
- 359 - Solanki, B. S., S. C. Arya, et al. (2007). "Chikungunya disease with nephritic presentation." Int J Clin Pract **61**(11): 1941.
- 360 - Solignat, M., B. Gay, et al. (2009). "Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus." Virology **393**(2): 183-97.
- 361 - Sourisseau, M., C. Schilte, et al. (2007). "Characterization of reemerging chikungunya virus." PLoS Pathog **3**(6): e89.
- 362 - Strauss, J. H. and E. G. Strauss (1994). "The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution." Microbiol Rev **58**(3): 491-562.

- 363 - Subak-Sharpe, I., H. Dyson, et al. (1993). "In vivo depletion of CD8+ T cells prevents lesions of demyelination in Semliki Forest virus infection." J Virol **67**(12): 7629-33.
- 364 - Suhrbier, A. and M. La Linn (2004). "Clinical and pathologic aspects of arthritis due to Ross River virus and other alphaviruses." Curr Opin Rheumatol **16**(4): 374-9.
- 365 - Suopanki, J., D. L. Sawicki, et al. (1998). "Regulation of alphavirus 26S mRNA transcription by replicase component nsP2." J Gen Virol **79** ( Pt 2): 309-19.
- 366 - Takada, A. and Y. Kawaoka (2003). "Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and in vivo implications." Rev Med Virol **13**(6): 387-98.
- 367 - Takahashi, K., T. Kawai, et al. (2006). "Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA." J Immunol **176**(8): 4520-4.
- 368 - Takahasi, K., M. Yoneyama, et al. (2008). "Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses." Mol Cell **29**(4): 428-40.
- 369 - Takeuchi, O. and S. Akira (2007). "Recognition of viruses by innate immunity." Immunol Rev **220**: 214-24.
- 370 - Takeuchi, O. and S. Akira (2009). "Innate immunity to virus infection." Immunol Rev **227**(1): 75-86.
- 371 - Talarmin, F., F. Staikowsky, et al. (2007). "[Skin and mucosal manifestations of chikungunya virus infection in adults in Reunion Island]." Med Trop (Mars) **67**(2): 167-73.
- 372 - Tandale, B. V., P. S. Sathe, et al. (2009). "Systemic involvements and fatalities during Chikungunya epidemic in India, 2006." J Clin Virol **46**(2): 145-9.
- 373 - Tassaneeritthep, B., T. H. Burgess, et al. (2003). "DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells." J Exp Med **197**(7): 823-9.
- 374 - Taubitz, W., J. P. Cramer, et al. (2007). "Chikungunya fever in travelers: clinical presentation and course." Clin Infect Dis **45**(1): e1-4.



- 375 - Teodoro, J. G. and P. E. Branton (1997). "Regulation of apoptosis by viral gene products." J Virol **71**(3): 1739-46.
- 376 - Tesh, R. B. (1982). "Arthritides caused by mosquito-borne viruses." Annu Rev Med **33**: 31-40.
- 377 - Tesh, R. B. and D. J. Gubler (1975). "Laboratory studies of transovarial transmission of La Crosse and other arboviruses by *Aedes albopictus* and *Culex fatigans*." Am J Trop Med Hyg **24**(5): 876-80.
- 378 - Toivanen, A. (2008). "Alphaviruses: an emerging cause of arthritis?" Curr Opin Rheumatol **20**(4): 486-90.
- 379 - Touret, Y., H. Randrianaivo, et al. (2006). "[Early maternal-fetal transmission of the Chikungunya virus]." Presse Med **35**(11 Pt 1): 1656-8.
- 380 - Town, T., F. Bai, et al. (2009). "Toll-like receptor 7 mitigates lethal West Nile encephalitis via interleukin 23-dependent immune cell infiltration and homing." Immunity **30**(2): 242-53.
- 381 - Traore-Lamizana, M., D. Fontenille, et al. (1996). "Surveillance for yellow fever virus in eastern Senegal during 1993." J Med Entomol **33**(5): 760-5.
- 382 - Trinchieri, G., D. Granato, et al. (1981). "Interferon-induced resistance of fibroblasts to cytolysis mediated by natural killer cells: specificity and mechanism." J Immunol **126**(1): 335-40.
- 383 - Tsetsarkin, K. A., D. L. Vanlandingham, et al. (2007). "A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential." PLoS Pathog **3**(12): e201.
- 384 - Tuittila, M. and A. E. Hinkkanen (2003). "Amino acid mutations in the replicase protein nsP3 of Semliki Forest virus cumulatively affect neurovirulence." J Gen Virol **84**(Pt 6): 1525-33.
- 385 - Turell, M. J., T. P. Gargan, 2nd, et al. (1984). "Replication and dissemination of Rift Valley fever virus in *Culex pipiens*." Am J Trop Med Hyg **33**(1): 176-81.

- 386 - Unterholzner, L. and A. G. Bowie (2008). "The interplay between viruses and innate immune signaling: recent insights and therapeutic opportunities." Biochem Pharmacol **75**(3): 589-602.
- 387 - Vashishtha, M., T. Phalen, et al. (1998). "A single point mutation controls the cholesterol dependence of Semliki Forest virus entry and exit." J Cell Biol **140**(1): 91-9.
- 388 - Vasiljeva, L., A. Merits, et al. (2000). "Identification of a novel function of the alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2." J Biol Chem **275**(23): 17281-7.
- 389 - Vazeille, M., S. Moutailler, et al. (2007). "Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*." PLoS One **2**(11): e1168.
- 390 - Vihinen, H., T. Ahola, et al. (2001). "Elimination of phosphorylation sites of Semliki Forest virus replicase protein nsP3." J Biol Chem **276**(8): 5745-52.
- 391 - Waarts, B. L., R. Bittman, et al. (2002). "Sphingolipid and cholesterol dependence of alphavirus membrane fusion. Lack of correlation with lipid raft formation in target liposomes." J Biol Chem **277**(41): 38141-7.
- 392 - Wachter, C., M. Muller, et al. (2007). "Coordinated regulation and widespread cellular expression of interferon-stimulated genes (ISG) ISG-49, ISG-54, and ISG-56 in the central nervous system after infection with distinct viruses." J Virol **81**(2): 860-71.
- 393 - Wagner, R. R. (1964). "Inhibition of Interferon Biosynthesis by Actinomycin D." Nature **204**: 49-51.
- 394 - Wang, E., E. Volkova, et al. (2008). "Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya." Vaccine **26**(39): 5030-9.
- 395 - Wang, H. L., J. O'Rear, et al. (1996). "Mutagenesis of the Sindbis virus nsP1 protein: effects on methyltransferase activity and viral infectivity." Virology **217**(2): 527-31.

- 396 - Wang, K. S., R. J. Kuhn, et al. (1992). "High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells." J Virol **66**(8): 4992-5001.
- 397 - Wang, Y. F., S. G. Sawicki, et al. (1994). "Alphavirus nsP3 functions to form replication complexes transcribing negative-strand RNA." J Virol **68**(10): 6466-75.
- 398 - Watson, R. (2007). "Europe witnesses first local transmission of chikungunya fever in Italy." Bmj **335**(7619): 532-3.
- 399 - Way, S. J., B. A. Lidbury, et al. (2002). "Persistent Ross River virus infection of murine macrophages: an in vitro model for the study of viral relapse and immune modulation during long-term infection." Virology **301**(2): 281-92.
- 400 - Weaver, S. C. and A. D. Barrett (2004). "Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease." Nat Rev Microbiol **2**(10): 789-801.
- 401 - Weaver, S. C., W. Kang, et al. (1997). "Recombinational history and molecular evolution of western equine encephalomyelitis complex alphaviruses." J Virol **71**(1): 613-23.
- 402 - Weiss, B., H. Nitschko, et al. (1989). "Evidence for specificity in the encapsidation of Sindbis virus RNAs." J Virol **63**(12): 5310-8.
- 403 - Welsh, R. M. and R. S. Fujinami (2007). "Pathogenic epitopes, heterologous immunity and vaccine design." Nat Rev Microbiol **5**(7): 555-63.
- 404 - West, J. and D. T. Brown (2006). "Role of a conserved tripeptide in the endodomain of Sindbis virus glycoprotein E2 in virus assembly and function." J Gen Virol **87**(Pt 3): 657-64.
- 405 - Weston, J. H., M. D. Welsh, et al. (1999). "Salmon pancreas disease virus, an alphavirus infecting farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L." Virology **256**(2): 188-95.
- 406 - Wielanek, A. C., J. D. Monredon, et al. (2007). "Guillain-Barre syndrome complicating a Chikungunya virus infection." Neurology **69**(22): 2105-7.
- 407 - Wolfe, N. D., A. M. Kilbourn, et al. (2001). "Sylvatic transmission of arboviruses among Bornean orangutans." Am J Trop Med Hyg **64**(5-6): 310-6.

- 408 - Yoneyama, M. and T. Fujita (2008). "Structural mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors." Immunity **29**(2): 178-81.
- 409 - Yoneyama, M. and T. Fujita (2009). "RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors." Immunol Rev **227**(1): 54-65.
- 410 - Yoneyama, M., M. Kikuchi, et al. (2005). "Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity." J Immunol **175**(5): 2851-8.
- 411 - Yoneyama, M., M. Kikuchi, et al. (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." Nat Immunol **5**(7): 730-7.
- 412 - Yoosuf, A. A., I. Shiham, et al. (2009). "First report of chikungunya from the Maldives." Trans R Soc Trop Med Hyg **103**(2): 192-6.
- 413 - Zhang, Y., C. W. Burke, et al. (2007). "Identification and characterization of interferon-induced proteins that inhibit alphavirus replication." J Virol **81**(20): 11246-55.
- 414 - Zhao, H., B. Lindqvist, et al. (1994). "A tyrosine-based motif in the cytoplasmic domain of the alphavirus envelope protein is essential for budding." Embo J **13**(18): 4204-11.
- 415 - Zheng, K., J. Li, et al. (2010). "Genetic analysis of chikungunya viruses imported to mainland China in 2008." Virol J **7**: 8.
- 416 - Zhou, A., J. M. Paranjape, et al. (1999). "Interferon action in triply deficient mice reveals the existence of alternative antiviral pathways." Virology **258**(2): 435-40.
- 417 - Ziegler, S. A., L. Lu, et al. (2008). "An animal model for studying the pathogenesis of chikungunya virus infection." Am J Trop Med Hyg **79**(1): 133-9.

## Résumé:

Chikungunya est un *alphavirus* transmis par les moustiques (*Aedes*) et qui provoque de la fièvre, des éruptions cutanées, des myalgies et des arthralgies. La maladie (CHIKVD) est transitoire, mais des formes sévères menant à des arthrites chroniques incapacitantes ont été signalées.

Nous avons dans un premier temps étudié prospectivement les paramètres cliniques et immunologiques associés à la maladie chez des patients hospitalisés et identifiés comme étant 'guéris' ou 'chronique' à M12 après l'infection. Dans la deuxième partie, nous avons observé *in vitro* les mécanismes et le rôle de l'apoptose dans le processus infectieux permettant au virus de persister dans les sanctuaires tissulaires.

En phase aiguë, une forte réponse immune dominée par une activation des cellules NK/dendritique/cellules T, la production d'anticorps spécifiques et une faible production de cytokines Th1 > Th2 a été observée mais sans aucune différence significative entre les deux groupes. Cependant, la virémie initiale s'est révélée beaucoup plus élevée dans le groupe chronique est nous avons pu identifier du matériel viral dans les macrophages du tissu synovial d'un patient chronique post-CHIKVD (M18).

Dans la deuxième partie de l'étude, nous avons constaté que CHIKV est capable d'induire l'apoptose par la voie intrinsèque et extrinsèque et également par un mécanisme 'bystander'. De plus, nous avons observé que le CHIKV présent dans des corps (blebs) apoptotiques était capable d'infecter les cellules voisines (Hela et macrophage MM6). Notre étude a permis de mettre en évidence pour la première fois que CHIKV contrôle et détourne à son profit les mécanismes de défense anti-infectieux.

Mots- clés : Chikungunya, alphavirus, immunité innée, immunité adaptative, arthrite chronique, apoptose

Summary:

**Physiopathology of chikungunya in acute and chronic stages of the disease in human.**

Chikungunya is an *Alphavirus* transmitted by mosquitoes (*Aedes*) and which causes fever, rash, myalgia and arthralgia. The disease (CHIKVD) is transient but severe forms leading to chronic incapacitating arthritis have been reported.

The study involved first a prospective cohort study of hospitalized patients from Reunion Island subsequently categorized into ‘recovered’ or ‘chronic arthralgia’ groups at M12 post infection. Clinical and immunological parameters were measured throughout the disease course. In part two, we addressed *in vitro* the role of apoptosis in the infection process and particularly to ascertain the mechanisms allowing the virus to persist in tissue sanctuaries.

We observed that a rapid immune antiviral response was evidenced by the robust dendritic/NK//T cell activation and accompanied by a specific IgM/IgG response and a rather weak Th1/Th2 cytokine response in both groups. The viremia was much more pronounced in the chronic group and, critically, we found that CHIKV was persisting (M18) in perivascular synovial macrophages. Fibroblast hyperplasia, strong angiogenesis and acute cell deaths were observed in the injured synovial tissue.

In the second part of the study, we found that CHIKV was able to trigger apoptosis through intrinsic and extrinsic pathways. Bystander apoptosis was also evidenced in neighboring cells in a caspase 8-dependent manner. Remarkably, CHIKV hiding into apoptotic blebs was able to infect neighboring cells and these events were inhibited specifically by inhibitors of caspases, blebbing and engulfment.

We herein describe a novel mechanism by which CHIKV invades and escapes the host immune response and contribute to chronic arthralgia/arthritis.

Keywords : Chikungunya, alphavirus, innate, immunity, adaptive immunity, chronic arthritis,