



HAL
open science

**Rôles de l'Apoptose et de l'Autophagie dans la
physiopathologie du Chikungunya : Sur la voie des
mécanismes cellulaires impliqués dans l'émergence des
Arthralgies chroniques post-infection.**

Pascale Krejbich-Trotot

► **To cite this version:**

Pascale Krejbich-Trotot. Rôles de l'Apoptose et de l'Autophagie dans la physiopathologie du Chikungunya : Sur la voie des mécanismes cellulaires impliqués dans l'émergence des Arthralgies chroniques post-infection.. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université de La Réunion, 2013. tel-04497837

HAL Id: tel-04497837

<https://hal.science/tel-04497837v1>

Submitted on 11 Mar 2024

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.

A Daniel Blangy, disparu en 2005.

A celui qui fut mon Directeur de thèse et initia mon parcours scientifique, mais surtout au Professeur de Biologie Moléculaire qui marqua toute une génération d'étudiants de l'Université Paris VI pour son exceptionnel talent de transmission et pour la faculté rare qui était la sienne de nous donner à tous, la sensation d'être doués d'intelligence.

Je citerai la conclusion de la thèse qu'il soutint en 1968,

Elle fut reprise dans l'hommage qui lui a été rendu par Yannik Andéol et la communauté universitaire en août 2005.

« De la découverte de l'Amérique au débarquement sur la Lune, des alchimistes aux biologistes moléculaires, le chemin parcouru est sans nul doute considérable. Mais les motivations profondes de cette recherche de l'inconnu restent fondamentalement identiques. Au-delà de l'intérêt scientifique proprement dit, c'est, consciemment ou non, la recherche d'une sécurisation et d'une affirmation de l'étendue de son pouvoir qui poussent l'homme à élargir sans cesse le domaine de ses connaissances. Parfois cette démarche peut être une fuite au-delà de l'inquiétude de l'être sur son devenir; mais à plus ou moins long terme elle le ramène inéluctablement face à lui-même, face à ses limites et à ses angoisses. On pourrait taxer ces propos de pessimistes mais à mes yeux il n'en est rien. C'est en effet par un jeu perpétuel de ces dépassements suivis de retours sur soi que l'homme parviendra à acquérir sa pleine dimension. »



UNIVERSITE DE LA REUNION



Mémoire présenté en vue de l'obtention d'une
HABILITATION A DIRIGER LES RECHERCHES

Par

Pascale KREJBICH-TROTOT

Maître de Conférences de la section 65 de Biologie Cellulaire du Conseil National des Universités.

Rattachée pour la partie Recherche au Laboratoire GRI, Groupe de Recherches en Immunopathologie et Maladies Infectieuses. Equipe d'accueil 4517.

Rattachée pour la partie Enseignement à l'UFR Santé de l'Université de La Réunion.

**Rôles de l'Apoptose et de l'Autophagie
dans la physiopathologie du Chikungunya :
Sur la voie des mécanismes cellulaires impliqués dans l'émergence
des Arthralgies chroniques post-infection.**

Soutenue publiquement le 9 décembre 2013

Devant le Jury composé de :

Monsieur Philippe Després, Directeur de Recherches, Institut Pasteur Paris, *Rapporteur*

Monsieur Pierre Roques, Directeur de Recherches, CEA, *Rapporteur*

Madame Marie-Paule Gonthier, Professeur, Université de la Réunion, *Rapporteur*

Monsieur Axel Périanin, Directeur de Recherches, CNRS, *Examineur*

Monsieur Philippe Gasque, Professeur, Université de la Réunion, *Examineur*

Madame Pascale Guiraud Professeur, Université de la Réunion, *Examineur*

PREAMBULE ET REMERCIEMENTS

L'aventure scientifique qui me permet aujourd'hui de faire un passionnant bilan de parcours professionnel n'aurait jamais eu lieu sans des circonstances mêlant, comme bien souvent, événements heureux et contexte plus douloureux.

Le premier événement classé dans les très heureux, bien qu'il m'obligea à mettre entre parenthèses ma carrière d'enseignant chercheur démarrée en 1995 à l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, fut mon installation dans l'un des plus beaux endroits du monde : l'Ile de La Réunion, que j'ai rejointe en 2003 pour y suivre mon conjoint qui venait d'y être muté.

Le deuxième événement, à classer dans la catégorie des épreuves, fut le Chikungunya qui toucha durablement la population réunionnaise à partir de 2005. Pour autant, comme toute crise, l'épidémie à laquelle nous avons dû faire face, entraîna dans son sillage un formidable rassemblement de toutes les bonnes volontés qui souhaitaient se mobiliser pour comprendre les origines de cette maladie réémergente et la physiopathologie de son virus jusque-là bien peu étudiées.

C'est dans ces circonstances que j'ai pu reprendre mes activités d'enseignant chercheur et participer au projet scientifique que je vais relater ici.

L'aventure n'aurait cependant pas été possible sans un élément catalyseur exceptionnel : ma rencontre avec le Professeur Philippe Gasque.

Je profite donc de l'occasion qui m'est donnée pour lui adresser mes plus sincères remerciements, pour la confiance qu'il m'a accordée, pour l'opportunité qu'il m'a donnée de revenir à la Science après 4 années d'interruption et enfin pour le soutien inestimable dont il a fait preuve au cours des nombreuses démarches qu'il aura fallu conduire pour obtenir ma mise à disposition de l'Université de Versailles à celle de La Réunion.

Ces années furent intenses et fertiles, portées par l'enthousiasme et l'énergie jamais démenties des collègues embarqués dans une même envie de percer les mystères du fonctionnement du virus du Chikungunya. Ces collègues du GRI embryonnaire, je tiens évidemment à les remercier ici: Marie-Christine Jaffar-Bandjee, dont la capacité à soulever des montagnes nous aura permis d'obtenir de quoi expérimenter au CHD, même dans les recoins les plus improbables d'un hôpital en démolition..., Jean-Jacques Hoarau, dont l'ingéniosité permanente nous a sorti de bien des situations périlleuses et surtout Mélanie Denizot, pour les fructueux et chaleureux échanges qui ont nourri un quotidien à traquer apoptose et autophagie dans les cellules infectées ou à préparer cours et TD à dispenser aux étudiants de l'Université de La Réunion.

Bien sûr, tout cela a pris forme au fur et à mesure avec le renfort de nouveaux venus : techniciens du laboratoire de Biologie du CHD et je pense en particulier à Ghislaine Li-Pat-Yuen ; aux étudiants que je ne peux tous citer, dont l'encadrement est formidablement moteur et la curiosité source de jouvence.

Merci à Claude Giry qui partage dorénavant mon quotidien à l'hôpital et dont la disponibilité et l'expertise sont très appréciables. Merci également à ceux qui ont constitué le deuxième bras de l'équipe sur le Cyroi.

Je souhaite aussi exprimer ici toute ma gratitude au Dr François Cartault pour l'enrichissante collaboration qu'il m'a proposée et qui m'aura conduite à quitter ponctuellement le champ de l'infectiologie. J'ai été particulièrement honorée qu'il m'ait permis de partager sa passion pour son activité de recherche et très heureuse d'avoir modestement participé, à ses côtés, à la compréhension des effets d'une mutation d'un genre nouveau, affectant un ARN non codant et caractérisant une pathologie génétique réunionnaise rare : le syndrome RAVINE.

Enfin, je remercie vivement les membres du jury.

Tout d'abord, merci à Philippe Després et Pierre Roques de m'avoir fait l'honneur de rapporter ce document.

De même, un grand merci à Axel Périanin d'avoir accepté d'endosser le rôle d'examineur. Merci à vous trois, de consacrer de votre précieux temps à la recherche réunionnaise et de parcourir pour l'occasion les 10 000km qui nous séparent. Votre intérêt et votre soutien à notre équipe depuis le début ainsi que votre implication dans les projets à venir constituent pour moi une vraie source de stimulation et d'encouragements dans la poursuite de mes travaux de recherche.

Merci à Marie-Paule Gonthier qui aura, certes parcouru moins de kilomètres, mais dont je connais la charge de travail. Je lui suis infiniment reconnaissante d'avoir accepté de rapporter mon manuscrit et suis ravie de la compter désormais comme collègue de l'UFR Santé car je sais son énergie et son dynamisme contagieux.

Enfin, je souhaite remercier Pascale Guiraud, directrice de l'UFR de s'investir dans l'examen d'un exercice qui nous aura distraites de la longue rédaction de séries de « questionnaires à choix multiple » qui nous occupe habituellement en cette période de l'année.

Je terminerai en adressant mes pensées les plus affectueuses à Thomas, mon mari, à mon grand Roman, à ma douce princesse Morgane et à mon petit lutin Titouan qui ont accompagné de leur tendre et merveilleuse bienveillance le chemin parcouru et sans qui rien n'aurait eu de sens.

I PRESENTATION DU PARCOURS PROFESSIONNEL

Mon parcours professionnel est depuis le départ celui d'un enseignant-chercheur. J'ai en effet fait partie, en 1993, de la première promotion de doctorants moniteurs qui avaient effectué parallèlement à leur thèse un Monitorat d'Initiation à l'Enseignement Supérieur (de 1989 à 1993). J'ai ainsi toujours été marquée par cette double activité et par les affectations successives liées aux fonctions d'Attaché Temporaire d'Enseignement de Recherches et de Maître de Conférences que j'ai ensuite exercées.

Dans ce parcours, mes activités de recherches peuvent être découpées en quatre blocs thématiques qui m'ont occupés environ quatre années chacun, en lien avec les laboratoires qui m'ont accueillie dans mes fonctions successives.

J'ai ainsi, au cours de ma thèse de doctorat de Microbiologie de l'Université Paris VI, Pierre et Marie Curie, travaillé sous la direction scientifique du Professeur Daniel Blangy à la mise au point d'un modèle d'étude de la transcription aux stades précoces de l'embryogénèse. Le modèle que j'ai développé dans son laboratoire à Villejuif, encadré par le Dr Michel Lacasa, utilisait une région régulatrice de la transcription de type 'enhancer' empruntée au virus Polyome. Des constructions de cette région, insérées en amont d'un gène rapporteur étaient ensuite transfectées dans des cellules de carcinome embryonnaire (F9, PCC4) comme modèles de cellules bloquées à des stades précoces du développement embryonnaire. Une mutagenèse systématique et ciblée de cet enhancer a permis de découvrir des séquences cibles de facteurs transcriptionnels non encore identifiés à l'époque.

J'ai ensuite, dans le cadre d'un poste ATER en Microbiologie obtenu à l'Université Paris VI, intégré le laboratoire de Régulations de l'Expression Génétique dirigé par le Pr Antoine Danchin à l'Institut Pasteur pour y effectuer un stage post-doctoral. J'y ai mené une étude philogénétique des adénylates cyclases d'entérobactéries. J'y suis restée de 1994 à 1999.

Enfin, recrutée comme Maître de Conférences à l'Université de Versailles St-Quentin-en-Yvelines, j'ai finalement souhaité rejoindre une équipe de l'Université : le laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire dirigé par le Professeur Bernard Mignotte où j'ai intégré l'équipe de Jean-Luc Vayssière, de fin 1999 à mi 2003. C'est à cette occasion que je me suis spécialisée dans la biologie et la physiologie cellulaire et dans l'étude du processus de mort cellulaire programmée par apoptose.

J'ai mis ma carrière entre parenthèses en 2003, suite à mon déménagement dans l'Océan Indien et à l'occasion de la naissance de mon troisième enfant.

En 2007, j'ai obtenu une mise à disposition de l'UVSQ pour reprendre mes activités d'enseignant-chercheur auprès de l'Université de La Réunion. La situation régionale exceptionnelle créée par la crise sanitaire sans précédent de l'épidémie de Chikungunya avait permis le rapprochement de praticiens hospitaliers et de chercheurs universitaires pour initier la constitution d'une équipe de travail hospitalo-universitaire. J'ai ainsi proposé ma participation à la constitution de cette équipe naissante qui allait donner le Groupe de Recherche en Immunopathologies et maladies infectieuses.

Lorsque j'ai rejoint l'équipe sur le site du CHD Felix Guyon, l'épidémie réunionnaise de Chikungunya en était à sa 92^{ème} semaine. Marie-Christine Jaffar-Bandjee et Philippe Gasque venaient d'obtenir un PHRC (Projet hospitalier de Recherches Cliniques) assorti des autorisations nécessaires à la constitution de cohortes de patients. La collecte d'échantillons s'était mise en place et allait permettre l'étude des caractéristiques de la pathologie et de la réponse immune. L'identification des cellules cibles du virus était en cours et ces travaux, également menés par différents laboratoires métropolitains, allaient aboutir à plusieurs résultats intéressants sur l'interaction du virus avec respectivement, les fibroblastes et les macrophages.

Mon expertise sur l'apoptose acquise au cours de mon séjour au laboratoire du Pr Bernard Mignotte m'a tout naturellement conduite à proposer d'étudier les mécanismes cytopathiques induits par le virus, dans divers modèles d'infection développés *in vitro*.

Ma mise à disposition s'est ainsi prolongée jusqu'en 2011 puis par mutation je suis devenue officiellement Maître de Conférences de l'Université de La Réunion.

Le mémoire de demande d'habilitation à diriger les recherches que je présente ici est l'occasion de résumer et dresser un bilan de mes activités d'enseignement et de recherche, effectuées dans le cadre de mes fonctions de Maître de Conférences.

Il s'articulera de la manière suivante:

Après un Curriculum simplifié, j'exposerai un résumé de mes activités d'enseignement passées et actuelles assorti des activités d'encadrement et de responsabilités administratives qui ont accompagné mes fonctions d'enseignante.

En matière d'activités de recherche, je reviendrai brièvement sur la collaboration que j'ai pu développer avec le service de Génétique Du Dr Cartault au CHD en 2011 sur l'étude du syndrome de la Ravine, puis j'aborderai la synthèse de mes activités de recherche au sein du Groupe de Recherche en Immunopathologies et maladies infectieuses.

Je ferai tout d'abord un point sur l'état des connaissances concernant le Chikungunya. J'aborderai ainsi le contexte de l'épidémie de Chikungunya de 2005-2006 dans l'Océan Indien et ferai le bilan des données acquises depuis sur divers aspects de la pathologie et des caractéristiques du virus.

Je présenterai ensuite les résultats de mes travaux sur :

- Le rôle de l'apoptose induite au cours de l'infection par le virus du Chikungunya (CHIKV)
- Le rôle réciproque de l'autophagie
- La mise en évidence d'un mode d'interaction particulier du CHIKV avec les cellules du système immunitaire pouvant expliquer l'émergence de formes chroniques et la persistance virale dans des niches articulaires, plusieurs années après l'épisode d'infection aiguë.

Je terminerai sur les projets et perspectives des recherches que je souhaite continuer à mener sur l'étiologie des manifestations chroniques du Chikungunya.

SOMMAIRE

PREAMBULE ET REMERCIEMENTS

I PRESENTATION DU PARCOURS PROFESSIONNEL	p1
II CURRICULUM VITAE	p4
CURSUS UNIVERSITAIRE ET PROFESSIONNEL	
ACTIVITES DE RECHERCHE DOCTORALES ET POST-DOCTORALES	p5
LISTE DES PUBLICATIONS	p6
ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT	p8
RESPONSABILITES ADMINISTRATIVES	p10
ENCADREMENT D'ETUDIANTS DE L'UNIVERSITE DE LA REUNION	p10
ACTIVITES DE RECHERCHE EN COLLABORATION	p11
III SYNTHESE DES ACTIVITES DE RECHERCHE	p12
A INTRODUCTION ET CONTEXTE SCIENTIFIQUE	p12
A-1 Le Chikungunya à la Réunion	p13
A-2 Le Chikungunya dans le monde entre 2000 et 2013	p16
A-3 Retour sur les manifestations cliniques d'une maladie pas si bénigne	p20
A-4 Cycle de transmission et caractéristiques du virus CHIKV	p26
A-5 Dissémination du virus dans l'organisme et tropisme cellulaire	p30
A-6 Immunopathogénèse et réponses antivirales	p33
B OBJECTIFS ET RESUMES DES TRAVAUX REALISES	p36
B-1 Etude des effets cytopathiques du virus du Chikungunya (CHIKV)	p36
B-2 Etude des relations de CHIKV avec le mécanisme d'autophagie cellulaire	p43
B-3 Rôle des macrophages, persistance virale et facteurs associés à la chronicité	p48
IV BILAN ET PERSPECTIVES	p58
A Bilan	p58
B Etiologie des manifestations chroniques- Projets en cours et à venir	p59
B-1 Caractérisation des facteurs biologiques propres aux polyarthrites post-Chikungunya	p60
B-2 Caractérisation de la persistance virale et évaluation de sa participation dans la symptomatologie chronique	p65
B-3 Les facteurs de l'hôte et la composante auto-immune	p67
V CONCLUSION	p69
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p70
ABREVIATIONS	p78
ANNEXES – PUBLICATIONS	p79

II CURRICULUM VITAE

Pascale TROTOT épouse KREJBICH

Née le 10 janvier 1966 à Versailles, Yvelines

Nationalité : française

Mariée, trois enfants nés en 1996, 1998 et 2003

Maître de Conférences de l'Université de La Réunion

Laboratoire de rattachement : EA4517 Groupe de Recherche en Immunopathologie et maladies Infectieuses (GRI)

Domiciliée: 41 chemin Commins 97417 La Montagne

Téléphone : 0692771614 Courriel : pascale.krejbich@univ-reunion .fr

CURSUS UNIVERSITAIRE :

1993 Doctorat de Microbiologie de l'Université Paris VI- Pierre et Marie Curie, mention très honorable et félicitations du jury sur le thème: Activité transcriptionnelle dans les cellules de Carcinome Embryonnaire: Etude systématique par mutagenèse de la région régulatrice du virus polyome. Directeur de thèse : Pr Daniel Blangy.

1989 DEA de Microbiologie, Institut Pasteur, Université Paris VI- Pierre et Marie Curie (mention Très Bien).

1988 Maîtrise de Biologie cellulaire, spécialités Génétique et Immunologie (mention Bien), Paris VI- Pierre et Marie Curie.

CURSUS PROFESSIONNEL :

2011-2013 Maître de Conférences de l'Université de La Réunion

- Attachée au GRI EA 4517, Groupe de Recherches en Immunopathologies et Maladies Infectieuses dirigé par le Pr P. Gasque

1995-2011 Maître de Conférences de l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (UVSQ)

- Mise à disposition auprès de l'Université de La Réunion de 2007 à 2011, attachée au GRI EA 4517, Groupe de Recherches en Immunopathologies et Maladies Infectieuses dirigé par le Pr P. Gasque
- En congé parental de 2003 à 2007.
- Sur un poste à 4/5 de 1998 à 2003.
- Rattachée de 1999 à 2003 au Laboratoire de Génétique et Biologie cellulaire, équipe apoptose, CNRS FRE 245 ex UPRES-A 8087, UVSQ, dirigée par le Pr B. Mignotte.
- Rattachée de 1995 à 1999 à l'Unité de Régulation de l'Expression génétique, Institut Pasteur, Paris, dirigée par le Pr A. Danchin.

1993-1994 Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER) Université Paris-VI Pierre et Marie Curie (UPMC).

Unité de Régulation de l'Expression génétique, Institut Pasteur, Paris dirigée par le Pr A. Danchin.

1990-1993 Monitorat d'Initiation à l'Enseignement Supérieur durant la thèse de doctorat de l'UPMC.

ACTIVITES DE RECHERCHES DOCTORALES:

1990-1993 : thèse effectuée dans le laboratoire Virus et Différenciation, UPR272 CNRS, dirigé par le Pr D. Blangy à l'Institut de Recherches sur le Cancer-Villejuif.

Titre de la thèse : Activité transcriptionnelle dans les cellules de Carcinome Embryonnaire: Etude systématique par mutagenèse de la région régulatrice du virus Polyome.

Jury : Pr Michel Morange (Rapporteur), Dr Bernard Binetruy (Rapporteur), Dr Marcel Méchali (examineur), Dr Michel Lacasa (Examineur), Pr Daniel Blangy (Examineur et Directeur de thèse), Pr Jorge Péries (Président)

Soutenu le : 21 décembre 1993 **Mention** : Très honorable avec Félicitations du jury

ACTIVITES DE RECHERCHE POST-DOCTORALES:

1994-1999

Institut Pasteur, Paris.

Unité de Régulation de l'Expression génétique, dirigée par le Pr Antoine Danchin.

Mes activités de recherche dans l'Unité REG de l'Institut Pasteur se sont déroulées dans le cadre de mon statut d'ATER de l'Université Paris VI et se sont poursuivies durant quatre années après mon recrutement en tant que MCU à l'Université de Versailles.

Le premier axe de recherches que j'y ai développé portait sur l'étude des adényl-cyclases bactériennes et leur analyse fonctionnelle chez *Escherichia coli*. J'ai pu conduire une comparaison phylogénétique des séquences et de l'organisation des *loci* de gènes d'adényl-cyclases d'entérobactéries et l'étude des modes de régulations de ces gènes.

Mon projet s'est poursuivi par l'analyse fonctionnelle du gène *cyaY* d'*E. coli*, situé dans le locus du gène codant l'adényl-cyclase et dont la séquence présente une forte homologie avec le gène humain codant pour la frataxine, protéine impliquée dans l'Ataxie de Friedreich.

En réalisant les clonages, nous avons découvert l'existence chez *Aeromonas hydrophila* de deux gènes *Cya* d'origine phylogénétique très différente.

Le deuxième axe de recherches que j'ai développé a donc porté sur l'étude de ce gène d'adényl-cyclase n'appartenant à aucune classe répertoriée. Avec ma collègue Odile Sismeiro que j'ai accompagnée vers le diplôme d'ingénieur de recherche du CNAM, nous avons pu caractériser la protéine codée et identifier les fonctions physiologiques respectives des deux adényl-cyclase coexistant dans la bactérie.

1999-2003

Laboratoire de Génétique et Biologie cellulaire, CNRS FRE 2445, dirigée par le Pr Bernard Mignotte. Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

Au cours des quatre années passées dans l'équipe de Jean-Luc Vayssière, j'ai participé à deux études :

La première étude portait sur l'identification des événements précoces conduisant à l'apoptose de cellules humaines en culture (HeLa, Saos-2) et notamment les rôles de la mitochondrie et de la production d'Espèces Activées de l'Oxygène (EAO). En utilisant différents modes d'induction (liaison du facteur TNF-alpha à son récepteur, exposition à des drogues), différents modèles cellulaires (cellules rho0 sans chaîne respiratoire, avec expression contrôlée de Bcl-2) et différents inhibiteurs pharmacologiques, le déroulement du programme de mort a été analysé en cytofluorimétrie et immunofluorescence (chute du potentiel membranaire mitochondrial, production d'EAO, libération du cytochrome-c).

La seconde étude a montré, dans un modèle de fibroblastes dont l'expression de p53 est contrôlée, que deux voies de l'apoptose coexistent : une dépendante de la mitochondrie, inhibée par Bcl2 et impliquant l'activation transcriptionnelle par p53 de cibles pro-apoptotiques, et l'autre indépendante de la mitochondrie, impliquant une répression transcriptionnelle médiée par les histones déacétylases (HDAC).

Les recherches menées durant ces années m'ont permis d'affirmer mon intérêt scientifique pour l'étude de la physiologie des cellules eucaryotes et consolidé mes compétences dans le domaine de la mort cellulaire programmée.

LISTE DES PUBLICATIONS

2012

- Cartault F, Munier P, Benko E, Desguerre I, Hanein S, Boddaert N, Bandiera S, Vellayoudom J, **Krejebich-Trotot P**, Bintner M, Fourmaintraux A, Hoarau JJ, Girard M, Génin E, de Lonlay P, Naville M, Rodriguez D, Feingold J, Renouil M, Munnich A, Westhof E, Föhling M, Lyonnet S, Henrion-Caude A.

Mutation in a primate-conserved retrotransposon reveals a noncoding RNA as a mediator of infantile encephalopathy.

Proceedings of the National Academy of Sciences 03/2012; 109:4980-5. · 9.68 Impact Factor

2011

- **Krejebich-Trotot P**, Gay B, Li-Pat-Yuen G, Hoarau JJ, Jaffar-Bandjee MC, Briant L, Gasque P, Denizot D.

Chikungunya triggers an autophagic process which promotes viral replication.

Virology Journal 09/2011; 8:432. · 2.34 Impact Factor

- Hoarau JJ, **Krejebich-Trotot P**, Jaffar-Bandjee MC, Das T, Thon-Hon V, Kumar S, Neal JW, Gasque P.

Activation and Control of CNS Innate Immune Responses in Health and Diseases: A Balancing Act Finely Tuned by Neuroimmune Regulators (NIReg)

CNS & Neurological Disorders - Drug Targets 01/2011; 10(1):25-43. · 3.81 Impact Factor

2010

- Jaffar-Bandjee MC, Ramful D, Gauzere BA, Hoarau JJ, **Krejbich-Trotot P**, Robin S, Ribera A, Selambarom J, Gasque P.

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

Expert Review of Anticancer Therapy 09/2010; 8(9):987-96. · 3.28 Impact Factor

- **Krejbich-Trotot P**, Denizot M, Hoarau JJ, Jaffar-Bandjee MC, Das T, Gasque P.

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

The FASEB Journal 09/2010; 25(1):314-25. · 5.71 Impact Factor

-Hoarau JJ, Jaffar Bandjee MC, **Krejbich-Trotot P**, Das T, Li-Pat-Yuen G, Dassa B, M, Guichard E, Ribera A, Henni T, Tallet F, Moiton MP, Gauzère BA, Bruniquet S, Jaffar Bandjee Z, Morbidelli P, Martigny G, Jolivet M, Gay F, Grandadam M, Tolou H, Vieillard V, Debré P, Autran B, Gasque P
Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response.

The Journal of Immunology 05/2010; 184(10):5914-27. · 5.79 Impact Factor

2009

- Das T, Jaffar-Bandjee MC, Hoarau JJ, **Krejbich-Trotot P**, Denizot M, Lee-Pat-Yuen G, Sahoo R, Guiraud P, Ramful D, Robin S, Alessandri JL, Gauzere BA, Gasque P.

Chikungunya fever: CNS infection and pathologies of a re-emerging arbovirus.

Progress in Neurobiology 12/2009; 91(2):121-9. · 8.87 Impact Factor

- Jaffar-Bandjee MC, DasT, Hoarau JJ, **Krejbich-Trotot P**, Denizot M, Ribera A, Roques P, Gasque P.
Chikungunya virus takes centre stage in virally induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis.

Microbes and Infection 10/2009; 11(14-15):1206-18. · 3.10 Impact Factor

2006

- Dumay A, Rincheval V, **Trotot P**, Mignotte B, Vayssière JL.

The superoxide dismutase inhibitor diethyldithiocarbamate has antagonistic effects on apoptosis by triggering both cytochrome c release and caspase inhibition.

Free Radical Biology and Medicine 2006 April 15;40(8):1377-90. 5.42 Impact Factor

2005

- Lemaire C, Godefroy N, Costina-Parvu I, Rincheval V, Renaud F, **Trotot P**, Bouleau S, Mignotte B, Vayssiere JL.

Caspase-9 can antagonize p53-induced apoptosis by generating a p76(Rb) truncated form of Rb.

Oncogene. 2005 May 5;24(20):3297-308. 6.37 Impact Factor

2002

- Rincheval V, Renaud F, Lemaire C, Godefroy N, **Trotot P**, Boulo V, Mignotte B, and Vayssiere JL.
Bcl-2 can promote p53-dependent senescence versus apoptosis without affecting the G1/S transition.

Biochemical and Biophysical Research Communication. 2002 october 25;298(2):282-8. 2.48 Impact Factor

1998

- Sismeiro, O, **Trotot, P**, Biville, F, Vivares, C, and A. Danchin.
Aeromonas hydrophila Adenylyl Cyclase 2 : A New Class of Adenylyl Cyclases with thermophilic Properties and Sequence Similarities with Proteins from Hyperthermophilic Archaeobacteria
Journal of Bacteriology, 180, 13 : 3339-3344. 3.83 Impact Factor

1996

- **Trotot, P**, Sismeiro, O, Vivares, C, Glaser, P, Bresson-Roy, A and A. Danchin.
Comparative analysis of the *cya* locus in enterobacteria and gram negative facultative anaerobes
Biochimie, 1996. 78, 277-287. 3.02 Impact Factor

1994

- **Trotot, P**, Mechali, F, Blangy, D and M. Lacasa.
Transcriptional activity in 3T3, F9 and PCC4 embryonal carcinoma cells: A systematic deletion and linker-scanning study of the Polyomavirus enhancer.
Virology, 1994, 202 : 724-734. 3.35 Impact Factor

1992

- Darmoul, D, Lacasa, M, Baricault, L, Sapin, C, **Trotot, P**, Barbat, A and G. Trugnan.
Dipeptidyl peptidaseIV (CD26) gene expression in enterocyte-like colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2.
Journal of Biological Chemistry, 1992, 267 : 4824-4833. 4.77 Impact Factor

ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT :

2007-2013 à l'Université de La Réunion

Depuis mon arrivée à l'Université de La Réunion, j'ai dans un premier temps mis mes compétences au service de l'UFR de Sciences et assuré les Travaux Dirigés (TD) et Travaux Pratiques (TP) du module de Communication cellulaire de L3 de Biologie puis j'ai rejoint l'UFR Santé. Mes activités d'enseignement se sont alors partagées entre la Biologie Cellulaire (UE2-A), la Biologie Moléculaire (UE1-C) et la Physiologie (UE3- B) de PACES (première année commune des études de Santé) pour des Cours Magistraux (CM) et des Travaux Dirigés (TD). J'ai également assuré un enseignement de Biologie générale aux IFSI (Instituts de formation aux soins infirmiers) de St-Denis et St Pierre, un enseignement de Neurosensoriel en DCEM1 (3^{ème} année de médecine) et différents enseignements du Master B4 (Biochimie, Biologie moléculaire, Biotechnologie, Biomédecine) première et deuxième année (Physiologie des organes des sens et Bases moléculaires et cellulaires des pathologies). Pour 2012-2013 mon service d'enseignement fait état de 250 heures équivalent TD.

L'enseignement des PACES avec ses effectifs croissants (près de 900 inscrits en 2013) m'a demandée une adaptation pédagogique constante. En association avec le service TICE de l'Université, j'ai ainsi participé avec l'équipe enseignante à la mise en place du système de formation numérique de la PACES durant l'année universitaire 2011-2012. Depuis cette date, l'enseignement repose sur des cours enregistrés en podcasts ensuite commentés au moyen de forums de questions sur la plateforme numérique *e-santé* et au cours de séances d'activités en présence des étudiants.

1995-2003 dans le cadre du poste de Maître de Conférences de l'Université de Versailles (UVSQ) :

De la date de mon recrutement à l'UVSQ jusqu'en 2003 au moment de mon départ pour La Réunion, j'ai assumé les CM, TD et TP de Biologie Cellulaire et Biochimie pour les sections de 1ère année de Science de la Vie (DEUG SV 1) et j'ai continué de contribuer à l'autonomisation des enseignements de l'UVSQ (au départ annexe de Paris VI) en montant différents modules des niveaux licence. J'ai ainsi initié plusieurs enseignements :

- un enseignement de Métabolisme bactérien à partir de base de données du net (reconstitution du métabolisme de *E.coli* avec les bases EcoCyc et Kegg),
- un module intitulé 'Biomembranes' pour lequel j'ai assuré l'intégralité des cours magistraux et monté deux séances pratiques originales au cours desquelles j'ai demandé aux étudiants de réaliser et de suivre en microscopie à fluorescence la fusion des membranes plasmiques lors de la formation d'un hétérocaryon homme/souris et de tester différentes drogues sur le processus de phagocytose en direct de billes de latex par des macrophages en culture.
- Un module intitulé 'Interactions moléculaires' pour lequel j'ai contribué à organiser un cycle de séminaires et réuni les conférenciers dans le domaine.

J'ai d'autre part pris en charge et assuré, au cours de ces années, les options Biologie des formations MIAS 1 et SM 1 (Mathématiques et Informatique appliquées aux sciences sociales, Sciences de la Matière).

J'ai contribué à l'enseignement d'un module de Génétique Bactérienne en Licence et préparé pour cet enseignement des Travaux pratiques sur une semaine (permettant la réalisation d'une mutagénèse bactérienne, l'étude du transport du maltose et l'interaction du phage lambda).

Enfin, à l'occasion de la réforme de l'enseignement supérieur des années 2000, nous avons expérimenté la mise en place d'une année '0' pluridisciplinaire. J'ai pris la responsabilité d'une mise en forme des enseignements pratiques permettant l'intervention d'enseignants de Maths, Physique, Chimie et Biologie sur des thématiques issues du programme de biologie. Les enseignements que j'ai coordonnés étaient construits sur cinq jours et alternaient les disciplines sur une thématique.

1992-1994 en tant qu'Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche de l'Université Paris VI (UPMC) temps plein.

J'ai effectué divers enseignements sur les deux Université de Paris VI et de Versailles (UVSQ). Dans ce cadre j'ai assuré l'ensemble des TPs du module de Microbiologie de Maîtrise de Paris VI et participé à la mise en place des enseignements dans la toute jeune Université de Versailles nouvellement créée et encore sous tutelle de Paris VI.

1989-1992 Monitorat d'Initiation à l'Enseignement Supérieur, Université Paris VI

A raison de 64h eqTD par an TD, je suis intervenue en Biologie Cellulaire et Adaptation cellulaire en DEUG Sciences de la Vie sous la tutelle du Pr G. Butin et du Dr A.Y Jeantet.

RESPONSABILITES ADMINISTRATIVES

2007-2013 à l'Université de La Réunion

J'ai participé activement à la mise en place du cursus d'études médicales PACES, PCEM2 et DCEM1 avec la création de l'UFR Santé. J'ai pris la responsabilité des modules de Physiologie UE3B de PACES et de Microbiologie UE8 de PCEM2 (en 2011).

J'ai accompagné l'intégration des enseignements en IFSI à l'UR en assumant la responsabilité du module d'UE2-1-S1 de Biologie générale.

Depuis mon affectation à La Réunion j'ai aussi participé à divers comités de sélection : chaire d'excellence de microbiologie en 2010, recrutements de MCU en 2011.

1995-2003 à l'Université de Versailles St Quentin

Entre 1998 et 2003 j'ai assuré la responsabilité du tutorat, impliquant le recrutement puis l'encadrement annuel des tuteurs de Biologie.

J'ai pu gérer et organiser les TP de première année et les TP pluridisciplinaires (constitution et pilotage des équipes pédagogiques, gestion des emplois du temps, relevés des notes, formation des nouveaux enseignants.)

J'ai été coordinatrice de divers modules ce qui a impliqué la mise en place des équipes pédagogiques et l'organisation de leurs interventions en :

- Biologie de SV1 et des enseignements pluridisciplinaires lors de la mise en place de la réforme du DEUG année 0
- Biologie des membranes (SV2)
- Métabolisme (licence de Biologie)
- option 'Interactions moléculaires' (licence de Biologie)

En 2003 j'ai activement participé à la préparation du projet de création de l'Ecole Doctorale 'Interactions-Hôtes Pathogènes' et à la mise en place de la réforme LMD.

J'ai d'autre part fait partie de la commission de spécialiste de l'Etablissement en tant que membre élu.

ENCADREMENT D'ETUDIANTS DEPUIS 2007:

2013 - M2 B4, Université de la Réunion, 6 mois, encadrement à 100%, Elodie DAMOUR
- DCEM1/M1, Université de la Réunion, 2 mois, 100%, Flavie ROLLAND

2012 - M2 B4, Université de la Réunion, 6 mois, 100%, Giovédie STANISLAS

2011 - M1 B4, Université de la Réunion, 2 mois, 100%, Bénédicte VANWALSCAPPEL

2010 - PCEM2/M1 Université de Versailles, 2 mois, 100%, Diana RAMAHARO

2007-2009 Doctorat Université de la Réunion et de Bangalore en Inde encadrement 20%, Trina DAS.

ACTIVITES DE RECHERCHES EN COLLABORATION

J'évoquerai dans ce paragraphe la collaboration que j'ai pu mener en 2011 avec le Dr François Cartault et qui m'a ponctuellement fait quitter le champ de l'infectiologie et du Chikungunya. Dans le cadre de son étude du syndrome RAVINE, F. Cartault, responsable du Service de Génétique de l'Hôpital avait rassemblé plusieurs données suggérant que la mutation qu'il avait caractérisée chez ses patients était responsable d'un effet cytopathique à tropisme principalement neuronal. Il m'a contactée pour mettre en place une modélisation sur culture cellulaire de l'effet de la mutation.

Les résultats obtenus ont été publiés dans PNAS en 2012, titre : *Mutation in a primate-conserved retrotransposon reveals a noncoding RNA as a mediator of infantile encephalopathy. (Annexe 1)(Cartault, Munier et al. 2012)*

Le syndrome RAVINE, acronyme de « nourrisson Réunionnais, Anorexie, Vomissements Incoercibles et signes Neurologiques » est une pathologie neurodégénérative, létale dans la moitié des cas avant l'âge de deux ans, se manifestant par une anorexie sévère chez le nourrisson. C'est une maladie génétique autosomique récessive dont la prévalence est estimée à 1/10000. L'équipe de F. Cartault, en analysant le profil génétique de plusieurs familles réunionnaises dont certaines avaient plusieurs enfants atteints a pu identifier la mutation. De manière surprenante, il s'est avéré que cette mutation ponctuelle était située dans un intron, au niveau d'un élément de type rétrotransposon, transcrit dans le cerveau sous forme d'un ARN non codant (appelé SLC7A2-IT1A/B). Le taux intracérébral de cet ARN était diminué de 8 fois chez les porteurs de la mutation. L'imagerie médicale des patients indiquant une impressionnante disparition de la matière blanche, nous avons fait l'hypothèse que la mutation était impliquée dans une mort cellulaire neuronale. Afin d'identifier le rôle du transcrit non codant, nous avons choisi de reproduire *in vitro* l'effet d'une réduction de la quantité de transcrit en utilisant comme modèle, la lignée de cellules Kelly issues d'un neuroblastome humain. Nous avons opté pour une technique d'ARN interférentiel, dessiné des oligonucléotides anti-sens et mis en place des transfections. J'ai pris en charge l'analyse de l'effet cytopathique en cytofluorimétrie (marquages Iodure de propidium/annexine V) et la recherche systématique des marqueurs d'apoptose: Bax mitochondrial/ cytochrome-c cytosolique et Caspase-3 activée. La diminution de la quantité d'ARN non codant SLC7A2-IT1A/B s'est révélée associée à une augmentation significative de l'apoptose des cellules Kelly.

L'analyse *in silico* de la séquence mutée a montré qu'elle était complémentaire d'un ARN de type Piwi qui *in vivo* pourrait expliquer la répression de l'ARN SLC7A2-IT1A/B. Elle indique également la possibilité d'une maturation et d'un repliement dans l'espace générant une structure secondaire propice à une fixation protéique. Cet ARN fait probablement partie des ARNs régulateurs mais sa fonction exacte reste à découvrir, surtout pour sa capacité à interférer avec l'apoptose. Sa découverte ouvre un nouveau champ passionnant d'identification des fonctions des nombreux petits ARN non codants du génome humain qui s'avèrent, et c'est nouveau, pouvoir être impliqués dans une pathologie grave.

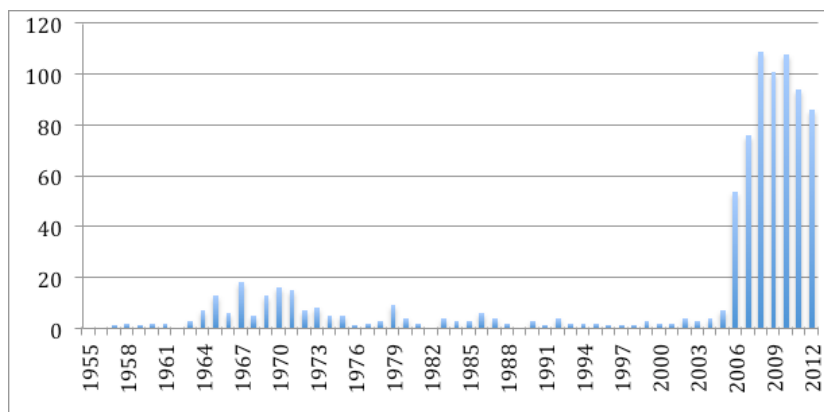
III SYNTHÈSE DES ACTIVITÉS DE RECHERCHE

A INTRODUCTION ET CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Pour introduire le contexte dans lequel j'ai pu reprendre des activités de recherche à La Réunion, intégrer le GRI et contribuer à l'effort localement engagé pour percer les stratégies de fonctionnement du virus du Chikungunya, sa physiopathologie et les réponses de l'hôte, il me faut revenir sur les événements liés à l'épidémie réunionnaise de 2005-2006.

En frappant aussi vite et violemment une région du monde développée et dotée d'infrastructures médicales de pointe, l'épidémie de Chikungunya a saisi l'ensemble de la communauté médicale et scientifique internationale. Elle a dès lors vu fleurir une importante bibliographie, propulsant la maladie, le virus et son vecteur, dans une dynamique de recherches cliniques et fondamentales extrêmement productive.

En témoigne le tableau ci-dessous, récapitulant par année le nombre de publications pour lesquelles le terme Chikungunya apparaît dans le titre (données obtenues avec Medline trend).



Avant d'exposer les travaux effectués au laboratoire et les résultats que j'ai pu obtenir, je resituerai le contexte créé par l'épidémie réunionnaise et brosserai un état des lieux des connaissances acquises depuis sur le Chikungunya dans plusieurs de ses aspects : cliniques, modes de transmission (vecteur/hôtes), caractéristiques liées au virus.

A-1 Retour sur une crise sanitaire sans précédent : Le Chikungunya à la Réunion

Chikungunya na enkor ou bien la pi si la rényon. Avek bann zotorité ou koné zamé la vérité... (extrait d'une chanson créole)

A-1-1 Quelques souvenirs :

Janvier 2006, en pleines vacances scolaires, mon voisin croisé devant chez moi marche... courbé ! La rumeur se répand : les hôpitaux sont débordés, les salles d'attente des médecins bondées. Une maladie au nom exotique, le Chikungunya, dont on entendait parler depuis environ un an, devient notre quotidien. Le responsable de cette transmission virale : *Aedes albopictus*, le moustique tigre. C'est l'ennemi numéro 1 et la lutte s'annonce délicate. Il n'est plus possible de trouver un seul répulsif en pharmacie,

une seule spirale anti-moustique en grande surface. C'est le plein été austral mais nous sortons le plus « couverts » possible. Il faut dire qu'il est traître ce moustique: il ne fait aucun bruit et pique à n'importe quelle heure. Nous accueillons de plus en plus régulièrement dans nos cours des hommes masqués, en combinaisons intégrales: ils cherchent les gîtes larvaires. Les nuits sont rythmées par le passage des engins du LAV (lutte anti-vectorielle). Mais la maladie progresse. Impossible de ne pas connaître quelqu'un qui a été touché. Certains sont à l'hôpital. On parle de cas très graves. L'étau se resserre, la psychose gagne. Une autre voisine et amie, Hélène Walters pédiatre à l'hôpital n'a pas de bonnes nouvelles : les tout petits atteints souffrent affreusement. Elle n'avait encore jamais vu de pareilles manifestations cutanées qui lui font penser aux grands brûlés. Elle fait front d'autant que Jason, son mari, est cloué au lit. Il rapporte l'impression d'avoir les os brisés. Plusieurs semaines après l'épisode fiévreux, ce grand sportif marche difficilement, chaque mouvement est un problème. Il broie du noir. Ils sont légion les amis fiévreux, les proches endoloris. Les uns ont la 'gratelle', les autres n'arrivent plus à prendre le volant de leur voiture, à tenir un stylo, à lacer leurs chaussures. Les convalescences se font longues. Puis l'inquiétude grandit encore: des décès ont été annoncés, des personnes âgées, mais aussi des enfants...

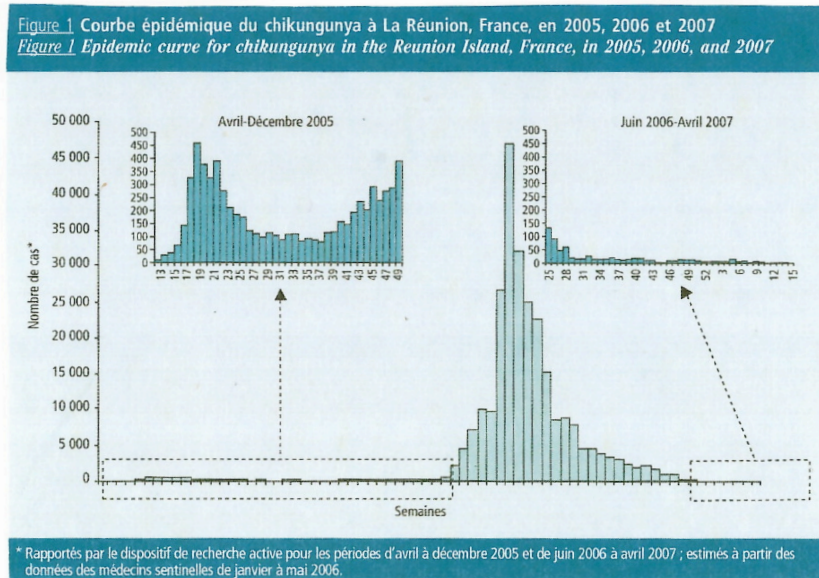


A-1-2 Suivi épidémiologique

Le premier cas de Chikungunya officiellement enregistré à La Réunion date du 22 février 2005. La phase épidémique sera déclarée par les autorités en mars 2005. Son suivi par l'institut de veille sanitaire, CIRE-OI indique une croissance exponentielle pendant sept semaines (de la mi mars à la mi-mai), une apogée au cours de la semaine du 9 au 15 mai (450 cas hebdomadaires), et enfin une décrue progressive jusqu'au mois de juillet. Les autorités estiment que la maladie est bénigne et que l'hiver austral aura raison du moustique responsable de sa transmission. En effet, l'incidence de l'épidémie se stabilise en juillet-août, mais n'est pour autant pas arrêtée. 50 à 100 nouveaux cas sont enregistrés en moyenne chaque semaine au cours de cette période hivernale. D'ailleurs, un rapport de la CIRE du 27 juillet 2005 rapporte «une épidémie sous contrôle depuis la mi-mai » en ajoutant : « On ne peut pas écarter formellement la possibilité d'un regain d'activité avec le retour de la chaleur si l'épidémie n'est pas terminée d'ici la fin de l'hiver austral ».

C'est précisément ce qui se produit dès le retour de la saison humide. Fin novembre, 4 500 personnes ont été contaminées. Elles sont plus de 6 000 fin décembre ce qui représente le quart des arrêts de travail enregistrés sur l'île.

Puis l'épidémie explose littéralement à partir de janvier 2006. On enregistre d'abord près de 500 cas par semaine (la valeur du pic de mai 2005), nombre qui ne cessera de croître avec un maximum à 45000 cas en semaine 5 (du 6 au 12 février). Au 19 février 2006 les chiffres de l'InVS font état de 130 000 personnes contaminées, incluant des formes asymptomatiques, des formes plus ou moins graves et 77 décès imputables directement ou indirectement au Chikungunya.



Courbe épidémique du Chikungunya à la Réunion en 2005, 2006 et 2007. BEH de l'InVS 2008. Sissoko, Ledrans, Brucker L'épidémie de Chikungunya à la Réunion et à Mayotte, France 2005-2006.

La population locale fait face à une crise sans précédent, sur un plan sanitaire mais également économique, social, écologique et politique. Les élus locaux n'auront eu de cesse de sensibiliser la métropole, mobilisant les ministres de la Santé, de l'Outre-mer puis le premier ministre, lesquels feront successivement le déplacement pour assurer de « la solidarité nationale » face à la crise et annoncer des aides pour le département (voir le rapport parlementaire du 4 juillet 2006 en page 15).

Le bilan fin 2006 fait état d'un total de 266 000 personnes ayant présenté, à un moment ou à un autre, une forme clinique de la maladie, ce qui sur 785 000 habitants supposés à l'époque et après différentes enquêtes de séroprévalence suggère que 30 à 40% des réunionnais auront été contaminés (Gerardin, Guernier et al. 2008). Cette maladie réputée bénigne, 'exotique' et tropicale et jusque-là, il faut bien le dire, complètement ignorée, occupe d'un coup le devant de la scène nationale puis internationale, mobilise d'importants moyens, générant d'importants enjeux pour les pouvoirs décisionnels. La Réunion obtient la mise en place d'un système de veille pour les maladies émergentes et réémergentes et que soient débloqués des moyens pour une recherche clinique et fondamentale afin de mieux comprendre la pathologie et y apporter des réponses thérapeutiques et vaccinales à plus ou moins long terme.

Extrait du rapport parlementaire enregistré à la Présidence de l'Assemblée nationale le 4 juillet 2006.

Déposé par la commission des affaires culturelles, familiales et sociales sur l'épidémie à virus Chikungunya à La Réunion et à Mayotte, présenté par M. Bertho Audifax, Député.

... **2. Un constat : l'imprévisibilité de la flambée épidémique à La Réunion entre décembre 2005 et janvier 2006**

a. Une surprise partagée devant l'explosion de l'épidémie

L'explosion de l'épidémie, et par conséquent la crise sanitaire majeure qui a affecté La Réunion, a pris l'ensemble de l'île de court.

Ce constat est également dressé par les représentants de la Direction générale de la santé (DGS) et de l'InVS.

Pour M. Didier Houssin, directeur général de la santé : « ... La Réunion avait connu dans les années précédentes une épidémie de dengue qui s'était tassée rapidement. Le Chikungunya utilisant le même vecteur, nous n'avions pas de raison de craindre une épidémie d'une nature très différente. En somme, nous avons été alertés et notre réaction nous semblait adaptée au niveau d'alerte connu. Ce que nous n'avons pas été capables de prévoir, c'est le caractère explosif de l'épidémie »⁷.

De même, M. Dominique Gombert, membre de la mission de l'IGAS qui s'est rendue à La Réunion en décembre 2005 a indiqué que : « Même si l'InVS a noté dès septembre 2005 que les conditions climatiques entraîneraient forcément une recrudescence de la maladie, et même si nous nous attendions à un scénario d'extension de l'épidémie, nous n'avons pas perçu, lors de notre mission, que le facteur multiplicatif allait croître autant. Je rappelle que l'incidence hebdomadaire, entre début décembre 2005 et février 2006, a bondi de 200 à 45 000 cas. »⁸

Il faut préciser que des taux d'attaque très élevés ont été relevés pour d'autres épidémies de Chikungunya, souvent, il est vrai, par des études anciennes et fragmentaires mais aussi par d'autres études mieux documentées comme celle effectuée à Bangkok en 1962 (31 % de séroconversion en un an) ou au Nigeria en 1969 (70 %)⁹. Cependant, pour M. Gilles Brückner, aucune des 25 épidémies de Chikungunya décrites dans le monde n'a le profil de celle qu'a connue La Réunion. Elles vont de quelques dizaines de cas recensés, à 70 000 personnes malades pour la plus grande épidémie de Chikungunya documentée, celle de Bangkok. À cet égard, la mission note qu'il a été fait preuve d'un trop grand optimisme car, à l'inverse de la dengue pour laquelle existait une certaine immunité dans la population, le Chikungunya allait frapper une population que l'on savait vierge.

b. Les causes exactes de cette flambée épidémique restent encore à déterminer

Les mécanismes qui ont conduit à l'explosion de l'épidémie en quelques semaines, entre la fin de l'année 2005 et le début de l'année 2006, restent encore largement inexpliqués.

Pour l'instant, en effet, on ne peut que soulever des hypothèses qui doivent être vérifiées scientifiquement. Les différents facteurs qui, combinés entre eux, ont pu produire un effet multiplicateur considérable peuvent être, selon les spécialistes entendus par la mission :

- une population non immunisée à l'égard du virus du Chikungunya ;
- l'abondance de la population de moustique, l'*Aedes albopictus*, qui s'est révélé un excellent vecteur du virus, des facteurs climatiques particuliers ayant pu, de surcroît, favoriser sa prolifération ;
- un moustique particulièrement anthropophile, domestique, diurne avec un pic d'activité en début et en fin de journée, pouvant piquer à l'intérieur même des maisons ;
- un mécanisme de transmission du virus par le moustique, d'homme à homme, sans l'intermédiaire d'un réservoir animal ;
- une pathogénicité particulière du virus ;
- l'abondance de la charge virale chez les personnes infectées facilitant la transmission de la maladie par le moustique ;
- une susceptibilité génétique particulière de la population réunionnaise ;

Ces facteurs ont d'autant plus joué que la population étant sous-informée du risque lié aux arboviroses elle n'était pas préparée à se protéger.

Une piste a été ouverte par la récente étude (précitée) menée par l'Institut Pasteur qui, en séquençant entièrement plusieurs souches du virus Chikungunya présentes à La Réunion, a mis en évidence des mutations du virus devenues prédominantes à partir de septembre 2005. Ces mutations pourraient notamment expliquer d'une part, une adaptation du virus au moustique *Aedes albopictus* qui, il faut le rappeler, n'était pas connu pour être un bon vecteur du et d'autre part, une pathogénicité virale accrue.

Un enjeu majeur des travaux de recherche sur le Chikungunya va consister à mieux identifier les mécanismes qui ont conduit à l'emballement de l'épidémie et dans lesquels n'entrent pas seulement des facteurs liés au virus et à son vecteur mais aussi une dimension environnementale et comportementale importante.

L'impact et la mobilisation auront résulté, non seulement de l'ampleur et de la rapidité avec laquelle la maladie s'était répandue, mais également de l'observation inattendue de formes graves et atypiques. Au total, 246 personnes auront été hospitalisées en réanimation. Une quarantaine de cas de transmissions materno-néonatales avec séquelles importantes des nouveaux-nés auront été décrits. Enfin, 252 certificats de décès mentionnant le Chikungunya ont été recensés. Toutefois, les trois quarts concernaient des personnes âgées de plus de 70 ans et le taux de mortalité de 1 pour 1000 s'avère en définitive plutôt faible.

Fin 2006 et début 2007, une persistance d'une dizaine de cas par semaine continue à être enregistrée puis un bilan effectué en mars annonce que leur nombre hebdomadaire n'excède pas 10 cas biologiquement confirmés depuis 8 semaines. Les données de la surveillance renforcée par un diagnostic biologique systématique indiquent donc une circulation du virus devenue sporadique, signant la fin de l'épidémie.

A-2 Le Chikungunya dans le monde entre 2000 et 2013: un modèle de pathologie en émergence susceptible de concerner toute la planète.

Le suivi de la propagation du Chikungunya a permis de réaliser l'impact de la société du XXIème siècle sur le destin international d'une pathologie émergente.

Une maladie vectorielle telle que le Chikungunya est évidemment indissociable de la présence de son vecteur mais force fut de constater qu'en moins de cinq ans, le Chikungunya avait concerné le quart du globe terrestre et qu'un de ses moustiques vecteur n'allait avoir de cesse de conquérir de nouveaux territoires, s'adaptant à des climats variés, peut être en partie en lien avec le réchauffement climatique (Charrel, de Lamballerie et al. 2007)

A-2-1 Origine des épidémies de 2005/2006 dans l'Océan Indien

Les travaux entrepris pour identifier l'origine géographique du virus montrèrent qu'avant d'atteindre les îles de l'Océan Indien en 2005 et 2006 (La Réunion, Mayotte avec 45 000 cas, l'île Maurice où le nombre de cas est difficile à estimer et les Seychelles où près de 9000 cas auront été recensés), l'épidémie s'était répandue depuis l'Afrique de l'Est vers les Comores où la prévalence est estimée à 215 000 cas soit 27 % de la population.

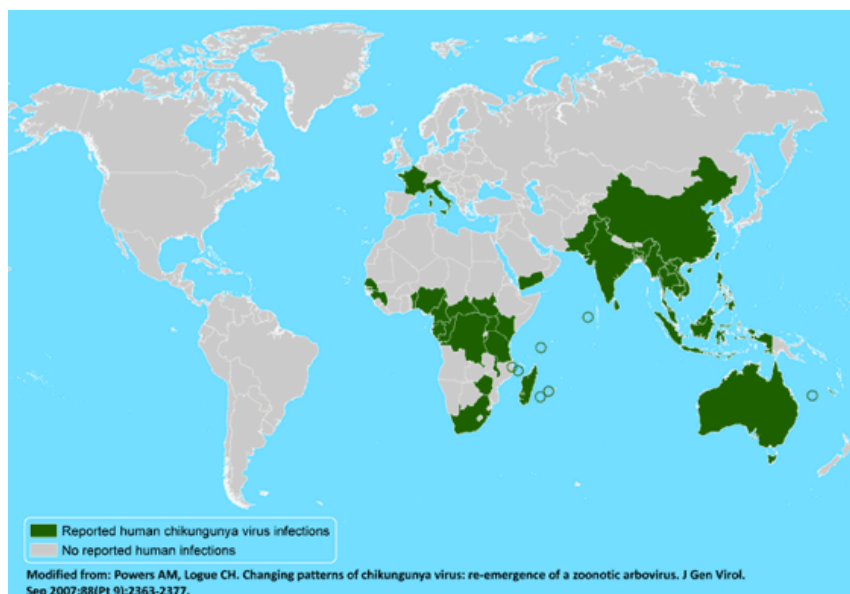
Elle aurait ainsi débuté en 2004 au Kenya où la prévalence atteint 75% sur l'île de Lamu, pour revue : (Powers and Logue 2007). Il est probable que cette épidémie faisait suite à une circulation antérieure du virus en Afrique centrale. La République démocratique du Congo a en effet rapporté une importante épidémie en 1999-2000 avec 50 000 cas (Pialoux, Gauzere et al. 2007). Le virus, présent en Afrique depuis longtemps, avait été associé à des foyers régulièrement relatés mais peu documentés. Les cas semblaient alors plutôt sporadiques, survenant de manière cyclique après de longues périodes silencieuses et ce depuis les années 1950, date de l'identification officielle du virus responsable de ces foyers.

A-2-2 Historique du Chikungunya.

Les manifestations musculo-squelettiques et l'arthralgie incapacitante sont à l'origine du nom de cette pathologie qui signifierait « marcher courbé » en langage Makonde (dialecte de certaines régions du Mozambique). Cependant, les premières descriptions d'épidémie d'une pathologie présentant cette symptomatologie caractéristique ne sont pas africaines et remonteraient à la fin du XVIII en Indonésie et début du XIX en Inde (d'après les revues de (Kucharz and Cebula-Byrska 2012; Suhrbier, Jaffar-Bandjee et al. 2012)). Il faut attendre 1952 pour en entendre parler à nouveau, cette fois en Afrique de l'est (sur le fameux plateau du Makonde bordant la Tanzanie et le Mozambique) (Lumsden 1955; Robinson 1955) avec déjà une extension probable à l'Océan indien et en Asie du sud est où plus de 200 morts seront recensés en Inde et au Sri Lanka en 1962. A l'époque, une centaine de cas importés avaient été identifiés en Europe et en Amérique du Nord (Simon, Javelle et al. 2011).

A-2-3 Distribution géographique depuis 2006

Après avoir gagné les îles de l'océan indien, on constate à partir de 2006, que l'épidémie se propage très rapidement à Madagascar, et s'étend vers le Nord-Est, au Sri Lanka et aux Maldives (12 000 cas) puis au Pakistan et en Malaisie pour atteindre l'Inde où la circulation virale a été majeure avec plus d'1,4 millions de cas estimés. L'épidémie continue d'ailleurs de concerner ces zones dans les années qui suivent, avec plusieurs dizaines de milliers de cas recensés au Sri Lanka en 2008 et autant au Pakistan et en Malaisie en 2008 et 2009. De manière concomitante, des épidémies ont fait leur apparition en Asie du Sud-Est en particulier à Singapour mais avec une souche virale différente. 42 000 cas sont rapportés en Thaïlande en 2008-2009. L'Indonésie est touchée en 2009-2010, avec des dizaines de milliers cas à Lampung, au sud de Sumatra. La carte ci-dessous indique les zones qui ont été concernées par des foyers ou des épidémies.



Countries with Reported Human Chikungunya Virus Infections *As of May 2012* source : American Centers for Disease Control and Prevention

En 2010, la Chine signalait plusieurs centaines de cas d'une transmission autochtone dans une province du sud (Guangdong) à partir d'une importation d'un virus d'origine africaine (Wu, Wu et al. 2012).

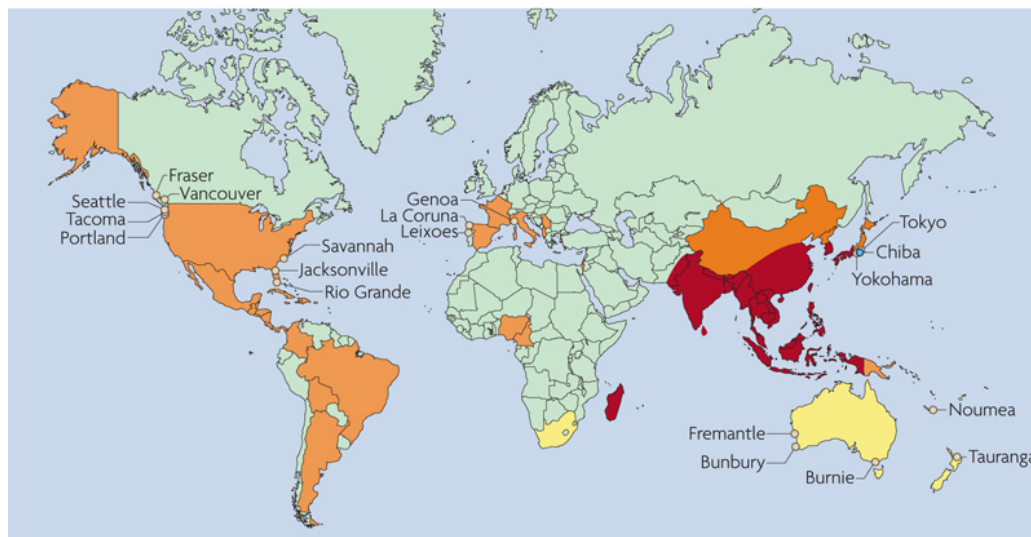
Depuis 2007, des épidémies de moindre ampleur par rapport à celles de 2006 ont concerné plusieurs régions d'Inde et d'Afrique (Sénégal, Cameroun, Angola, Nigéria, Ouganda, Guinée, Malawi, République Centre Africaine et Burundi). Le Gabon a rapporté plusieurs foyers, à Libreville en 2007 (18 000 cas) et dans le sud-ouest du pays en 2010 où la dengue circulait simultanément. En 2011, c'est le Congo, notamment Brazzaville qui a été la cible d'une sérieuse épidémie avec plus de 11000 cas répertoriés.

L'Asie du Sud-Est a connu une recrudescence du nombre de cas en 2012 (dont 1500 au Cambodge) qui ont gagné le Pacifique où une épidémie a sévi en Papouasie Nouvelle Guinée. Enfin, la Nouvelle Calédonie signalait en 2011 un foyer d'une dizaine de cas autochtones suite à 2 cas importés d'Indonésie. InVS Bulletin Hebdomadaire International N°291 13 avril au 19 avril 2011.

A-2-4 Des zones tempérées concernées

Les études menées sur l'écologie et la distribution géographique du vecteur ont permis de réaliser que des pathologies réputées 'exotiques' telle que le Chikungunya pouvaient constituer une menace pour les zones tempérées (Thiboutot, Kannan et al. 2010). La colonisation du globe par *Aedes albopictus*, le moustique tigre d'origine asiatique responsable du nouveau couple virus/vecteur à l'efficacité redoutable ne cesse en effet de gagner du terrain.

La carte présentée ci dessous fait état de la progression de la distribution mondiale de *A. albopictus* observée au cours des dernières décennies.



Nature Reviews | Microbiology

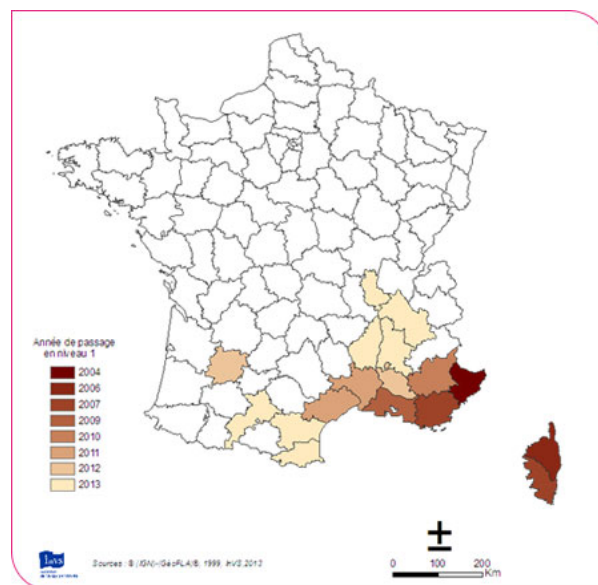
En rouge l'ancienne distribution de *A. albopictus*, en orange les populations en expansion rapportées au cours des 30 dernières années, en jaune des sites où *A. albopictus* a été intercepté (dans les ports) © (2006) National Academy of Sciences.

Depuis 2006, plusieurs milliers de cas de Chikungunya importés, c'est à dire de voyageurs de retour de zones épidémiques où ils ont contracté la maladie, ont été signalés dans les hôpitaux des pays européens dont certains, autour du bassin méditerranéen, hébergent des populations prolifiques de moustiques.

Ce qui était tant redouté arriva. Un cas importé d'Inde fut à l'origine d'un foyer épidémique dans le nord de l'Italie, en Emilie Romagne à la fin de l'été septentrional 2007. Sur une surface couvrant trois départements, 250 personnes auront contracté le virus en l'espace de quatre mois (de juillet à octobre 2007) (Rezza, Nicoletti et al. 2007) (Charrel, de Lamballerie et al. 2008).

Cette propagation rapide témoigne des capacités vectorielles de *A. Albopictus* en zone tempérée. Le risque de voir une maladie réputée tropicale commencer à concerner en été des pays européens est donc bien réel. La France a d'ailleurs expérimenté semble-t-il deux cas déclarés autochtones, dans le département du Var en septembre 2010 (Grandadam, Caro et al. 2011).

Un système de surveillance entomologique et épidémiologique élaboré par le ministère chargé de la Santé et actualisé chaque année a ainsi été mis en place en période estivale métropolitaine. En mai 2013, 17 départements du Sud et de la région Rhône-Alpes (Alpes-Maritimes, Alpes-de-Haute-Provence, Var, Haute-Corse, Corse-du-Sud, Bouches-du-Rhône, Vaucluse, Gard, Hérault, Aude, Pyrénées Orientales, Haute-Garonne, Lot et Garonne, Drôme, Ardèche, Isère et Rhône) étaient concernés par l'implantation du moustique *A. albopictus*.



Avec la mondialisation des échanges, les cas importés n'épargnent quasiment aucune région du globe où l'émergence de foyers de transmission est envisageable. Un bilan épidémiologique publié en 2009 montrait que le continent américain (Etats-unis, Amérique centrale et du sud), ainsi que les Caraïbes, le Japon et l'Australie avaient recensé de nombreux cas de retours sur leur sol de voyageurs infectés (revue (Staples, Breiman et al. 2009). Une étude publiée en 2012 dans PLoS Neglected Tropical Diseases (Ruiz-Moreno, Vargas et al. 2012), a modélisé la survenue de foyers épidémiques dans 3

villes américaines, New-York et Atlanta en période estivale, favorable au développement du moustique et à Miami où les *Aedes* sont bien implantés et où règne toute l'année un climat tropical.

A-2-5 La Réunion peut-elle être concernée par une nouvelle épidémie ?

Entre 2007 et 2009 aucun cas autochtone n'a été enregistré, puis en 2010, une reprise d'une transmission du virus avec un épisode d'ampleur relative (153 cas) révéla que la Réunion n'était pas à l'abri d'une nouvelle offensive. Ce foyer résultait d'une importation du virus, probablement par un voyageur infecté à Madagascar, territoire dorénavant considéré comme endémo-épidémique (D'Ortenzio, Grandadam et al. 2011). Cet épisode conduisit à une nouvelle importation en Europe. On suppose que le phénomène, limité au niveau géographique et en nombre de cas, le doit à l'efficacité d'intervention de la lutte anti-vectorielle dans les zones touchées, dès le signalement des premiers cas. Depuis cet épisode, aucun cas autochtone n'a plus été enregistré, ni à La Réunion ni à Mayotte, mais les services de l'InVS restent vigilants car une réémergence est toujours possible sur une île tropicale où la population est encore à 60 ou 70% naïve à l'égard du virus.

A-2-6 Dernières progressions.

En 2013 le Chikungunya sévit encore dans certaines zones du globe. Il est signalé aux Philippines où il s'est progressivement étendu à l'ensemble du pays et en Indonésie, à Jakarta, Java et Bali. (source: ProMED-mail: 20121010.1335814 20130509.1700484). Singapour aurait enregistré plus de 200 cas courant 2013. Une dizaine de cas ont été rapportés en Australie, dans la région du Queensland en juin 2013. Ils étaient tous importés de Papouasie Nouvelle Guinée. Les autorités australiennes étaient évidemment en alerte, craignant une éventuelle transmission autochtone étant données la présence d'*A. albopictus* et de conditions climatiques favorables dans cette région.

Enfin, la France ultramarine continue d'être touchée puisque 30 cas de Chikungunya autochtones étaient confirmés par les autorités sanitaires de Nouvelle-Calédonie depuis début 2013, incitant à la plus grande vigilance, compte tenu de la concomitance d'une épidémie de Dengue et d'un retour progressif de la saison chaude et humide propice aux moustiques (Le vecteur y est *A. aegypti* et la souche virale de lignage asiatique). Source: http://www.dass.gouv.nc/portal/page/portal/dass/observatoire_sante/veille_sanitaire/LeChikungunya

A-3 Retour sur les manifestations cliniques d'une maladie pas si bénigne...

La pathologie se développe généralement en 4 à 6 jours après la piqûre par un moustique infecté (avec des variations rapportées de 2 à 12 jours). Dans 95% des cas, elle démarre brutalement par une fièvre élevée (supérieure à 38,9°C). Une particularité de cette fièvre est qu'elle est relativement résistante aux antipyrétiques. Les premiers symptômes rapportés font fréquemment état de nausées et de vomissements et dans tous les cas d'arthralgies intenses. Ils sont souvent suivis, dans les 3 à 8 jours par un rash

cutané (dans 40 à 50% des cas). L'éruption est morbilliforme parfois maculo-papuleuse et accompagnée d'érythème palmaire. Elle touche principalement le torse et les membres, s'accompagne de démangeaisons et peut perdurer une dizaine de jours. Des taches dyschromiques d'hyper ou d'hypo-pigmentation ont été rapportées.

L'arthralgie est généralement bilatérale avec un gonflement extrêmement douloureux des articulations. Les poignets, chevilles, coudes, phalanges sont touchés, plus rarement les genoux. Les tableaux cliniques font parfois état d'œdèmes notamment facial, de gingivorrhagies, d'atteintes oculaires (uvéite, rétinite) qui n'ont pas produit de séquelles ultérieures (Mahendradas, Ranganna et al. 2008).

Les cas asymptomatiques sont marginaux : une enquête de séroprévalence menée à La Réunion a conclu qu'ils ne dépassaient pas 6%.

Les manifestations musculo-squelettiques et arthralgiques caractérisent l'épisode aigu qui dure entre 7 à 10 jours, mais celles-ci peuvent perdurer sur de longues périodes. Lors de la convalescence de plusieurs semaines, le patient est en proie à une importante asthénie et à des arthropathies encore douloureuses, erratiques, pas toujours symétriques. L'évolution reste variable car des manifestations arthralgiques persistantes et incapacitantes vont hélas parfois faire basculer la vie du patient dans la phase chronique du Chikungunya.

Je reviendrai un peu plus loin sur les différents aspects de cette phase chronique qui nous mobilise aujourd'hui au laboratoire, 7 ans après l'épidémie. En 2013, en effet, des patients se présentent encore régulièrement chez les rhumatologues de l'île pour des douleurs récurrentes ou des pathologies d'évolution sévère, de type polyarthrite rhumatoïde indiscutablement en lien avec le Chikungunya contracté des années auparavant.

A-3-1 Formes graves

Jusqu'à l'épidémie réunionnaise de 2005/2006 la maladie était considérée comme bénigne. La prévalence des différentes manifestations cliniques n'avait été que très peu décrite et des formes graves n'étaient pas vraiment connues.

La surveillance de ces formes émergentes, conduite dans les hôpitaux de l'île de La Réunion et rapportée dans la revue de BA. Gaüzere a dénombré chez les adultes plus de 200 cas très graves, parmi lesquels, une vingtaine de cas d'atteintes neurologiques (16 méningoencéphalites, 3 Guillain-Barré (polyradiculonévrite)), diverses atteintes centrales, des décompensations cardiovasculaires, des hépatites aiguës sévères, des insuffisances rénales, des atteintes cutanées sévères et diverses pathologies lourdes. Parmi les cas d'infection sévère, une centaine présentait des comorbidités et 27% en sont décédés (BA. Gaüzere, Médecine Tropicale 2011).

Des cas graves ont été enregistrés chez les enfants particulièrement chez les nouveaux nés de moins de 10 jours. Les infections néonatales étaient la conséquence d'une transmission de la mère à l'enfant lorsque la mère accouchait dans la première semaine suivant la déclaration de sa maladie, en pleine virémie. Les pathologies les plus sévères enregistrées étaient les méningoencéphalites. Dans près de 60% des cas, les nouveaux nés ont récupéré en quelques semaines. Il faut cependant déplorer, pour 22 d'entre eux,

pour lesquels le liquide cébrospinal était positif en RTPCR, des hémorragies cérébrales et des lésions de la matière blanche révélées par RMN. Ces enfants souffrent aujourd'hui de lourdes séquelles et ont présenté un important retard dans leur développement psychomoteur.

Les tableaux cliniques graves chez les enfants font également état d'importantes atteintes cutanées, érythèmes, bulles (Robin, Ramful et al. 2010) et épidermolyses conduisant à une desquamation sur des surfaces corporelles importantes.



Rash, bulles cutanées et desquamations en phase aigüe (photos empruntées à S. Robin, B. Lamey et (Pialoux, Gauzere et al. 2007)

Des cas graves, en particulier des atteintes neurologiques ont depuis également été rapportés en Inde (Lewthwaite, Vasanthapuram et al. 2009).

L'analyse à postériori des cas émergents, notamment avec neuro-tropisme a montré qu'ils étaient principalement survenus chez des sujets vulnérables : personnes âgées, individus porteurs de comorbidité, nouveau-nés et jeunes enfants (Das, Jaffar-Bandjee et al. 2010). Si les formes sévères émergentes ont créé la surprise au cours des dernières épidémies, il faut noter qu'elles correspondent à environ un cas sur 1000 et que la mortalité reste faible (inférieure à 1%). Soulignons cependant que le nombre de décès enregistrés s'est révélé supérieur à ce qui était connu et attendu et que cela a été corroboré par des taux de mortalité anormalement élevés à Maurice en 2006 et en Inde en 2007.

La sévérité des manifestations cliniques en phase aigüe a été corrélée à la charge virale. Celle-ci pourrait également prédisposer à la survenue de la phase chronique (Ng, Chow et al. 2009; Chow, Her et al. 2011).

A-3-2 Phase chronique et formes persistantes

Une évolution du Chikungunya vers des phases chroniques était connue depuis les premières épidémies. Dans les années 1980, une étude sud-africaine indiquait que 3 ans après avoir contracté la maladie, entre 4 et 18% des individus se plaignaient d'inconforts réguliers liés à des raideurs articulaires et 6% présentaient des douleurs permanentes accompagnées d'épanchements synoviaux. A l'occasion de cette étude, le liquide synovial de trois patients chroniques avait révélé des taux anormalement élevés d'anticorps anti-CHIKV (Brighton, Prozesky et al. 1983).

La Réunion, avec ses 266 000 personnes touchées en 2006 et une population relativement sédentaire, donne la formidable opportunité de pouvoir faire un point régulier sur les évolutions de la pathologie. Sur une moyenne de deux ans post infection, et selon les enquêtes réalisées, de 43% à 75% des gens rapportent, soit des douleurs permanentes qu'ils attribuent sans ambiguïté au Chikungunya et qui perdurent depuis l'épisode aigu (pour les 2/3), soit des manifestations récurrentes correspondant à la survenue irrégulière d'épisodes douloureux, qualifiés de 'rechutes' (pour le tiers restant)(Borgherini, Poubeau et al. 2008; Sissoko, Malvy et al. 2009; Manimunda, Vijayachari et al. 2010; Gerardin, Fianu et al. 2011). Parmi les manifestations persistantes, certains évoquent également des myalgies, des lésions cutanées et des dysfonctionnements cognitifs, ce jusqu'à trois ans après l'infection (Schilte, Staikovsky et al. 2013). Les articulations douloureuses sont celles qui avaient été touchées initialement. Elles sont parfois touchées de manière symétrique, mais ce n'est pas systématique. Elles concernent principalement les poignets, les doigts, les genoux et les chevilles et les résultats de l'enquête suggèrent qu'il n'y a pas de 'migration' des symptômes d'une articulation à une autre.

Le tableau ci-dessous emprunté à l'étude de Schilte et al., réalisée sur 3 ans sur une cohorte de 180 patients réunionnais donne un exemple des symptômes chroniques et des traitements auxquels les patients ont le plus souvent recours pour soulager leurs douleurs:

Clinical signs	With arthralgia	Without arthralgia	
Local swelling	39 (62.9%)	0 (0%)	***
Osteo-ligamentous pain	22 (35.5%)	0 (0%)	***
Myalgia	24 (38.7%)	0 (0%)	***
Cutaneous lesion	31 (50.0%)	5 (15.1%)	***
Asthenia	48 (77.4%)	7 (21.2%)	***
Sleeping disorder	35 (56.4%)	3 (9.1%)	***
Dysgeusia	11 (17.7%)	3 (9.1%)	NS
Depression	31 (50.0%)	2 (6%)	***
Memory disorder	27 (43.5%)	2 (6%)	***
Concentration disorder	24 (38.7%)	2 (6%)	***

Treatment			
Followed by a general practitioner	50 (80.6%)	1 (3%)	***
Treatment	51 (82.2%)	0 (0%)	***
Continuous treatment	25 (49%)	0 (0%)	***
Paracetamol	45 (72.5%)	0 (0%)	***
Morphinic	0 (0%)	0 (0%)	
Non-steroidal anti-inflammatory drugs	12 (23.5%)	0 (0%)	**
Corticosteroids	3 (5.9%)	0 (0%)	NS

Patients with arthralgia (n=62) Patients w/o arthralgia (n=33)

§ns: Non significant. **p<0.01. ***p<0.001.

La phase chronique peut prendre des aspects parfois extrêmement sévères.

La plus ancienne étude de cas remonte à un patient ayant contracté le Chikungunya dans les années 1950 en Angola et pour lequel un diagnostic de polyarthrite rhumatoïde a été posé en 1951 à l'aide de données radiographiques. Celles-ci indiquaient une importante érosion articulaire avec destruction extensive des métatarses du pied droit, un gonflement des chevilles, des genoux et des épaules (Brighton and Simson 1984). Une intervention chirurgicale réalisée sur la cheville et une biopsie indiquaient une synovite avec pannus. L'histologie faisait état d'une importante infiltration du tissu conjonctif synovial par des leucocytes, associée à une leucocytoclastose, c'est à dire des dommages au niveau des endothéliums vasculaires avec 'des débris leucocytaires et poussières nucléaires'. L'étonnante histoire de cette personne est qu'après avoir lu un article dans la presse sur la chronicité du Chikungunya, il s'est représenté 30 ans après les faits auprès de l'hôpital de Pretoria pour faire part de son expérience. Deux ans après le diagnostic de PR, il avait subi une ablation des têtes des métatarses qui lui avait apporté un certain répit, mais racontait qu'il avait continué à endurer des douleurs récurrentes avec des signes de synovites pendant encore 15 années. En 1983, soit 32 ans après les faits, les symptômes semblaient avoir par contre quasiment disparu.

Concernant les formes chroniques sévères détectées chez les patients réunionnais, plusieurs études ont été réalisées dont une de l'équipe, en collaboration avec les rhumatologues du CHU (Ribera, Degasne et al. 2012). Sur une première cohorte de 120 patients sélectionnés pour avoir présenté des manifestations articulaires plus de 3 mois après l'infection aiguë, un point réalisé en 2007, soit 18 mois post infection indiquait qu'un diagnostic de polyarthrite inflammatoire avait été posé pour 20% d'entre eux, avec un âge supérieur à 40 ans, un sexe-ratio plutôt en faveur de femmes touchées et un impact possible de pathologies sous-jacentes telles que le diabète. 9 avaient les symptômes d'une polyarthrite rhumatoïde, 7 ceux d'une polyarthrite sporigène et/ou spondylarthrite, 4 une périostite. Enfin 5 présentaient des symptômes moins sévères néanmoins marqués par d'importantes douleurs et des gonflements articulaires. Tous étaient, de façon surprenante, caractérisés par une absence des signes inflammatoires habituels des pathologies rhumatismales et présentaient des examens (hématogramme, vitesse de sédimentation, taux de protéine C-réactive et fibrinogène) parfaitement normaux.

Cinq ans après la primo-infection un bilan de ces patients indique un maintien du diagnostic et une évolution des périostites et des simples gonflement vers des tableaux plus sévères, soit de PR soit de spondylarthrite, ce qui a conduit les praticiens à proposer à ces patients un traitement par le méthotrexate ou par biothérapie anti-TNF α .



Exemples de manifestations chroniques :

Ténosynovite (inflammation du tendon), Gonflement arthritique au niveau du genou et Inflammation de la membrane du périoste observable à la radiologie

Une deuxième cohorte de 220 patients ayant consulté un rhumatologue à distance de la primo-infection a été constituée au fil du temps. Elle a également permis d'identifier 20% de formes sévères globalement de trois types : PR, spondylarthropathie ou rhumatisme 'inclassé d'expression spécifique'. Cette dernière catégorie a pu être corrélée à certains éléments du profil pathologique initial. Elle concernait en effet des patients ayant systématiquement présenté une pustulose et/ou desquamation plantaire en phase aiguë, des raideurs précoces des hanches, chevilles, tarses, épaules, poignets, ou des raideurs inter phalangiennes et métacarpo-phalangiennes. Ils n'avaient pas eu de synovite ni de chondrolyse et avaient présenté une régression spontanée de l'apposition périostée.

L'analyse du suivi de cohorte indique néanmoins une évolution plutôt favorable dans l'ensemble des patients à 5 ans, avec une amélioration clairement imputable au traitement immunomodulateur par le méthotrexate. Il faut souligner que les recherches d'anticorps antinucléaires, anti-DNA natifs, anti-CCP et facteur rhumatoïde n'ont pas permis d'identifier les marqueurs d'une auto-immunité habituellement caractéristique de ces symptomatologies.

Le Chikungunya s'avère être une maladie à fort potentiel de propagation de part le monde accompagnée d'une symptomatologie parfois sévère devant laquelle on reste encore très démuni.

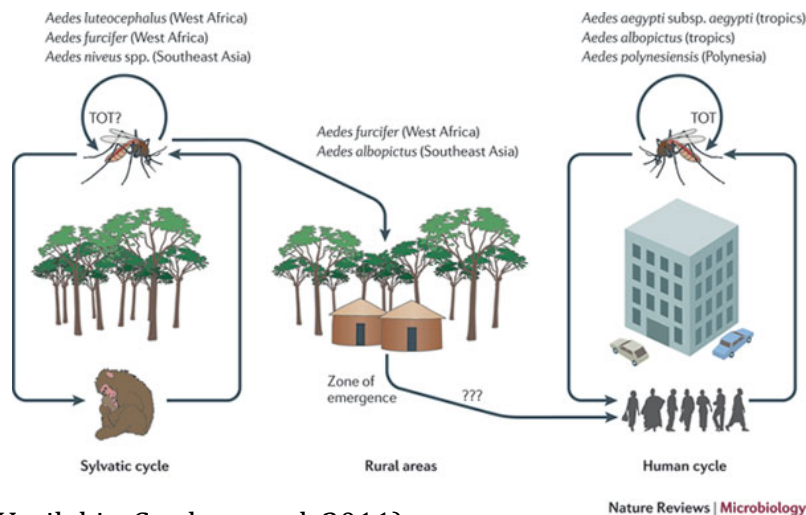
Si dans la plupart des cas, les symptômes disparaissent avec le temps, il y a émergence d'arthralgies chroniques préoccupantes dont il faut identifier les caractéristiques.

Enfin un état des lieux sur le Chikungunya ne peut pas se faire sans un retour sur les partenaires en jeu : Réservoir, vecteur, virus, hôtes, cellules cibles.

A-4 Cycle de transmission et caractéristiques du virus du Chikungunya (CHIKV)

A-4-1 Vecteurs et Réservoirs

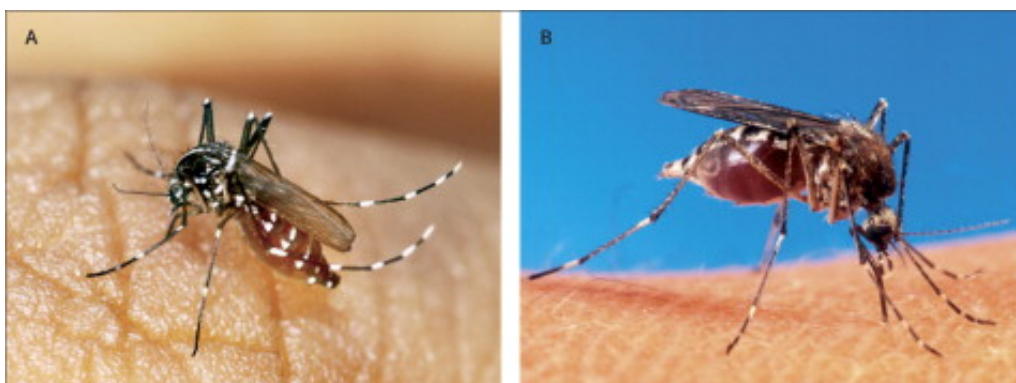
On considère deux types de cycles dans la transmission du virus: un cycle enzootique sylvatique et un cycle endémo/épidémique urbain.



Source : (Vasilakis, Cardoso et al. 2011).

Le cycle sylvatique africain implique les moustiques de la famille des Aedes comme vecteurs avec plusieurs espèces retrouvées telles que *A. furcifer*, *A. vittatus*, *A. fulgens*, *A. luteocephalus*, etc...) et des primates comme hôtes et réservoirs. *A. furcifer*, vecteur enzootique principal est connu pour s'introduire dans les villages où il transmet le virus du singe à l'homme (Peyrefitte, Rousset et al. 2007). Les *Aedes* sont les vecteurs incontestables de la transmission à l'homme, mais d'autres espèces de moustiques : *Culex annulirostris*, *Mansonia uniformis* et des anophèles ont occasionnellement été incriminés.

Dans la plupart des zones d'endémie en Asie, *A. aegypti* est le vecteur 'historique' et avec *A. albopictus*, ils constituent les vecteurs anthropophiles à l'origine des cycles urbains interhumains.

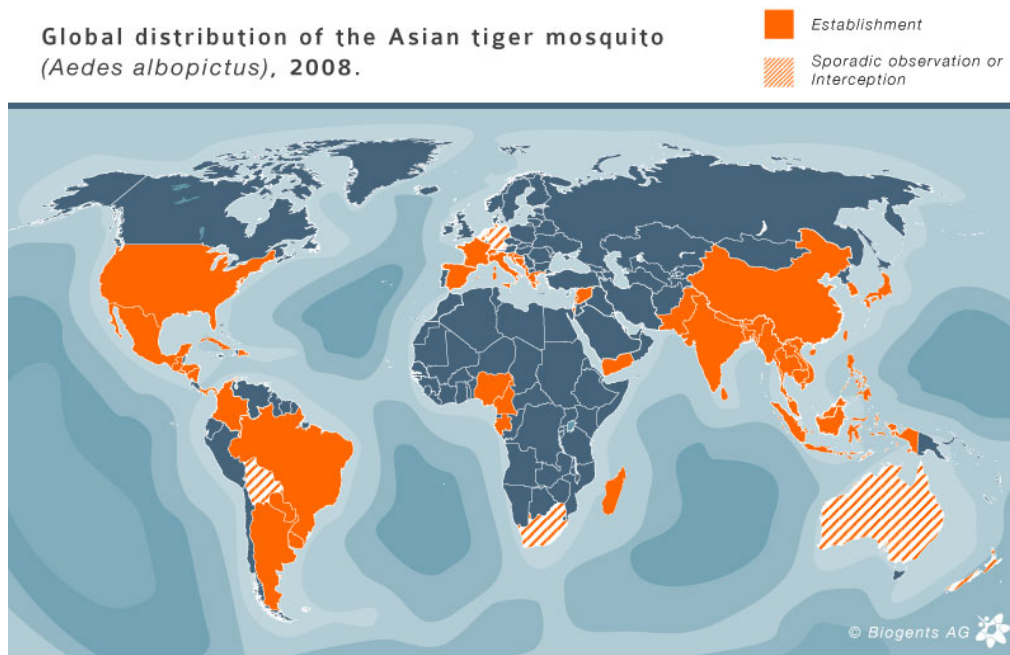


Moustiques vecteurs : photos empruntées à (Pialoux, Gauzere et al. 2007)

(A) Blood-gorged *A. albopictus* female feeding on a human host. *A. albopictus* is the primary Chikungunya virus vector in the current Indian Ocean outbreak.

(B) *A. aegypti* mosquito. *A. aegypti* is the primary Chikungunya virus vector in Asian Chikungunya outbreaks. Images from United States Department of Agriculture.

Le comportement et l'écologie de *A. aegypti* installé au plus près des zones urbaines et dont les femelles adultes préfèrent se nourrir sur les humains en font en effet un vecteur privilégié d'épidémies, au cours desquelles l'homme constituera le réservoir principal. Parallèlement, la compétence particulièrement réussie de *A. albopictus* pour la transmission du Chikungunya suscite une attention particulière, compte tenu de l'étendue des zones dans lesquelles ce moustique s'est établi. Il est présent non seulement dans quasiment toutes les zones tropicales mais également dans 12 pays européens, en Amérique centrale, en Amérique du sud et dans une partie des Etats-Unis.



On suppose que c'est la mondialisation des transports qui lui a permis de se répandre, une des hypothèses étant qu'il a voyagé à l'état larvaire à l'intérieur de pneus importés d'Asie dans les années 1980.

A. albopictus est un moustique particulièrement agressif, silencieux, actif jour et nuit. Il a un rayon d'action de 400 à 600m et il vit entre 4 et 8 semaines, soit plus longtemps que tous les autres moustiques. Initialement sylvatique, il s'est adapté aux milieux périurbains et est devenu anthropophile en plus d'être zoophile. Sa survie, de moins en moins dépendante des saisonnalités, à des latitudes et altitudes toujours plus élevées, avec des œufs résistants à la sécheresse, constituent autant d'éléments favorisant des populations en expansion. Une note positive néanmoins : la lutte anti-vectorielle s'est avérée efficace pour limiter les populations lorsqu'elles explosent en saison humide (Chevillon, Briant et al. 2008).

L'homme constitue donc le réservoir principal du virus en période épidémique. Les singes et quelques autres vertébrés pourraient constituer des réservoirs en Afrique et en Asie (lémuriens, chauve-souris). La séroconversion de nombreux vertébrés (chien, chats, porcs, chevaux) en période épidémique, notamment à la Réunion, a démontré qu'ils avaient été en contact avec le virus mais leur rôle de réservoir potentiel n'est pas

clairement établi. Il est à noter que d'anciennes études ont également montré que les oiseaux pouvaient être séropositifs pour le Chikungunya.

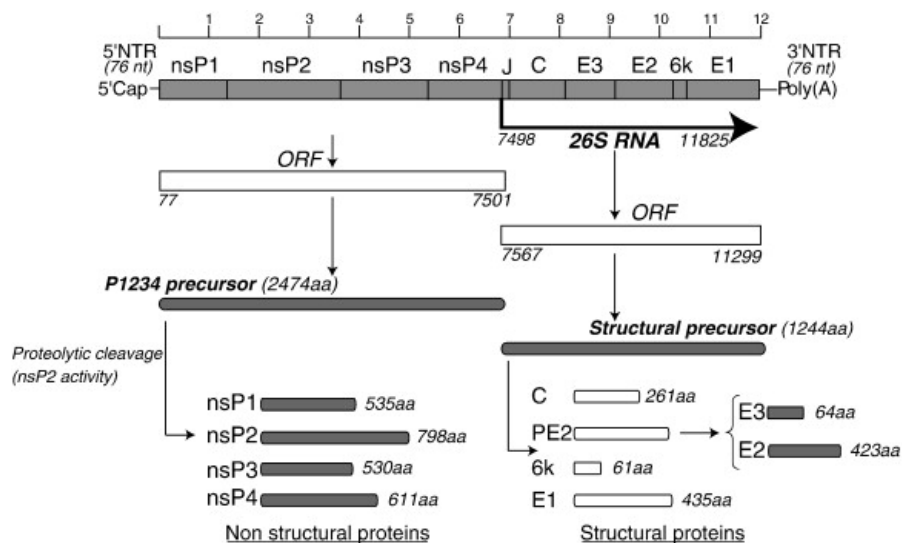
A-4-2 Les caractéristiques du virus

Le virus CHIKV est un arbovirus qui appartient au genre des Alphavirus (groupe IV), de la famille des Togaviridae. L'autre genre de la famille : les Rubivirus comprend le virus de la rubéole.

On compte une trentaine d'alphavirus. Les uns ont un tropisme neuronal et sont responsables d'encéphalites. Les autres parmi lesquels, on trouve Ross River (RRV), O'nyong nyong (ONNV) et Mayaro (MAYV) qui appartiennent comme CHIKV au complexe antigénique de Semliki, sont pathogènes pour l'homme en étant principalement arthritogéniques.

CHIKV est un virus enveloppé à ARN de polarité positive. Le virion, sphérique, dont le diamètre est de 60 à 70 nm, possède une enveloppe délimitant une capsid de structure icosaédrique. L'enveloppe est une bicouche lipidique provenant de la membrane plasmique cellulaire avec 2 glycoprotéines virales intégrées E1 (48kDa) et E2 (52kDa).

Le génome d'environ 11,7kb est coiffé en 5' et polyadénylé en 3'. Il code pour 5 protéines structurales et 4 non structurales, organisées par deux phases ouvertes de lecture. L'ORF en 5' code pour les protéines nsP 1 à 4 qui ensemble, vont former la réplisome. L'ORF en 3' code les protéines structurales maturées à partir d'une polyprotéine.



A-4-3 Cycle de réplication

Une fois libéré dans le cytoplasme, probablement à partir d'endosomes de pH acide et suite à la dissociation de E2 et à l'activité fusogène de E1, le génome viral est décapsidé et sert de matrice pour une traduction cytosolique. Les étapes du cycle de réplication sont supposées être très proches de celles largement documentées des alphavirus de la famille : Sindbis (SINV) et Semliki (SFV) (Jose, Snyder et al. 2009).

La traduction de la première ORF génère un précurseur polyprotéique P1234 ensuite maturé pour donner les 4 protéines non structurales. nsP1 possède des activités

méthyl-transférase et guanyl-transférase; nsP2 est une hélicase également responsable de l'activité protéase nécessaire à la maturation de la polyprotéine; nsP3 une protéine accessoire impliquée dans la synthèse d'ARN et nsP4 est l'ARN polymérase RNA dépendante qui permet la production du brin négatif. Une partie des protéines nsP vont s'associer à l'ARN viral pour former les complexes réplicatifs dans lesquels on trouvera des intermédiaires double brin (dsRNA) (Strauss and Strauss 1994). L'assemblage des complexes réplicatifs bénéficie d'une association à des structures membranaires qui conduisent à la formation de vacuoles cytopathiques (CPV) principalement observées en zone périnucléaire. Ces vacuoles constituent des sortes d'organelles de 0.6 à 2µm de diamètre, de nature principalement endo-lysosomale(CPV1) (Grimley, Berezesky et al. 1968; Froshauer, Kartenbeck et al. 1988; Spuul, Balistreri et al. 2010). Des vacuoles de nature trans-golgienne (CPV2), ont également été identifiées. Elles seraient plutôt impliquées dans l'assemblage des virions (Garoff, Sjoberg et al. 2004; Soonsawad, Xing et al. 2010). Des travaux indiquent que les complexes réplicatifs pourraient également être rencontrés au niveau de la membrane plasmique (Frolova, Gorchakov et al. 2010; Varjak, Saul et al. 2013).

Le deuxième polypeptide, traduit à partir de l'ARN subgénomique, code pour les protéines structurales : capsid et glycoprotéines d'enveloppe. Le précurseur clivé libère la protéine C dans le cytoplasme. E3-E2-6K-E1 gagne quant à elle le Reticulum endoplasmique où une maturation permet l'oligomérisation de E1 et E2 ensuite transportées vers Golgi puis jusqu'à la membrane plasmique. Les particules contenant l'ARN encapsidé s'assemblent au niveau des membranes qui bourgeonnent pour produire les virions.

A-4-4 Phylogénèse virale et signature moléculaire de la souche réunionnaise

Sur la base de la structure de E1, trois souches ont été distinguées : la souche asiatique, la souche ouest-africaine, la souche sud et centre-est africaine (ECSA)(Schuffenecker, Iteman et al. 2006; Lo Presti, Ciccozzi et al. 2012). Les souches africaines et asiatiques auraient divergé au cours des 150 dernières années et les variations entre souches reflètent le mode de circulation des virus (Powers, Brault et al. 2000).

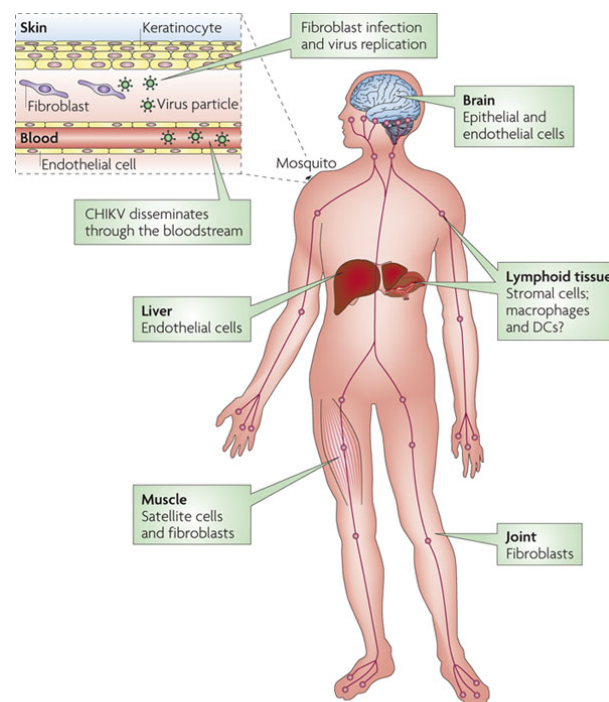
L'isolat viral responsable de l'épidémie à la Réunion constitue un cluster dans le groupe ECSA. En effet, l'analyse phylogénétique des virus circulant au cours de la transmission *A. albopictus*/homme a révélé l'acquisition d'une mutation dans la protéine E1 en position 226 avec une Alanine substituée par une Valine : A226V. Cette singularité ainsi que les mutations M269V et D284E constituent des signatures moléculaires des épidémies dans l'Océan Indien (Schuffenecker, Iteman et al. 2006; Arankalle, Shrivastava et al. 2007). La mutation A226V concernait 90% des isolats réalisés à la Réunion après décembre 2005. Elle serait à l'origine d'une exceptionnelle adaptation du virus au vecteur *A. albopictus* avec un passage plus rapide de la barrière intestinale et une présence du virus dans les glandes salivaires du moustique dès 48h après le repas sanguin (Tsetsarkin, Vanlandingham et al. 2007; Vazeille, Moutailler et al. 2007).

Ce gain en efficacité, en plus d'autres facteurs indéniables tels que l'absence d'immunité dans la population, une saison des pluies favorable à la prolifération des moustiques,

sont probablement à mettre au crédit de la spectaculaire explosion épidémique de janvier/février 2006 à la Réunion. Par contre, une corrélation directe entre la mutation et l'émergence de manifestations graves dont les encéphalites semble discutable. Des travaux réalisés en comparant trois souches dérivées du groupe ECSA n'ont montré aucune différence de tropisme et de comportement cytopathique sur différents types cellulaires. Ils ont par contre confirmé que les souches les plus récentes, dont la A226V présentaient une meilleure infectivité vis à vis des cellules d'insectes (C6/36) (Wikan, Sakoonwatanyoo et al. 2012). Ce résultat confirmait une précédente étude dans laquelle la souche A226V n'avait pas montré de compétences particulières dans des cellules de mammifère et s'était même avérée plus sensible à l'action antivirale d'un interféron-alpha (IFN- α) recombinant (Bordi, Meschi et al. 2011).

A-5 Dissémination du virus dans l'organisme et tropisme cellulaire.

L'inoculation de CHIKV est la conséquence du repas sanguin qu'effectue une femelle moustique infectée. La réplication virale débute vraisemblablement au niveau du derme, au site de piqûre, où plusieurs types cellulaires de la peau pourraient être susceptibles et permissifs au virus (fibroblastes, kératinocytes). Cette réplication semble relativement limitée dans le temps et les virus produits sont rapidement disséminés via la circulation sanguine et lymphatique d'où ils gagneraient le foie, les organes lymphoïdes, les muscles et articulations. Les données obtenues à partir de biopsies de patients ont indiqué que les antigènes viraux sont principalement détectables au niveau de l'épimysium des muscles squelettiques, du derme et de la membrane synoviale des capsules articulaires (Couderc, Chretien et al. 2008).



Nature Reviews | Microbiology

D'après Schwartz, O & Albert, ML (Schwartz and Albert 2010)

Les tissus conjonctifs sont en effet très touchés comme en témoignent aussi des études faites *in vitro* et sur des modèles animaux (Ozden, Huerre et al. 2007; Labadie, Larcher et al. 2010). La virémie en phase aigüe est caractérisée par une charge virale exceptionnelle : 10^9 à 10^{12} particules virales sont mesurables par ml de sang dans les 2 à 7 jours qui suivent l'inoculation. La source exacte d'une telle production fait encore débat. D'ailleurs concernant les cellules sanguines, et alors que la phase aigüe est caractérisée par une lymphopénie marquée, il faut admettre que le virus n'infecte pas les cellules B ni les T et que les résultats restent controversés pour les monocytes/macrophages.

A-5-1 Cellules cibles identifiées *in vitro*

De nombreuses études ont été menées *in vitro* pour identifier les cibles privilégiées du virus. Toutes convergent vers le 'fibroblaste' comme cible principale, ce qui était d'ailleurs connu depuis les années 1970 (Hahon and Zimmerman 1970). Diverses données obtenues par notre équipe et d'autres sur des cultures primaires de fibroblastes issues de la peau et de tissus synoviaux ou sur des lignées (MRC5, HST) supportent ce postulat (Sourisseau, Schilte et al. 2007; Schilte, Couderc et al. 2010; Krejbich-Trotot, Denizot et al. 2011; Thon-Hon, Denizot et al. 2012). Ces différentes études indiquent néanmoins que tous les fibroblastes ne se comportent pas de manière équivalente face à l'infection par CHIKV *in vitro*. Nous avons en particulier noté des différences selon que les échantillons provenaient de tissu synovial ou de tendon et une sous-population CD141+/CD90+ s'est avérée totalement résistante. Les mécanismes sous tendant ces variations comportementales sont largement inconnus à ce jour.

A partir d'études menées sur des lignées cellulaires, il a été montré que CHIKV a un tropisme pour les cellules adhérentes, épithéliales (ce qu'on a effectivement vu avec les HeLa et les HEK293) et endothéliales. Parmi les types cellulaires testés dans lesquels une réplication virale a pu être montrée, on dénombre les hépatocytes, les cellules musculaires progénitrices et satellites (Ozden, Huerre et al. 2007), les neurones, neuroblastomes et les astrocytes (Solignat, Gay et al. 2009; Das, Jaffar-Bandjee et al. 2010).

Les études effectuées sur les cellules immunes indiquent que les lignées lymphoïdes, les NK et les cellules dendritiques sont pas ou peu permissives. Il y a débat autour des monocytes/macrophages, non infectables selon les uns (THP1, U937, H9), susceptibles selon certains (Her, Malleret et al. 2010), faiblement susceptibles et peu productifs selon les autres (Sourisseau, Schilte et al. 2007; (Solignat, Gay et al. 2009). Je raconterai un peu plus loin comment nous avons apporté notre contribution à ce débat en mettant en évidence un mécanisme original d'infection des macrophages à l'occasion de leur fonction phagocytaire de débris et corps apoptotiques chargés de virus ou de complexes immuns. Néanmoins, si les macrophages semblent infectés et répliquent le virus comme nous avons pu le montrer par une détection de brins positifs et négatifs du génome, ils ne semblent pas productifs de particules virales (voir le chapitre B 3-3).

S'il est acquis que l'entrée du virus repose sur un processus d'endocytose impliquant probablement la clathrine et la dynamine, qu'elle dépend du cholestérol, du trafic des

membranes endosomales et de l'acidification du contenu des endosomes (Sourisseau, Schilte et al. 2007; Bernard, Solignat et al. 2010), la permissivité des cellules suppose qu'elles sont dotées d'un récepteur dédié à cette entrée. Cependant, l'identification formelle d'une molécule de surface nécessaire et suffisante pour induire l'interaction du virus et déclencher son endocytose s'est pour l'instant soldée par un échec, dans les cellules de moustiques, comme dans celles de mammifères. Les candidats sont pourtant nombreux, entre autres, pour leur implication documentée dans l'interaction d'autres alphavirus. Ont été proposés: le récepteur de la laminine, des protéoglycane membranaires, une lectine de type-C, DC-SIGN, NRAMP (Leung, Ng et al. 2011), et plus récemment la prohibitine dans la microglie (Wintachai, Wikan et al. 2012).

A-5-2 Données obtenues de l'étude d'infections menées sur modèles animaux

La souris a été d'emblée utilisée pour étudier la physiopathologie virale. Le modèle développé par T. Couderc et al. avec des souris C57-B16, infectées par la souche virale isolée à la Réunion a montré que la susceptibilité à l'infection dépendait de l'âge de l'animal. Les effets les plus marqués intervenaient pour les souris en période néonatale (Couderc, Chretien et al. 2008). Les symptômes observés, léthargie, faiblesse musculaire, pouvaient être rapprochés de ceux classiquement observés chez l'homme avec un tropisme similaire du virus pour la peau, les muscles et les articulations, associé dans les cas les plus sévères, à une atteinte du système nerveux central. Enfin, une infection très sévère, létale en 2-3 jours, était obtenue pour des souris KO pour le récepteur de l'IFN- α , indiquant l'importance de la signalisation interféron dans le contrôle de l'infection par l'organisme. Ces données ont été confirmées par d'autres équipes sur d'autres modèles (Ziegler, Lu et al. 2008; Morrison, Oko et al. 2011). L'étude des manifestations musculo-squelettiques et rhumatismales reproduites (téno-synovites, arthrite persistante) a révélé un contexte inflammatoire local avec infiltration de monocytes, de macrophages et de cellules NK, associé à une détection accrue de MCP-1, TNF- α , d'IFN- γ ainsi qu'une présence d'IFN- α et β et d'Interleukine 6 (IL6) (Gardner, Anraku et al. 2010; Rulli, Rolph et al. 2011). De manière surprenante, une expérience de déplétion des macrophages chez la souris infectée s'est soldée par une augmentation de la virémie mais avec une amélioration très nette de la pathologie rhumatismale. Notons également que les travaux menés chez la souris avec la souche réunionnaise semblent s'accorder sur une sévérité accrue de la pathologie par rapport à d'autres souches virales (asiatique ou Ross africaine) (Wang, Volkova et al. 2008; Gardner, Anraku et al. 2010).

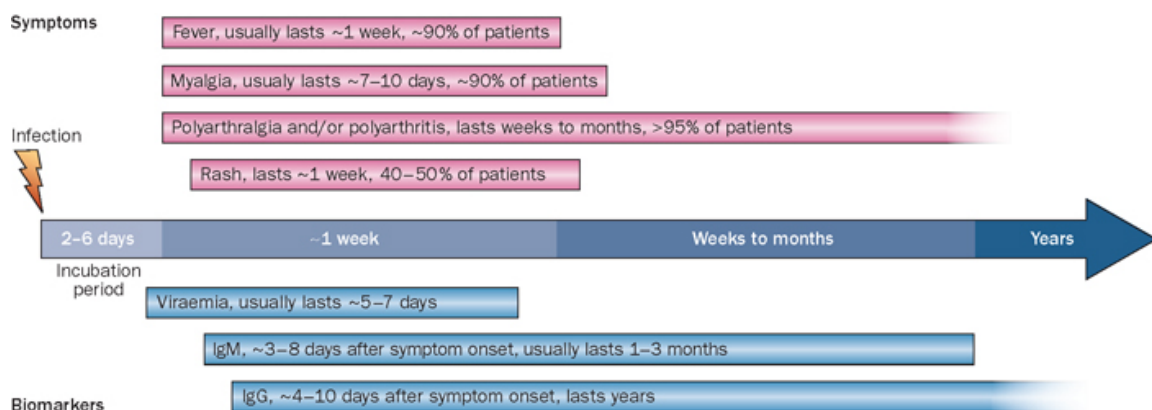
Des données essentielles ont été acquises suite aux études réalisées sur les primates non humains. Les singes sont particulièrement appropriés, d'une part parce qu'ils constituent des réservoirs identifiés en Afrique et en Asie et que l'interaction avec le virus n'est donc pas artificielle; d'autre part parce qu'ils ont un système immunitaire très proche du nôtre. Leurs modes de défenses antivirales peuvent donc nous instruire sur les relations du virus avec son hôte. Leur contribution à différents travaux scientifiques, notamment dans des perspectives vaccinales ne date d'ailleurs pas d'aujourd'hui. Un modèle développé dans les années 1970 utilisant des singes rhésus

inoculés par voie intraveineuse avait permis de préciser le déroulement de la phase aiguë (Binn, Harrison et al. 1967; Levitt, Ramsburg et al. 1986). Le modèle utilisant les macaques cynomolgus (*Macaca fascicularis*) développé depuis par Labadie et al. permet de reproduire une pathologie très semblable à celle de l'homme. La phase aiguë est caractérisée par une virémie dès 6h post inoculation, une importante lymphopénie et une réponse pro-inflammatoire marquée, associée à une forte infiltration des tissus par des monocytes/macrophages. Le virus cible les organes lymphoïdes, le foie, le système nerveux central, les articulations et les muscles où il a pu être détecté au niveau de macrophages, de quelques cellules dendritiques et de certaines cellules endothéliales. Des données très intéressantes en regard de ce qui est observé chez l'homme et *in vitro*, concernent la persistance du virus dans différents tissus 3 mois après l'épisode aigu, avec des macrophages identifiés comme réservoirs (Labadie, Larcher et al. 2010). Une étude récente montre que l'âge des macaques et leurs compétences immunitaires seraient déterminants pour le contrôle de l'infection (Messaoudi, Vomasse et al. 2013). Les macaques fournissent un modèle prometteur pour l'étude à long terme de la pathologie Chikungunya.

Globalement, les études menées sur modèles animaux indiquent que l'âge de l'hôte, son statut immunitaire, la virulence et l'installation d'une persistance virale, constituent des facteurs importants pour l'évolution de l'infection.

A-6 Immunopathogénèse et réponses antivirales

La virémie, période de présence du virus dans le sang et donc de transmission possible, concerne les premiers jours de la période symptomatique. C'est au cours de cette période que le génome viral peut être mis en évidence dans l'organisme par RT-PCR. Les anticorps immunoglobulines de type M (IgM) apparaissent vers le 5^e jour et persistent plusieurs mois. Les IgG apparaissent à partir du 15^e jour. Elles sont spécifiques du Chikungunya et semblent protectrices pour plusieurs années, voire décennies.



D'après (Suhrieb, Jaffar-Bandjee et al. 2012)

L'immunité est donc estimée acquise à vie, ce qui signifie en l'état actuel des connaissances qu'une personne ayant eu le Chikungunya ne peut être atteinte une

deuxième fois (Panning, Grywna et al. 2008). La réponse immunitaire adaptative est très rapide et robuste.

Un des objectifs de l'équipe a été de caractériser cette réponse. Nous avons montré que les premiers jours de l'infection étaient marqués par une mobilisation massive de cellules NK suivie par une activation modérée des lymphocytes T CD4⁺/CD8⁺. Cette activation s'accompagne d'une faible réponse cytokine Th1/Th2, associée à des taux d'IL1- β et de TNF- α peu augmentés en regard des contrôles (Hoarau, Jaffar Bandjee et al. 2010).

Certaines études suggèrent une dichotomie de la réponse avec des taux élevés de cytokines Th1 (IL-12, IFN γ) mesurables dans le même temps que de l'IL-4, IL-13 et IL-17 et une mobilisation Th2/Th17 (Werneke, Schilte et al. 2011). De l'IL-10 a par ailleurs été détectée (Chaitanya, Muruganandam et al. 2011) (Wauquier, Becquart et al. 2011). D'autres études enfin ont corrélé un taux important de certaines cytokines avec la sévérité de la phase aiguë : IL1- β , IL-6 et RANTES pour l'étude de Singapour (Ng, Chow et al. 2009), ou comme valeurs prédictives de la résolution de l'infection et d'une possible évolution vers la chronicité : taux important d'IgG, présence des chemoattractants CXCL9 et CXCL10 dans l'étude réalisée en Italie (Kelvin, Banner et al. 2011).

Une des caractéristiques de la pathologie Chikungunya réside dans un contrôle particulièrement rapide de la virémie pourtant exceptionnelle en début de phase symptomatique. Une réponse rapide de l'organisme au travers d'une production très précoce d'interférons puis d'anticorps en est très certainement responsable (Couderc, Chretien et al. 2008; Couderc, Khandoudi et al. 2009). L'origine cellulaire de cette réponse fait encore débat. Pour les uns, l'activité de limitation de l'infection semble exclusivement orchestrée par les cellules non hématopoïétiques (Schilte, Couderc et al. 2010). Pour d'autres les monocytes hébergeraient le virus à un stade très précoce de la phase aiguë et permettraient une infection productive (montrée *in vitro*) qui expliquerait l'important titre viral et la lymphopénie. Ils seraient par ailleurs responsables de la réponse interféron et du contrôle rapide de la réplication virale dans le sang (Her, Malleret et al. 2010).

Le virus reconnu par des récepteurs cellulaires de l'immunité innée (PRR) induit une réponse interféron dont les intermédiaires de signalisation tels que IRF-3 et IRF-7 sont activés dans les fibroblastes infectés (Schilte, Buckwalter et al. 2012). Néanmoins, il y a de fortes présomptions pour que CHIKV ait développé un certain nombre de stratégies de contournement des réponses antivirales et notamment la réponse interféron.

Des données indiquent qu'il est par exemple capable de bloquer la traduction des protéines cellulaires en inactivant le facteur eIF2a d'initiation de la traduction par une voie dépendant de l'interaction de l'ARN double brin (ARNds) avec la protéine kinase R (PKR) (White, Sali et al. 2011). Simultanément, il interférerait avec la réponse physiologique de la cellule à l'accumulation de protéines mal repliées ou UPR (Unfolded Protein Response) en régulant la voie PERK (PKR-like ER resident kinase) (Rathore, Ng et al. 2013). Entre 3 et 24h post infection, CHIKV semble en effet réussir à retarder la

phosphorylation de eIF2a ce qui autorise une production accrue de protéines virales sans induire le stress et ses réponses.

Le stress du réticulum et la réponse UPR participent à la signalisation d'un danger en lien avec la présence virale puisque la réplication virale conduit à une production accrue de protéines au niveau du RE. Ces mécanismes font partie des premiers moyens de défense cellulaire pouvant limiter la multiplication virale, instruire la cellule du danger et participer notamment au choix d'engager la cellule dans l'apoptose.

Des travaux menés par l'équipe ont montré que dans des fibroblastes infectés, si une réponse conduisant à la production d'interféron était bien active, la capacité de réaction à la présence d'interféron était court-circuitée. Le virus dans ces cellules semble pouvoir interférer avec la translocation vers le noyau de P-STAT1 et ainsi contrôler en partie la mise en place du programme anti-viral normalement induit suite à l'interaction de l'interféron avec son récepteur (Thon-Hon, Denizot et al. 2012).

Confortant cette capacité d'interférence avec la réponse à l'interféron, des travaux ont montré que nsP2 pourrait directement inhiber la voie Jak/STAT en aval du récepteur de l'interféron (Fros, Liu et al. 2010).

Le virus du Chikungunya, transmis par la piqûre d'un moustique de type *Aedes* infecte plusieurs cibles cellulaires chez l'homme, préférentiellement les fibroblastes. Son importante multiplication est responsable d'une virémie exceptionnelle et induit de la part de l'hôte une réponse immune robuste qui dépend d'une production précoce d'interférons. L'immunité acquise est durable mais le contrôle de l'infection dépend d'un jeu subtil qui repose manifestement sur les capacités, et de l'hôte et du virus, à déjouer plusieurs stratégies mises en œuvre pour répondre à l'infection et réciproquement détourner cette réponse. Les mécanismes de ces relations particulières sont à éclaircir pour mieux appréhender le développement des formes graves et chroniques et identifier les meilleures réponses thérapeutiques.

B OBJECTIFS ET RESUMES DES TRAVAUX REALISES

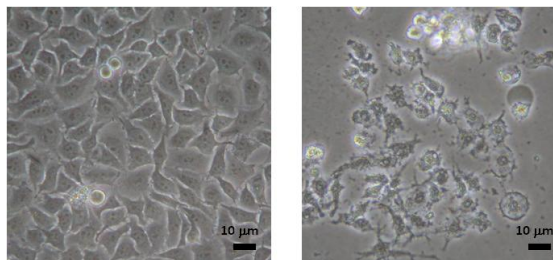
La mise en place d'un modèle d'infection *in vitro* s'est avérée essentielle pour permettre l'étude des relations fines qui s'établissent entre le virus et les cellules et comment chacun négocie avec la stratégie de l'autre.

Les données physiologiques de l'infection aiguë, au travers des symptômes musculo-squelettiques et arthralgiques, associés parfois à des épidermolyses et une lymphopénie suggéraient une importante action cytopathique du virus et ce sur différentes cibles cellulaires. C'est tout naturellement, avec l'expérience qui était la mienne dans le domaine de l'apoptose, acquise lors de mon séjour à l'UVSQ dans l'équipe de Jean-Luc Vayssière et de Bernard Mignotte, que j'ai proposé de regarder la nature des effets cytopathiques et donc le type de mort cellulaire induite par le virus Chikungunya.

B-1 Etude des effets cytopathiques du virus du Chikungunya (CHIKV)

Résultats publiés dans FASEB Journal en 2010 Titre: *Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses. (Annexe 2)(Krejchich-Trotot, Denizot et al. 2011)*

Afin de modéliser l'infection *in vitro*, nous avons opté dans un premier temps pour un modèle cellulaire dont on savait qu'il était sensible au virus : les HeLa, lignée de cellules épithéliales provenant d'un carcinome cervical humain. Après avoir vérifié que l'infection s'accompagnait d'un important effet cytopathique principalement marqué à 48H post infection (images de microscopie photonique ci-dessous), nous avons entrepris d'explorer les modalités et le type de mort cellulaire induite par le virus.



HeLa Contrôle

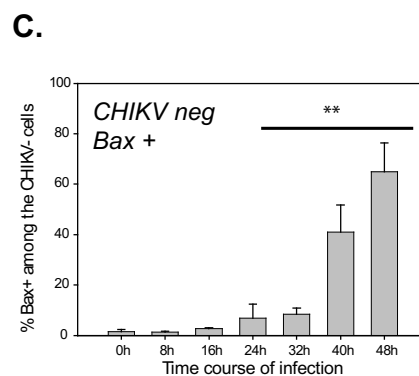
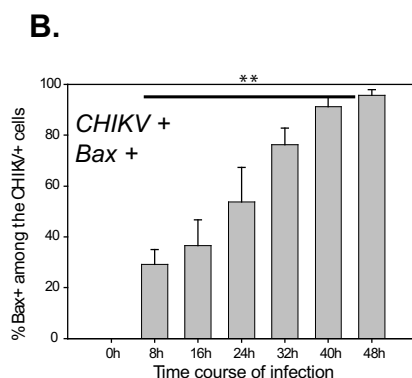
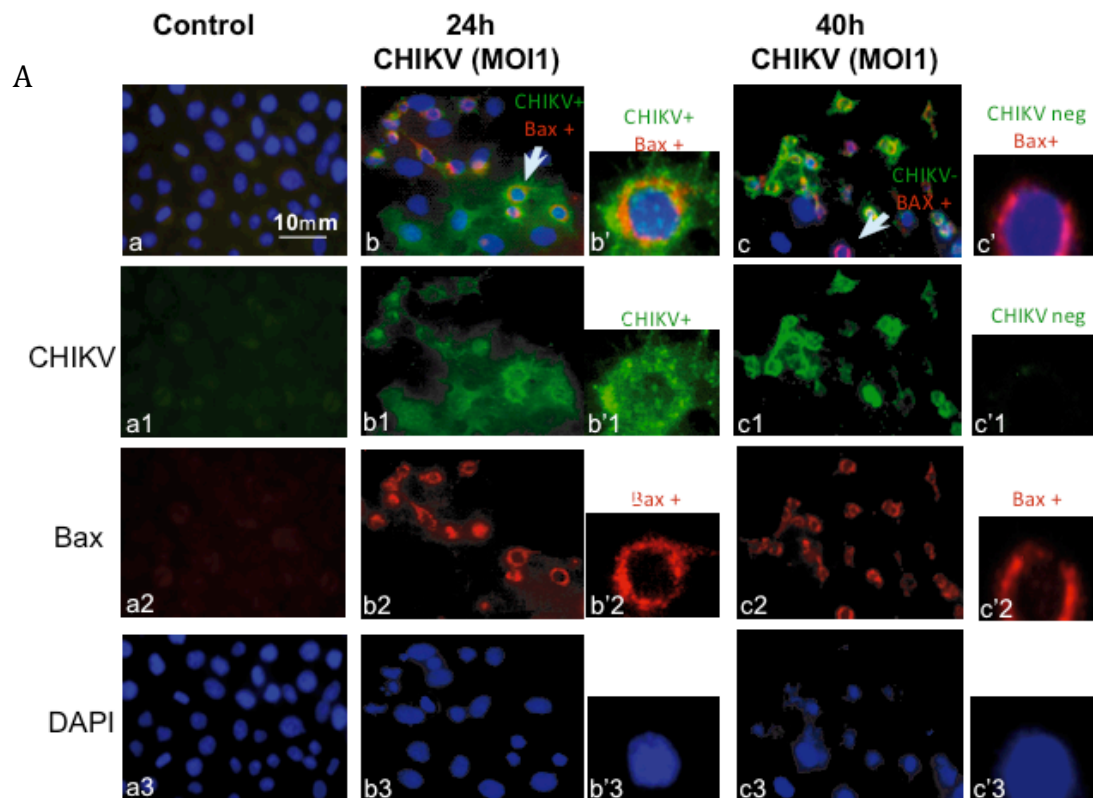
HeLa 48h post-infection
CHIKV (moi 1)

B-1-1) CHIKV induit l'apoptose en deux temps

Nous avons réalisé sur les HeLa des cinétiques d'infection pour différentes MOI (multiplicité d'infection) de 0,1/1 et 10. Nous avons d'une part suivi la production virale, par quantification des ARN viraux produits dans le surnageant et par mesure de la TCID50 de la suspension virale collectée. Nous avons d'autre part évalué parmi les cellules infectées, considérées comme 'chik positives' en immunodétection, celles qui présentaient des signes d'apoptose. Des marqueurs précoces de l'engagement dans l'apoptose tels que la relocalisation de Bax à la mitochondrie ou la présence de cytochrome c cytosolique ont été recherchés, de même que des signes plus tardifs de l'exécution du programme de mort grâce à la détection des produits de dégradation de

la caspase 3 (tels que PARPclivé). La présence de ces signatures moléculaires nous a confirmé que les cellules infectées entraient en apoptose et que celle-ci dépendait bien de la réplication virale puisque du virus inactivé au U.V. n'était pas en mesure de produire d'effet cytopathique.

L'analyse fine des séquences d'apparition des marqueurs mitochondriaux de l'apoptose (relocalisation de Bax ou sortie du cytochrome c) et des produits de clivage de la caspase-3 nous a permis de distinguer une mort induite précocement dans les cellules infectées, tandis qu'une apoptose bystander intervenait plus tardivement (40h) et concernait des cellules dans lesquelles le virus n'était pas encore détectable.

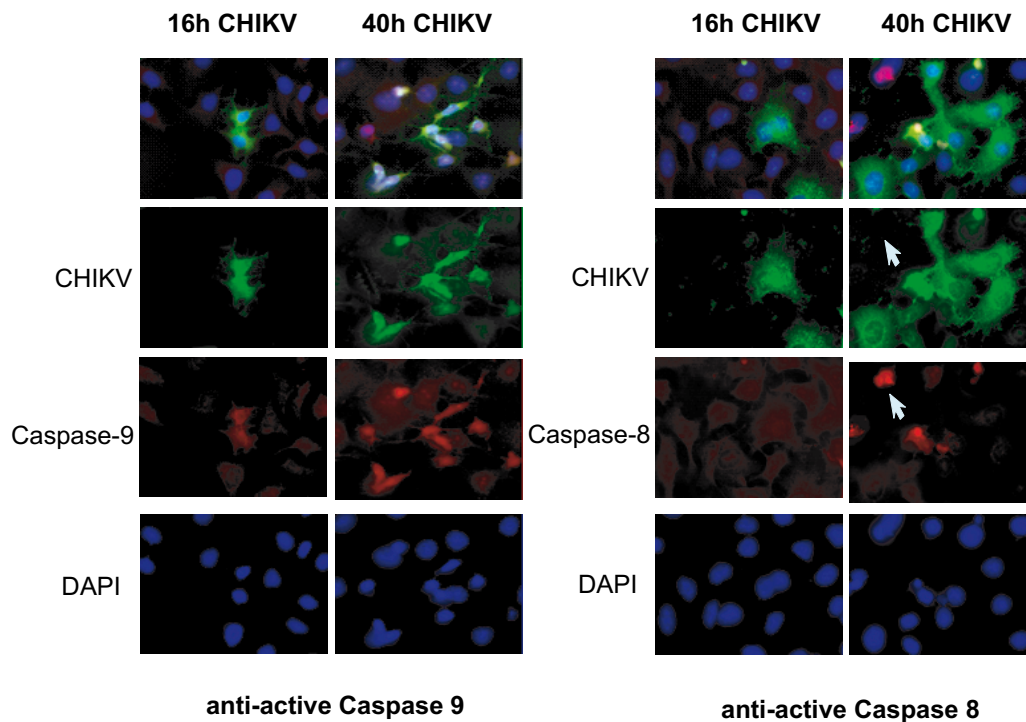


A: HeLa infectées par CHIKV MOI 1 observées au microscope à fluorescence après immuno-marquage de E1 (vert) et de Bax (rouge) et marquage dapi.

B: % de cellules présentant un marquage CHIK et un Bax relocalisé à la mitochondrie durant la cinétique d'infection

C: % de cellules dépourvues de marquage CHIK avec Bax relocalisé à la mitochondrie

En identifiant dans chaque cas la caspase initiatrice impliquée (images des immunofluorescences ci-dessous), nous avons confirmé que l'apoptose précoce des cellules infectées était dépendante de la caspase-9 avec implication de la voie intrinsèque dès 8h post infection. Une apoptose tardive corrélée à l'activation de la caspase-8 détectable après 24h suggérait une mobilisation dans un deuxième temps d'une voie extrinsèque.

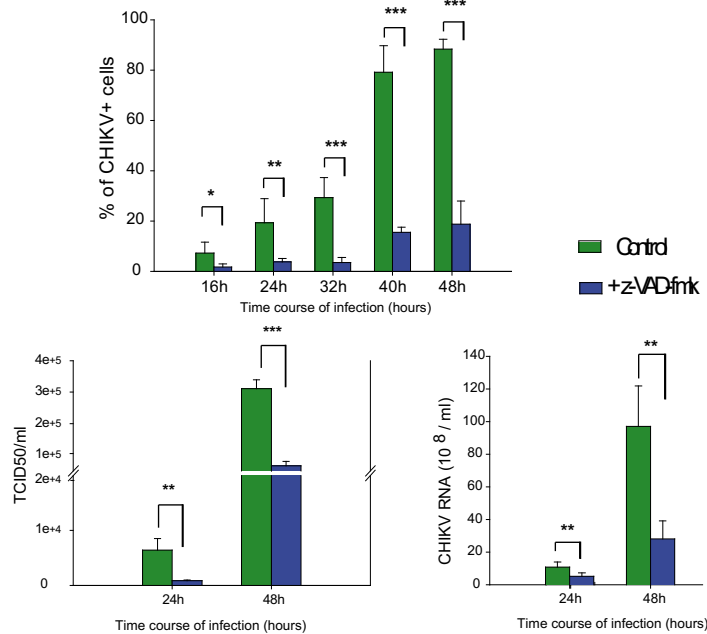


B-1-2) Une inhibition de l'apoptose limite l'infection

L'apoptose est un moyen primitif de défense des cellules mis en jeu lorsque l'intégrité de la cellule est en danger. En déroulant son programme d'autodestruction la cellule doit pouvoir court-circuiter la multiplication virale. C'est pourquoi nombre de virus ont déployé des mécanismes visant à inhiber ou à retarder ce processus qui leur est dans la grande majorité des cas défavorable.

Nous nous sommes donc demandé quels seraient les effets d'une inhibition de l'apoptose sur le comportement du virus. Nous avons commencé par des inhibiteurs pharmacologiques des caspases à savoir le DEVD-cho, inhibiteur spécifique de la caspase-3 exécitrice et le Z-VAD-fmk, inhibiteur à large spectre, capable donc de bloquer aussi les caspases initiatrices 9 et 8.

Les premiers résultats obtenus ont été pour le moins inattendus. Il est rapidement apparu que loin de favoriser CHIKV, une inhibition de l'apoptose aboutissait à une diminution du nombre de cellules infectées et à un titre viral réduit de près de 60%.



Se pouvait-il que le virus détourne à son profit le mécanisme de destruction cellulaire censé justement le limiter? Dans ces conditions, quel mécanisme lié à l'apoptose le virus utilise-t-il pour optimiser son processus infectieux ?

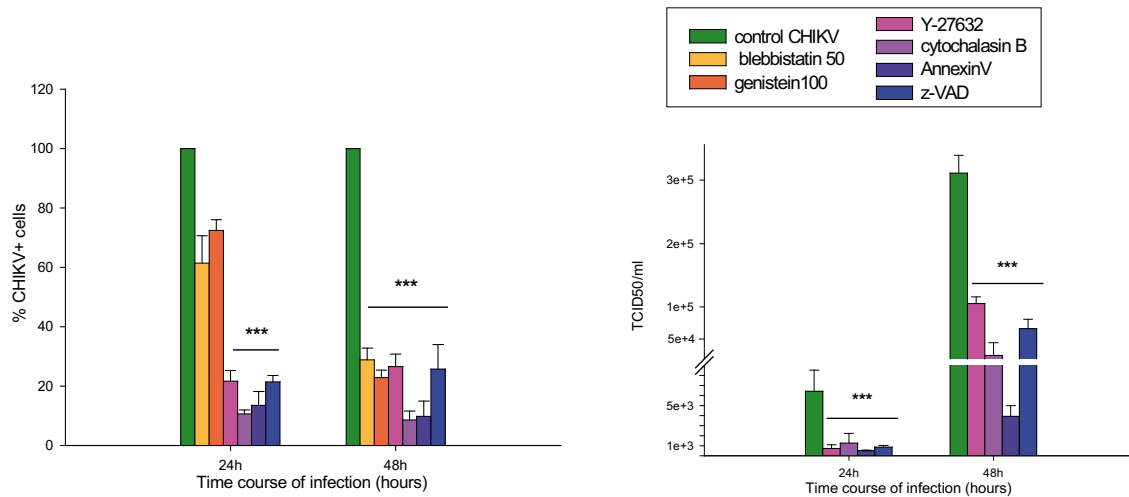
B-1-3) L'inhibition de la production des corps apoptotiques ou de leur internalisation limite la dissémination du virus

Nous avons élargi le nombre des inhibiteurs à tester à des molécules pouvant interférer avec différents processus liés à l'apoptose. Nous avons ainsi opté pour des inhibiteurs du blebbing tels que la Blebbistatine, un inhibiteur de la myosin II et Y-27632, un inhibiteur de la kinase ROCK. En effet, le bourgeonnement spécifiquement induit en cours d'apoptose implique une contraction de l'actomyosine sous contrôle de l'activité de la kinase ROCK1 qui est une cible de la caspase-3. Le fragment clivé de ROCK1 par la caspase3 suffit à induire ce blebbing, accompagné d'une rupture de l'enveloppe nucléaire et de l'empaquetage de l'ADN fragmenté dans les blebs et les corps apoptotiques (Wickman, Julian et al. 2012).

Les inhibiteurs utilisés ont également été décrits comme capables d'interférer avec les mouvements membranaires impliqués dans les processus de macropinocytose. Nous avons d'ailleurs choisi de compléter la panoplie avec des inhibiteurs de l'endocytose et de la phagocytose. Nous avons testé les effets de la cytochalasine-B qui, en inhibant la polymérisation de l'actine, empêche les déformations membranaires nécessaires au bourgeonnement ou aux processus de macropinocytose et de phagocytose. Nous avons également utilisé la génistéine connue pour perturber le remodelage membranaire, le réseau d'actine et le recrutement de la dynamine.

Enfin, nous avons choisi de masquer les phosphatidyl-serine (PS) exposées sur les membranes des blebs et des corps apoptotiques avec de l'annexine V, pour vérifier si la reconnaissance des sous-produits de cellules apoptotiques, au travers de signaux 'eat me' avait une importance dans un processus phagocytaire favorable au virus. La théorie

de l'apoptotic mimicry' du virus de la vaccine proposée par Mercer et Helenius venait en effet de corroborer des données qui avaient déjà été rapportées sur Sindbis et sur la capacité de certains virus à exploiter les marques extérieures de l'apoptose (Rosen, Casciola-Rosen et al. 1995; Mercer and Helenius 2008).



Quelles qu'aient été les molécules utilisées, il s'est avéré qu'une inhibition pendant la cinétique d'infection, du processus de formation des blebs et/ou de leur phagocytose conduisait au même effet que le z-Vad.

Nous en avons conclu que l'élimination par phagocytose des corps apoptotiques chargés de virus par les cellules voisines d'une cellule infectée favorisait les capacités de dissémination virale.

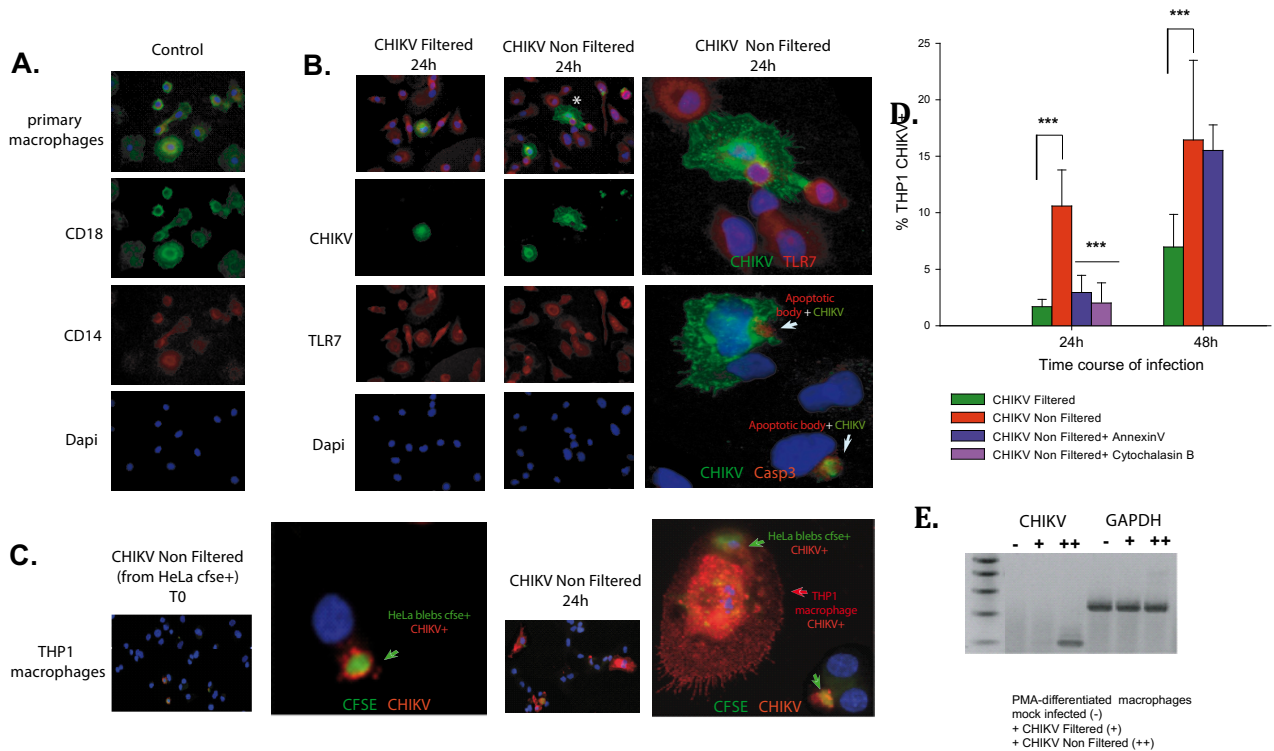
B-1-4) L'internalisation de corps apoptotiques contenant du virus augmente l'infection des macrophages.

Compte tenu de l'absence d'infection obtenue jusque là en incubant des monocytes et des macrophages avec CHIKV, contrairement d'ailleurs aux données d'autres laboratoires, nous nous sommes demandé si la phagocytose des corps apoptotiques produits par les cellules infectées et chargés de particules virales ne constituerait pas un moyen pour CHIKV de se propager de cellules infectées aux cellules voisines mais également de cellules infectées aux phagocytes professionnels.

Nous avons donc testé cette séduisante théorie du cheval de Troie en comparant des macrophages incubés avec du virus seul, filtré sur 0,2 μ ou en présence d'un surnageant de cellules HeLa infectées pendant 72h et contenant les nombreux débris produits par l'apoptose massive des cellules. Nous avons pris soin de marquer préalablement les cellules HeLa avec du CFSE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) afin de pouvoir repérer ensuite les corps apoptotiques produits. Nous avons mené l'expérience sur deux lignées de macrophages humains : les THP-1 et les MM-6 différenciés aux esters de phorbols (PMA) ainsi que sur des macrophages primaires isolés du sang d'un donneur.

Là où l'inoculum filtré avec le virus seul à une MOI de 1 conduisait en 24h à moins de 2% de cellules infectées, détectées par la présence d'un immunomarquage intracellulaire de E1, l'inoculum contenant les corps apoptotiques nous a permis d'observer près de 10% de cellules immunomarquées.

Ce pourcentage retombait à moins de 2% si l'inoculum était pré-incubé avec de l'annexine V ou si de la cytochalasine-B était ajoutée dans le milieu de culture, confirmant que l'internalisation de corps apoptotiques avec des PS exposées en surface constituait le moyen pour le virus de cibler et infecter les macrophages.



Macrophages primaires et THP1 infectés par CHIKV

A immunomarquages CD18 et CD14 sur les contrôles

B immunomarquage E1vert/TLR7 Rouge, E1vert/caspase3-clivée Rouge sur les cellules 24h post-incubation avec du virus filtré ou non filtré

C Suivi des corps apoptotiques de HeLa marqués au CFSE, immunomarquage E1 Rouge

D pourcentages des cellules immunomarquées CHIK au cours de la cinétique d'infection

E Détection par RTPCR du génome viral (sonde E1)

Nous avons donc fait la preuve que CHIKV détourne la stratégie de défense cellulaire par apoptose comme un moyen d'associer du matériel viral à des éléments membranaires issus du blebbing et de la fragmentation en corps apoptotiques. Au cours d'une infection, le virus serait ainsi libéré sous plusieurs formes qui diversifient et augmentent ses capacités à infecter de nouvelles cibles. Les cellules infectées mourantes et leurs blebs, destinées à être éliminées par phagocytose par les cellules avoisinantes ou par les macrophages permettent au virus d'entrer 'masqué' dans de nouvelles cellules et d'optimiser une dissémination probablement silencieuse, en limitant la réponse inflammatoire, comme nous avons pu le vérifier par la suite.

B-1-5) La diversification des voies d'entrée dans les cellules étend le champ d'action de CHIKV.

Comme déjà évoqué, le récepteur et le mode d'entrée du virus font encore l'objet de données et propositions variées. Parmi les candidats potentiels, suspectés ou avérés pour d'autres alphavirus : un récepteur de la laminine, des lectines de type-C, une DC-SIGN des protéoglycanes ou encore la prohibitine qui serait le récepteur pour l'endocytose du CHIKV dans la microglie (Wintachai, Wikan et al. 2012). Il est intéressant de noter que les auteurs de cette dernière étude, basée sur la sélection de protéines membranaires interagissant avec les particules virales, n'ont obtenu aucun profil d'interaction du virus avec l'extrait membranaire de macrophages U937. Ces résultats confortent la présomption d'un défaut de récepteur chez les macrophages, pouvant expliquer leur faible susceptibilité.

Dans les cellules dotées d'un récepteur, l'interaction du virus déclenche son endocytose par un mécanisme dépendant de la clathrine et impliquant la dynamine-2 selon les uns (Sourisseau, Schilte et al. 2007), ou par un mécanisme indépendant de la clathrine et reposant sur Eps15 selon les autres (Bernard, Solignat et al. 2010). Il est vraisemblable que plusieurs modes d'interaction et d'entrée puissent coexister et nos travaux proposent une nouvelle piste: celle d'une entrée 'moins spécifique' à la faveur de la phagocytose des cellules infectées mourantes et de leurs débris.

Le rôle du processus phagocytaire, dans la capacité qu'a développé CHIKV pour cibler les macrophages, fait dorénavant l'objet de toute mon attention et des recherches que je conduis depuis 2011.

Ce mécanisme nous est apparu comme étant probablement une des clés de la compréhension de l'installation en phase chronique de la pathologie Chikungunya.

En effet, le processus de phagocytose des corps apoptotiques produits lors d'infections virales a été décrit comme permettant à certains virus d'échapper au système immunitaire (Everett and McFadden 1999; Chen, Seo et al. 2006). Par ailleurs, les blebs et corps apoptotiques émis sont certes remplis de particules virales, mais ils contiennent également de nombreux sous-produits de dégradation des constituants cellulaires. On y trouve par exemple des protéines nucléaires telles que des hnRNP, ou HMGB1 (Schiller, Heyder et al. 2013). Ces associations peuvent constituer autant d'auto-antigènes lors de leur traitement par des cellules présentatrices d'antigène et pourraient conduire à une réponse immune inadaptée et à l'auto-immunité (Elliott and Ravichandran 2010; Wickman, Julian et al. 2012). Je développerai ces aspects dans le paragraphe B3, chapitre IV, sur les perspectives de mes futures activités de recherche.

Les recherches effectuées sur les effets cytopathiques de CHIKV ont permis de montrer que le virus détourne la stratégie de défense cellulaire par apoptose comme un moyen d'associer du matériel viral aux blebs et corps apoptotiques qui font ensuite l'objet d'une élimination par phagocytose par des cellules saines. Le virus diversifie et augmente ainsi, vraisemblablement en toute discrétion, ses capacités à infecter de nouvelles cibles cellulaires.

B-2 Etude des relations de CHIKV avec le mécanisme d'Autophagie cellulaire

Résultats publiés dans *Virology Journal* en 2011, Titre: *Chikungunya triggers an autophagic process which promotes viral replication. (Annexe 3)(Krejchich-Trotot, Gay et al. 2011)*

L'autophagie, au même titre que l'apoptose, fait partie des systèmes primitifs de défense cellulaire. C'est un mécanisme initialement cytoprotecteur, permettant à la cellule de s'adapter à plusieurs sortes de stress sans s'engager dans l'autodestruction. Il permet notamment d'isoler les pathogènes intracellulaires et de les destiner à une dégradation lysosomale qui va restreindre leurs capacités de multiplication. Parallèlement à la mort cellulaire programmée par apoptose, l'autophagie constitue d'abord un processus de survie également programmé et les deux mécanismes présentent de nombreuses interrelations. Il a largement été décrit comme impliqué dans l'immunité innée et adaptative en réponse aux pathogènes (Munz 2009). Cependant, comme pour l'apoptose nombreux sont les virus qui ont développé des stratégies pour échapper, interférer, détourner et même exploiter le mécanisme. Une action antivirale de l'autophagie a été démontrée pour des virus tels que SINV, Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), les herpes simplex (HSV1) et le parvovirus B19. Dans le cas de certains virus à ARN comme les coronavirus, le virus de l'hépatite-C (HCV), les membranes des autophagosomes sont au contraire utilisées au profit du virus, pour faciliter l'assemblage des complexes réplicatifs (Wileman 2006). Dans le cas du virus de la Dengue, c'est en modifiant le métabolisme lipidique que l'autophagie favoriserait la multiplication virale (Heaton and Randall 2010). Concernant HIV, les données varient selon les modèles : certains rapportent que l'autophagie favoriserait la réplication et/ou la libération des virions dans les macrophages (Espert, Varbanov et al. 2009) tandis que pour d'autres, son induction par la rapamycine ou la vitamine D limiterait le virus (Rubinsztein, Codogno et al. 2012). Des protéines virales capables d'interrompre l'autophagie ou d'empêcher la fusion des autophagosomes avec les lysosomes ont été identifiées chez HSV-1, HIV, influenza A et SFV (Randow and Munz 2012).

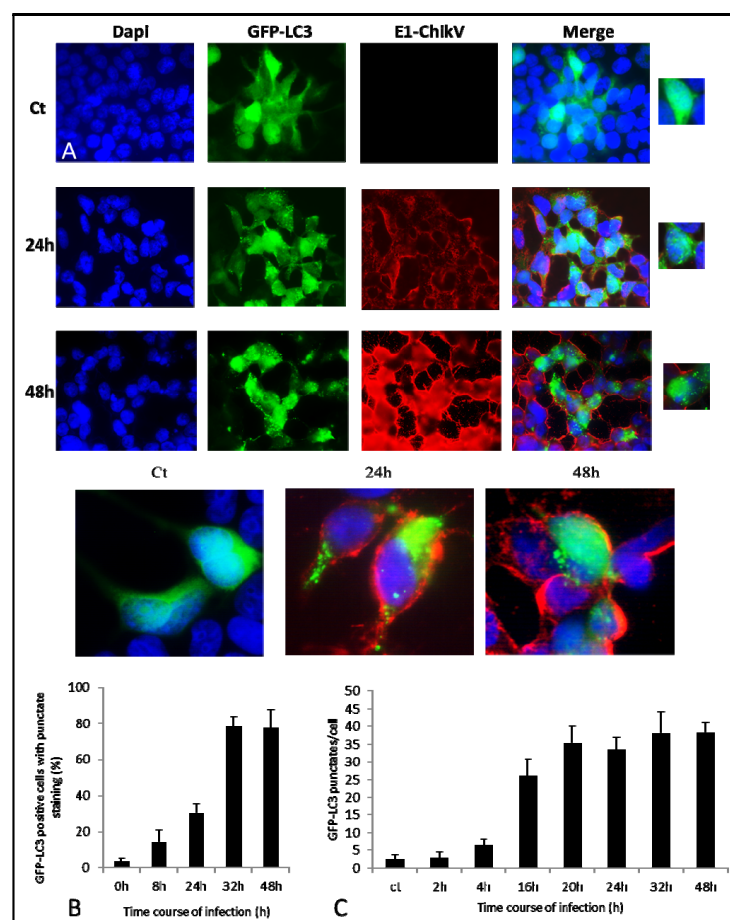
Lorsque Mélanie Denizot est arrivée au laboratoire dans le cadre d'un stage post-doctoral financé par un poste d'ATER, nous avons été très intéressés par ce qu'elle avait montré au cours de sa thèse autour des liens existants entre apoptose et autophagie lors de l'infection HIV. En étudiant l'apoptose bystander des TCD4 durant l'infection HIV elle avait montré que l'interaction en surface cellulaire de la protéine Env et de cxcr4 conduisait à une autophagie conditionnant le déclenchement de l'apoptose (Espert, Denizot et al. 2006). Nous avons ainsi décidé de regarder si CHIKV modifiait le comportement des cellules infectées vis à vis de l'autophagie.

B-2-1 CHIKV induit l'autophagie des cellules HEK infectées

Mélanie avait développé dans son laboratoire de thèse (chez Martine Biard-Piechaczyk à Montpellier) un modèle de suivi de l'autophagie à partir de cellules HEK (Human Epithelial Kidney cells) plus adaptées que les HeLa (qui font naturellement beaucoup d'autophagie) et facilement manipulables notamment en vue des transfections. Après avoir obtenu une lignée stable exprimant une protéine de fusion gfp-LC3 (green

fluorescent protein- microtubule associated protein light chain 3) et après avoir vérifié sa susceptibilité au virus CHIKV, il devenait aisé de mesurer le taux d'autophagie en microscopie en comptant les vésicules ayant incorporé ce LC3 fluorescent. La formation des autophagosomes qui ont la particularité d'être des vésicules à double voire multiples membranes repose sur une cascade d'événements moléculaires programmés. L'initiation du processus se fait à partir d'une membrane cellulaire et dépend d'une nucléation de protéines au cours de laquelle la protéine LC3 est clivée et associée par lipidation à la membrane.

L'étude de la distribution cellulaire de la protéine de fusion gfp-LC3 en microscopie à fluorescence, au cours d'une cinétique d'infection des HEK a ainsi montré clairement une induction de l'autophagie dès deux heures post-infection, avec près de 40% des cellules présentant des quantités croissantes d'autophagosomes à 48h (voir ci-dessous).



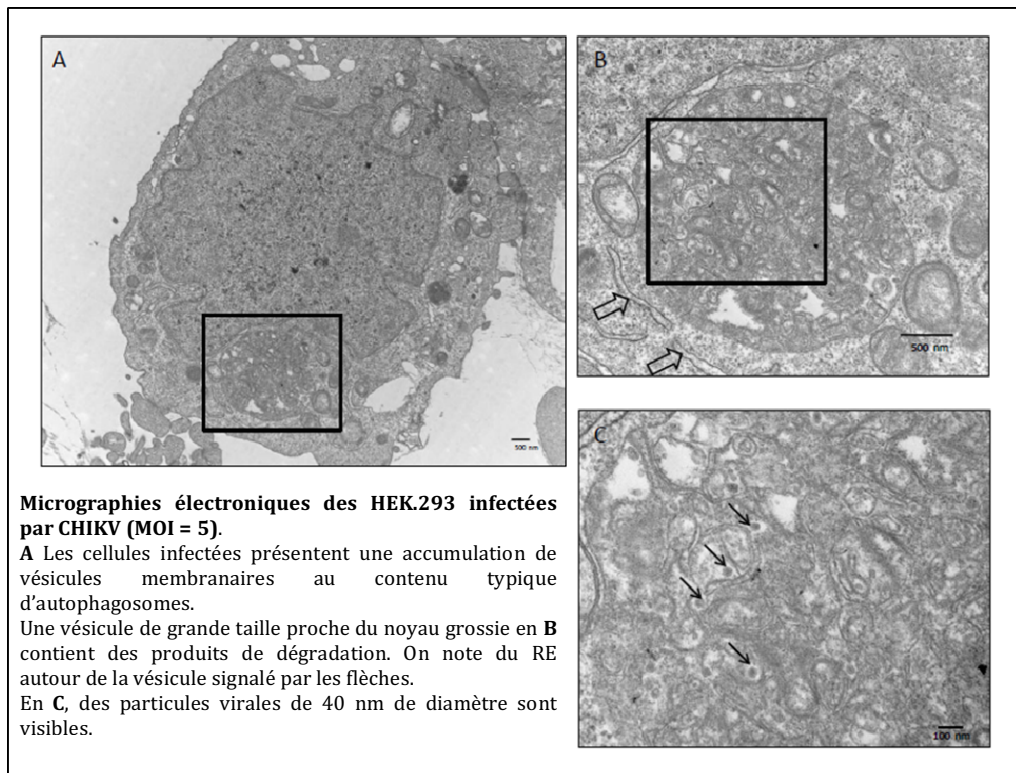
Distribution de GFP-LC3 dans les HEK au cours de l'infection par CHIKV

A immunomarquage E1 Rouge + Dapi pour le contrôle, 24h et 48h post-infection (MOI=1)

B % de cellules présentant plus de 5 vésicules marquées par gfp-LC3

C nombre moyen des vésicules gfp-LC3 par cellule au cours de la cinétique d'infection

L'étude ultrastructurale des cellules infectées en microscopie électronique, réalisée en collaboration avec le laboratoire du Dr L. Briant du CPBS-UMR5236-CNRS de Montpellier, a confirmé la présence de vacuoles membranaires caractéristiques d'autophagosomes dans lesquels des particules virales assemblées de 40nm étaient visibles (voir ci-après).



B-2-2 L'autophagie est un mécanisme favorable au virus

Nous avons ensuite choisi, comme pour l'apoptose, de tester les effets d'une inhibition de l'autophagie sur le déroulement de l'infection. Parallèlement, il nous est apparu intéressant de les comparer aux effets que produirait, à l'inverse, une induction préalable de l'autophagie.

Pour bloquer l'autophagie, deux stratégies ont été mises en place. Nous avons d'une part procédé à son inhibition pharmacologique en traitant les cellules avec de la 3-Méthyladénine (3-MA) et choisi d'autre part une approche d'inhibition par ARN interférentiel spécifique. Au cours de cette deuxième approche, les cellules ont été transfectées avec un siRNA conçu pour réduire l'expression du gène becline-1 dont le produit intervient au cours de la nucléation et de la maturation du processus autophagique. Dans les deux cas, nous avons constaté une réduction significative du nombre de cellules infectées, à 24h et 48h ainsi qu'une faible quantification virale dans les surnageants de culture. A l'inverse, une induction de l'autophagie par prétraitement des cellules avec de la rapamycine a conduit à une augmentation du nombre de cellules infectées ainsi que du nombre de virus produits.

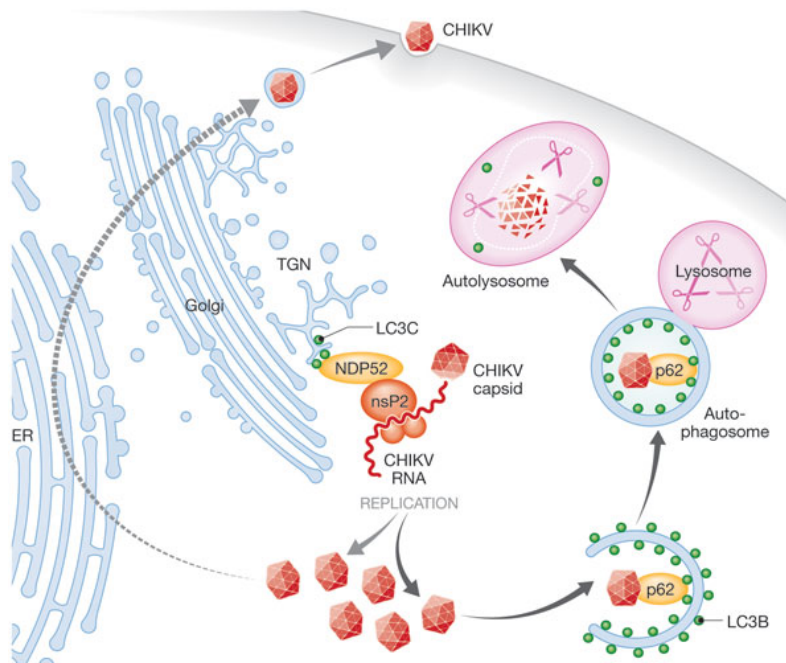
Nous avons donc été les premiers à proposer que le virus du Chikungunya induit et détourne vraisemblablement l'autophagie cellulaire à son profit. La diminution notable du nombre de cellules présentant un immunomarquage E1 et la faible production virale attestent d'un rôle essentiel du processus autophagique dans le déroulement du cycle viral. Réciproquement l'induction préalable de l'autophagie rend les cellules plus permissives suggérant une possible préparation d'un 'terrain' favorable à une réplication particulièrement efficace.

B-2-3 L'autophagie est-elle un mécanisme défavorable au virus ?

La certitude que nous avons acquise d'un détournement actif de l'autophagie au profit du virus a quelque peu été remise en question par les observations publiées par S. Shoji-Kawata et B. Levine début 2013. Dans cette étude, l'induction préalable de l'autophagie dans des cellules HeLa ensuite infectées par CHIKV, conduisait à une réduction du titre viral de 50 fois (Shoji-Kawata, Sumpter et al. 2013). Ce résultat était également reproduit lors d'une infection par d'autres arbovirus: SINV et West Nile (WNV). De plus, l'autophagie, induite dans cette étude au moyen d'une construction portant une fusion tat-beclin et effectuée parallèlement *in vivo* sur des souris nouveau-nées, s'avérait également conduire à une réduction des titres viraux dans plusieurs tissus ainsi qu'à une diminution des signes cliniques et de la mortalité.

Le fait que l'autophagie protège les souris nouveau-nées de la létalité induite par CHIKV, probablement en limitant la mort cellulaire avait déjà été montré (Joubert, Werneke et al. 2012; Joubert, Werneke et al. 2012). Ce mécanisme ne nous avait pas paru contradictoire avec nos résultats. En effet les deux processus interconnectés peuvent dépendre l'un de l'autre et l'autophagie retarder l'apoptose tout en bénéficiant l'une et l'autre au virus. Le détournement des deux mécanismes de défense cellulaire, organisé dans le temps infectieux, laisserait au virus le temps de se répliquer en profitant de l'autophagie, puis lui permettrait au final d'améliorer ses capacités de dissémination en profitant de l'apoptose.

Grace aux études réalisées par l'équipe de Marc Lecuit à l'Institut Pasteur, on sait depuis que CHIKV déclenche une nucléation de protéines autophagiques à différents niveaux cellulaires (Judith, Mostowy et al. 2013). D'une part, des capsides virales ubiquitinylées seraient recrutées par des autophagosomes par l'intermédiaire de p62/sequestosome qui fixe LC3B. D'autre part, nsP2 s'associerait à LC3C par l'intermédiaire de NDP52 (nuclear dot protein) au niveau cette fois du réseau trans golgien.



D'après Münz, Macroautophagy-friend or foe of viral replication ? Embo Reports 2013 vol14, 6483-484

Comme le résume le schéma ci-dessus, le premier mécanisme, en dirigeant les capsides vers une dégradation dans les autophagolysosomes restreint probablement CHIKV, mais le deuxième mécanisme impliquant nsP2, en favorisant la formation de complexes réplicatifs associés aux membranes trans-golgiennes accroît la multiplication virale.

Dans l'étude de Shoji-Kawata et al., le mode d'induction de l'autophagie par une construction tat-beclin avant infection augmente le nombre d'autophagosomes fusionnés à des lysosomes comme en témoigne leur association au marqueur Lamp2. En orientant et en favorisant ainsi la réponse 'dégradative', c'est logiquement un effet négatif dominant qui est observé sur le virus.

Judith et al. ont fait une autre découverte éclairante, en montrant que seules les cellules humaines présentaient une association de nsP2 à NDP52 co-localisant avec LC3C au niveau du trans-golgien. Cette singularité, en ne permettant la promotion de la réplication virale que dans les cellules exprimant NDP52, explique la différence de comportement entre espèces. L'effet activateur de l'autophagie 'golgienne', promu par nsP2 s'est d'ailleurs avéré transférable aux cellules de souris par transfection avec du NDP52 et du LC3C humains.

Il semblerait judicieux, pour vérifier ce comportement schizophrène de la réponse autophagique des cellules à l'égard du virus, de bloquer artificiellement le mécanisme impliquant spécifiquement les autophagolysosomes. Je propose de regarder, par exemple, l'effet de la bafilomycine A1 qui empêche la fusion des autophagosomes avec les lysosomes et qui permettrait de distinguer les étapes favorables et défavorables au virus.

A ce titre, il ne faut d'ailleurs pas perdre de vue qu'en délivrant les composants viraux au compartiment endosomal contenant des PRRs, l'autophagie a été décrite comme contribuant à la signalisation de la réponse interféron ainsi qu'à la présentation d'antigènes associés au CMH qui activeront la réponse CD8+ et CD4+. Il serait intéressant, dans le système, d'identifier en particulier le rôle de IRGM (immunity-related GTPase family M), une GTPase qui pourrait constituer l'intermédiaire reliant les réponses immunes à l'autophagie lors des infections virales. On sait en particulier que nsP2 et E3 sont capables d'interagir avec IRGM et pourraient au travers de cette interaction manipuler l'autophagie (Gregoire, Richetta et al. 2011).

Nos travaux de recherche ont été les premiers à décrire qu'un processus autophagique induit par les cellules en réponse à l'infection par CHIKV était détourné par le virus pour promouvoir sa multiplication. L'autophagie apparaît comme un mécanisme à plusieurs facettes, utilisée comme stratégie à vocation antivirale par les cellules mais également utilisée par le virus pour améliorer ses performances.

B-3 Persistance virale et Rôle des macrophages dans la chronicité.

Comme je l'ai rappelé dans l'introduction, l'insularité et la mobilité relative de la population réunionnaise fournissent un véritable observatoire de l'évolution dans le temps de la pathologie Chikungunya. Ainsi, différentes études du suivi de patients convergent vers le même constat préoccupant. Même si les pourcentages varient (de 10% pour certains à 60% pour d'autres), en partie en fonction de la date à laquelle ont été menées les études, le Chikungunya est responsable de manifestations chroniques allant de simples douleurs articulaires mais récurrentes impactant la qualité de vie à des tableaux extrêmement sévères de polyarthrites inflammatoires (Ribera, Degasne et al. 2012).

Les travaux que nous avons pu conduire au GRI grâce à la constitution et au suivi d'une cohorte de patients réunionnais ont permis une découverte importante. L'analyse d'un prélèvement articulaire post-opératoire, obtenu d'un patient souffrant d'hygroma 18 mois après avoir contracté le Chikungunya, a révélé une persistance du virus dans les articulations. Le tissu synovial présentait une importante infiltration de macrophages péri-vasculaires immuno-marqués pour CHIKV, une importante angiogénèse et un taux élevé de cellules apoptotiques, comme en témoignent les images et résultats ci-dessous, repris de l'article que nous avons publié dans Journal of Immunology en 2010 (Hoarau, Jaffar Bandjee et al. 2010).

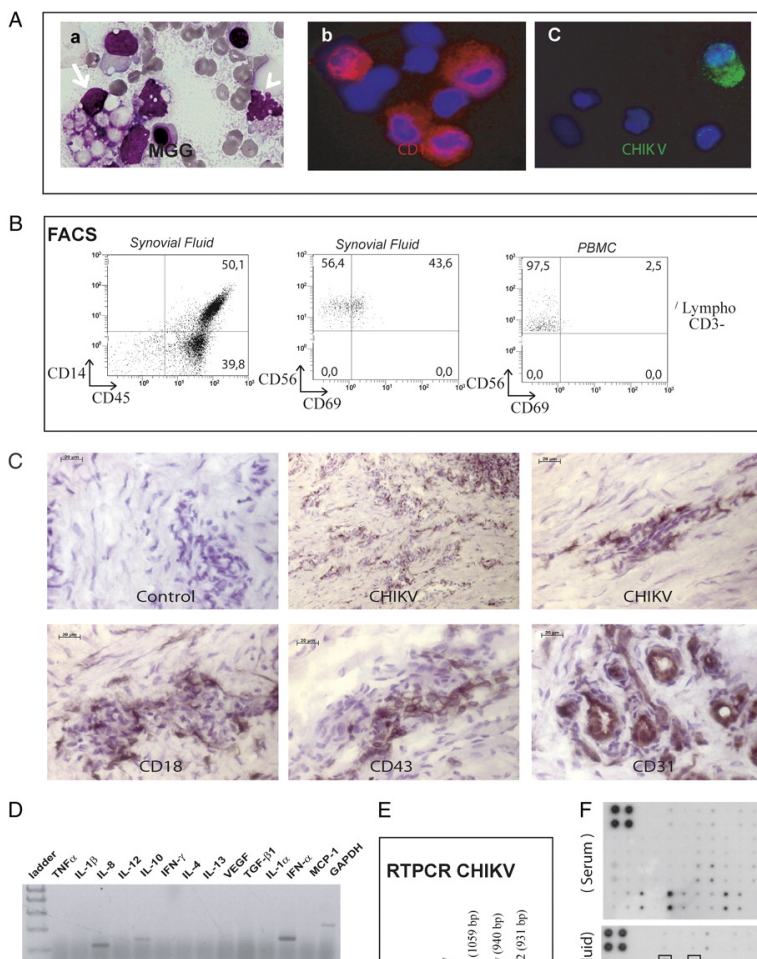


Fig5 Chronic arthralgia months after acute infection is associated with the persistence of CHIKV in synovial macrophages and accompanied by a polarized inflammatory response. Synovial biopsies from cells (A, B), fluid (F), and tissue sections (C-E) were tested for the presence of CHIKV, inflammation, and immune cell activation several months PI (chronic patient 21, M18). A, Synovial cells including numerous ballooned macrophages (May Grunwald 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- α , I-309, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IFN- γ , MCP2, MCP3, M-CSF, MDC, MIG, MIP1 δ , RANTES, SCF, SDF1, TARC, TGF- β 1, TNF- α , TNF- β , EGF, IGF, angiogenin, oncostatin M, thrombopoietin, VEGF, PDGF-BB, and leptin were not affected.

Les manifestations arthritiques chroniques ne sont pas une exclusivité de l'infection par CHIKV. Elles ont été rapportées pour plusieurs alphavirus : le Barmah Forest virus (BFFV), Mayaro (MAYV), Ross River (RRV), O'nyong-nyong (ONNV) et Sindbis (SINV). Les mécanismes de l'installation de la chronicité post-infection par ces virus commencent à être progressivement documentés. De nombreuses revues ont fleuri sur le sujet : (Toivanen 2008; Dupuis-Maguiraga, Noret et al. 2012; Suhrbier, Jaffar-Bandjee et al. 2012; Assuncao-Miranda, Cruz-Oliveira et al. 2013) dont celles réalisées par l'équipe sur le Chikungunya et auxquelles j'ai pris part (Jaffar-Bandjee, Ramful et al. 2010) (Jaffar-Bandjee, Das et al. 2009)(Annexe4).

L'ensemble des données recueillies s'accorde pour mettre en avant le rôle central des macrophages infiltrés dans les tissus articulaires. De nombreux parallèles peuvent en particulier être établis entre l'installation de la chronicité post-Chikungunya et la pathologie Ross River (pour revue (Suhrbier and La Linn 2004)), pour laquelle une persistance virale a été observée, d'une part chez les patients grâce à des biopsies articulaires prélevées 5 semaines après l'infection (Soden, Vasudevan et al. 2000), ainsi que dans des lignées de macrophages en culture pour lesquels une production virale a même été observée sur 50 jours (Linn, Aaskov et al. 1996). Les modèles animaux rapportés dans le paragraphe A-5-2 confortent ce constat. Chez la souris, la diminution des manifestations arthritiques après déplétion des macrophages confirme l'impact majeur de ce type cellulaire dans l'installation de la chronicité (Gardner, Anraku et al. 2010). Enfin, l'infection menée dans le modèle macaque, a montré sans équivoque une persistance du virus sur plusieurs mois dans les organes lymphoïdes, le foie, les muscles et les articulations avec des macrophages identifiés comme réservoirs pour CHIKV (Labadie, Larcher et al. 2010).

Compte tenu des données acquises *in vitro* avec notre modèle d'infection des macrophages par phagocytose de corps apoptotiques et les observations effectuées *in vivo* dans le tissu synovial de notre patient chronique, il nous est apparu essentiel de vérifier le rôle du couple virus/macrophage et la possible sanctuarisation du virus comme critère d'installation des manifestations chroniques. Les travaux que j'ai pilotés en 2012 et 2013 dans le cadre de stages de Master2 de deux étudiantes de l'UR avaient donc pour objectif de caractériser l'interaction de macrophages avec CHIKV. Ces travaux font l'objet d'une publication en préparation. (Damour, E, Stanislas, G, Giry, C, Denizot, M, Jaffar-Bandjee M.C. Gasque P and P. Krejbich-Trotot. *Viral persistence and human macrophages response to apoptotic bodies uptake and Antibody Dependant enhancement during Chikungunya virus infection*. En préparation, soumission fin 2013).

Nous souhaitons dans un premier temps vérifier si le mode d'entrée du virus était en mesure d'influencer la permissivité des cellules et leur capacité à monter une réponse immune efficace. L'importance démontrée de l'apoptose pendant l'infection, au travers de l'internalisation des corps apoptotiques, nous encourageait à étudier le rôle du processus de phagocytose dans l'installation d'une relation particulière entre le virus et cellules.

B-3-1 Processus phagocytaires chez les macrophages.

Des corps étrangers ou reconnus comme dangereux sont éliminés des sites d'infection par les phagocytes dits 'professionnels' (neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques, astrocytes). Ils assurent la première ligne de défense et initient la réponse immunitaire en produisant des cytokines et divers facteurs chimioattractifs pour les cellules lymphoïdes.

Par ailleurs, l'élimination des cellules mourantes et de leurs corps apoptotiques, aussi appelée efferocytose constitue un nettoyage physiologique qui participe à l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Au même titre que les phagocytes professionnels, toutes les cellules sont en mesure de participer à ce nettoyage. La différence entre phagocyte amateur et professionnel semblerait uniquement résider dans la rapidité des cellules à détecter et à démarrer l'ingestion des corps apoptotiques (Parnaik, Raff et al. 2000). Néanmoins si l'élimination régulière de cellules individuellement engagées dans l'apoptose est probablement d'abord le fait des cellules voisines en bonne santé, les situations paroxystiques, au cours desquelles une apoptose massive se produit dans des tissus lésés ou infectés, vont se traduire par une intervention rapide des phagocytes professionnels. La phagocytose des cellules apoptotiques est cruciale car elle empêche une nécrose secondaire de ces dernières avec la libération d'un contenu potentiellement immunogène.

Des signaux 'find me' ou 'come and get me', solubles chémoattractifs sont produits au niveau des tissus subissant une apoptose importante (revue par (Martins, Kepp et al. 2010)). Associés à des signaux d'inflammation tels que MCP-1, ils seront responsables de l'afflux des macrophages. La phase suivante implique une reconnaissance des signaux 'eat me', liés à la redistribution des lipides membranaires et l'exposition des phosphatidyl-sérine (PS) en face externe de la membrane plasmique, ainsi probablement qu'à une composante protéique et glucidique impliquant potentiellement des opsonines telles que c1q. L'étape de reconnaissance est très certainement multifonctionnelle, à récepteurs et à ligands multiples.

Les processus de reconnaissance et d'internalisation mettent en effet en jeu une grande variété de récepteurs et de modes de capture si bien que le terme de phagocytose recouvre en fait une grande diversité de mécanismes. Seuls quelques mécanismes clés ont été à ce jour réellement décortiqués en termes de coordination des étapes successives du processus phagocytaire. Celles-ci font intervenir une première étape de reconnaissance, suivie d'une signalisation conduisant au réarrangement du cytosquelette et au remodelage membranaire et enfin au mode de dégradation de l'élément ingéré. Le déroulement de ces étapes est corrélé à la mise en place d'une réponse adaptée par le phagocyte. Pas moins de 20 récepteurs de surface contribuant par ailleurs à des mécanismes d'adhérence cellulaire, au métabolisme, ou à l'immunité innée ont été décrits comme impliqués dans les processus de reconnaissance d'éléments à phagocyter par les macrophages. Ils sont récapitulés dans le tableau ci après:

D'après : (Flannagan, Jaumouille et al. 2012)

Apoptotic corpse receptors	Ligands
TIM-1	Phosphatidylserine
TIM-4	Phosphatidylserine
BAI1	Phosphatidylserine
Stabilin-2	Phosphatidylserine
Mer	Gas6, protein S
$\alpha_v\beta_3$	MFG-E8 on PS
$\alpha_v\beta_5$	Apoptotic cells
CD36	Oxidized lipids
CD91	C1q/calreticulin

Opsonic receptors	Ligands
Fc γ RI (CD64)	IgG1 = IgG3 > IgG4
Fc γ RIIa (CD32a)	IgG3 \geq IgG1 = IgG2
Fc γ RIIc (CD32c)	IgG
Fc γ RIIIa (CD16a)	IgG
Fc α RI (CD89)	IgA1, IgA2
Fc ϵ RI	IgE
CR1 (CD45)	Mannan-binding lectin, C1q, C4b, C3b
CR3 (integrin $\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18, Mac-1)	iC3b
CR4 ($\alpha_V\beta_2$, CD11c/CD18, gp150/95)	iC3b
$\alpha_5\beta_1$	Fibronectin, vitronectin

B-3-2 La phagocytose de corps apoptotiques ou de complexes immuns est un élément promoteur de l'infection des macrophages par CHIKV.

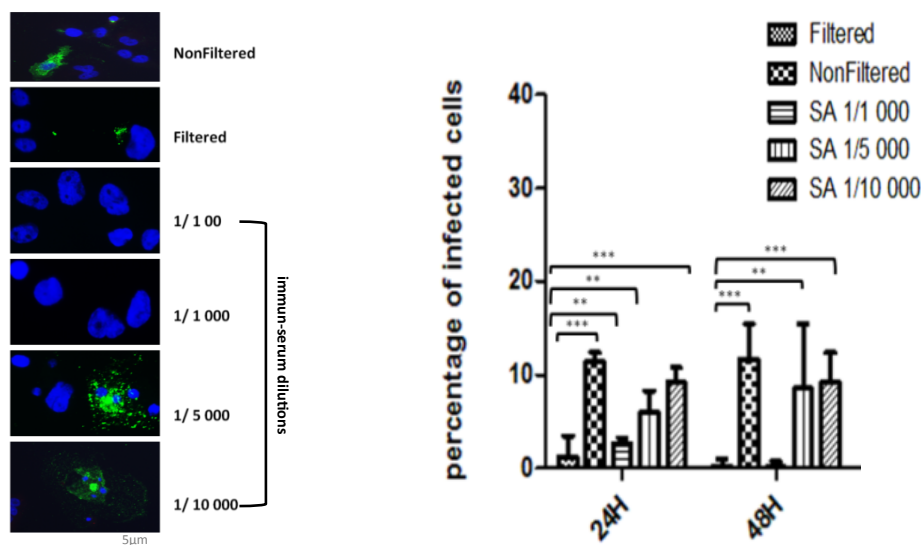
On sait que l'infection Chikungunya *in vivo* s'accompagnera d'une production de facteurs susceptibles d'attirer et stimuler la fonction phagocytaire des macrophages. Parmi ces produits, on trouvera les cellules infectées mourantes, leurs blebs et dérivés apoptotiques ainsi que divers éléments opsonisés. Ce sera le cas des complexes immuns présents en fin de virémie dans la circulation sanguine et au niveau des articulations. Il ne fait donc aucun doute qu'une internalisation de ces complexes par des macrophages aura lieu. On sait également que la phagocytose induite par les récepteurs Fc γ ou les récepteurs du complément peut bénéficier dans certaines circonstances aux virus (Tirado and Yoon 2003). Ce mécanisme aboutissant *in fine* à une facilitation de l'infection est appelé ADE pour 'Antibody Dependant Enhancement'. Largement déjà documenté pour le virus Ross River cousin de CHIKV (Rulli, Melton et al. 2007) mais surtout connu pour la Dengue ce mécanisme pourrait intervenir au cours de l'infection Chikungunya. (Halstead 2003; Wahala and Silva 2011).

A partir de ces constats il m'a semblé pertinent de tester l'effet d'une phagocytose utilisant deux voies distinctes, l'une impliquant une reconnaissance par les macrophages de signaux apoptotiques, l'autre mobilisant une entrée dépendante d'une reconnaissance via les récepteurs aux Fc γ .

L'expérience qui a été menée a consisté à comparer le devenir des macrophages après les avoir mis en contact avec trois formes possibles du virus :

- du virus caché dans les débris cellulaires et corps apoptotiques récoltés à partir de surnageants de cellules HeLa infectées pendant 72h.
- du virus seul, filtré à partir de ce même surnageant
- du virus filtré, complexé à des anticorps suite à sa préincubation avec un mélange d'immunoserum provenant de patients réunionnais.

Nous avons dans un premier temps utilisé la lignée monocyttaire THP1. Les macrophages étaient obtenus après une différenciation induite aux esters de phorbol (PMA) pendant 3 jours, suivie d'un temps de récupération sans PMA de 5 jours selon un protocole décrit comme permettant aux cellules de récupérer une plasticité phénotypique proche de macrophages primaires isolés de PBMC (Daigneault, Preston et al. 2010).



Infection des THP-1 en présence de 3 inoculum : surnageant de HeLa infectées pendant 72h non filtré, surnageant de HeLa infectées pendant 72h filtré, surnageant filtré et préincubé avec des dilutions d'immunoserum du 1/100 au 1/10 000

A immunomarquage E1 Vert + Dapi 24h après incubation avec les différents types d'inoculum

B % de cellules immunomarquées à 24h et 48h après incubation avec les différents inoculum

Alors que 24h ou 48h après la mise en contact des macrophages avec du virus filtré, moins de 2% d'entre eux présentaient un marquage CHIKV positif (immunomarquage anti-CHIKV E1, anti-capside, anti-alphavirus), une incubation à la même MOI, en présence de corps apoptotiques a confirmé que ce nombre pouvait atteindre 10% .

Concernant les complexes immuns, si les préincubations du virus avec de faibles dilutions d'immunoserum se sont avérées neutralisantes, les inoculum obtenus à partir du virus et des dilutions d'immunoserum au 1/5000 et 1/10000 ont conduit à observer significativement plus de cellules immunomarquées CHIK à 24 et 48h (près de 10%).

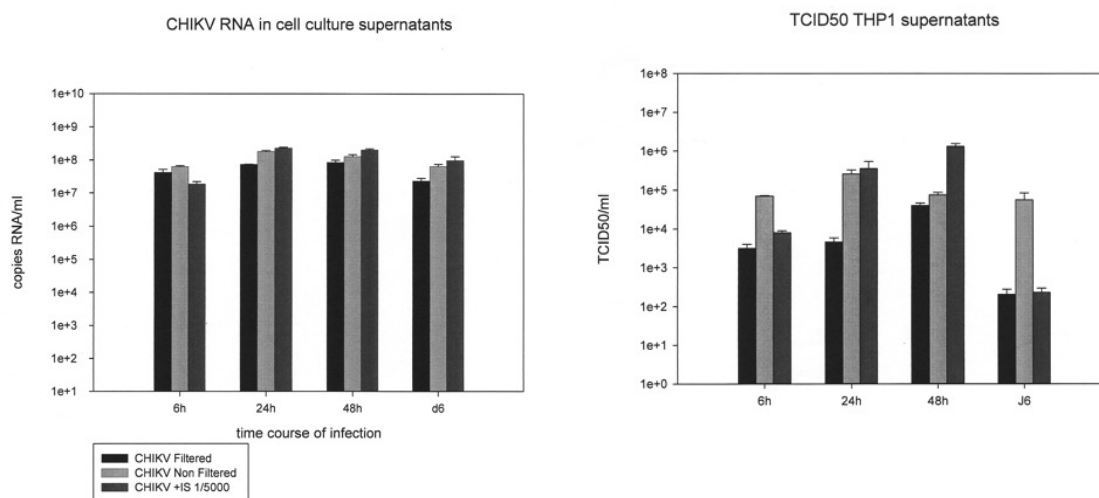
Ces observations suggèrent que les complexes immuns, dans des conditions de faibles quantités d'anticorps conduisent à une facilitation de l'infection.

Nos résultats confirment que CHIKV doit trouver un moyen d'optimiser son entrée dans les macrophages pour les infecter, ce qui se produit par ADE. Ces données indiquent un comportement très semblable à celui de RRV pour lequel l'ADE a été montrée, de longue date, comme conduisant à l'infection des monocytes et macrophages sinon réfractaires

et pourrait être à l'origine d'une infection persistante de ces cellules (Takada and Kawaoka 2003).

Néanmoins, si le pourcentage de cellules immunomarquées pour différentes protéines virales apparaît comme significativement plus élevé dans les conditions d'incubation avec les corps apoptotiques ou les complexes immuns, il faut admettre que ce pourcentage n'évolue pas au cours de la cinétique et a même tendance à diminuer.

De plus, lorsque nous avons quantifié les virus produits dans les surnageants de cultures des macrophages infectés, en détectant d'une part le génome viral par RTPCR, en mesurant d'autre part la TCID50 sur cellules Vero, nous avons été obligés de constater que cette infection ne conduisait pas à une production significative de particules virales infectieuses au cours du temps comme en témoignent les graphes ci-dessous.



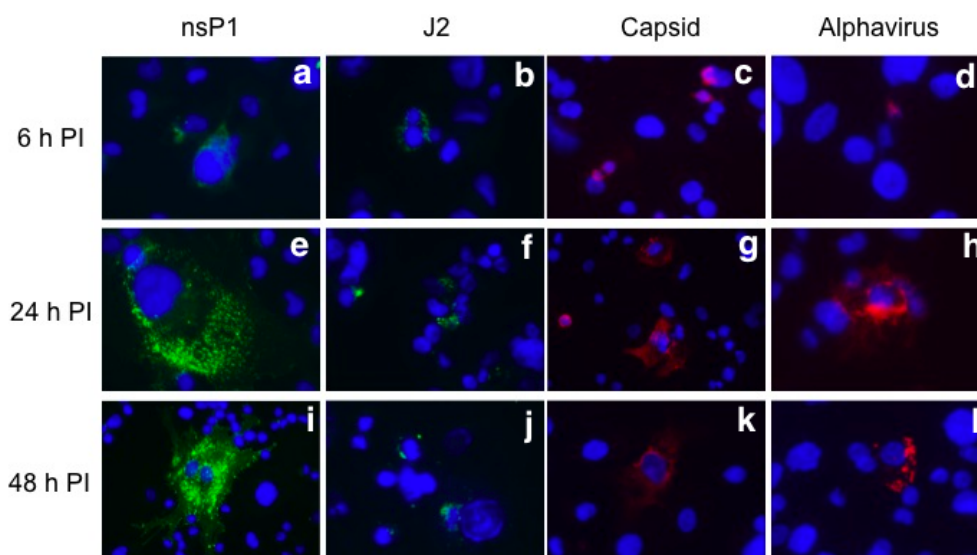
Cette absence de production est à rapprocher des données de l'étude de l'infection de macrophages primaires de Sourisseau et al. qui avait montré un taux d'infection très variable, en particulier en fonction du donneur, avec un faible taux de réplication et une libération de particules virales non infectieuses (Sourisseau, Schilte et al. 2007).

Nos résultats ont donc confirmé que les macrophages sont très peu susceptibles au virus, mais que le nombre de cellules infectées peut être augmenté par l'entrée par phagocytose du virus, au sein de corps apoptotiques ou de complexes immuns. Cependant, quel que soit le mode d'intrusion virale, les macrophages semblent peu productifs, nous conduisant à nous interroger sur leur permissivité.

B-3-3 Les macrophages sont permissifs à CHIKV mais peu productifs.

Nous avons dès lors cherché à vérifier si l'entrée du virus dans les cellules, aboutissait à un cycle avec une réplication virale effective. Les immuno-détections réalisées avec l'anticorps J2 dirigé contre la forme répliquative d'ARN double brin, de même que celles effectuées avec les anticorps dirigés contre les protéines non structurales nsP (1 et 3) et structurales (capside, E1, E2) nous ont clairement indiqué que les cellules qui étaient immunomarquées l'étaient effectivement pour l'ensemble des marqueurs.

La détection de formes ARN double brin de même que celle des protéines nsP suggère qu'un cycle viral est initié dans les macrophages.



Une réplication du virus et une expression de ses différentes protéines interviennent donc bien au cours de la cinétique d'infection.

Nous avons cependant préféré compléter ces données par une recherche systématique des brins positifs et négatifs de l'ARN viral. La technique qui a été utilisée est basée sur une sélection spécifique des ARNs viraux '+' et '-', par une transcription réverse utilisant des amorces biotinylées choisies, soit dans le gène nsP1 soit dans E2. Les ADNsb, respectivement complémentaires des brins positifs ou négatifs sont ensuite séparés pour leur affinité pour des billes magnétiques couplées à de la streptavidine (technique dynabeads M270 de life technologies) puis quantifiés par RTPCR.

Les résultats obtenus ont confirmé la mise en place de la réplication virale avec des formes positives et négatives du génome quantifiables dès 6h post-infection. De plus, une détection plus importante d'ARN E2+ à 24h dans les conditions d'infection par ADE et par les corps apoptotiques s'est avérée conforme avec une synthèse accrue d'ARN subgénomique au cours du cycle viral.

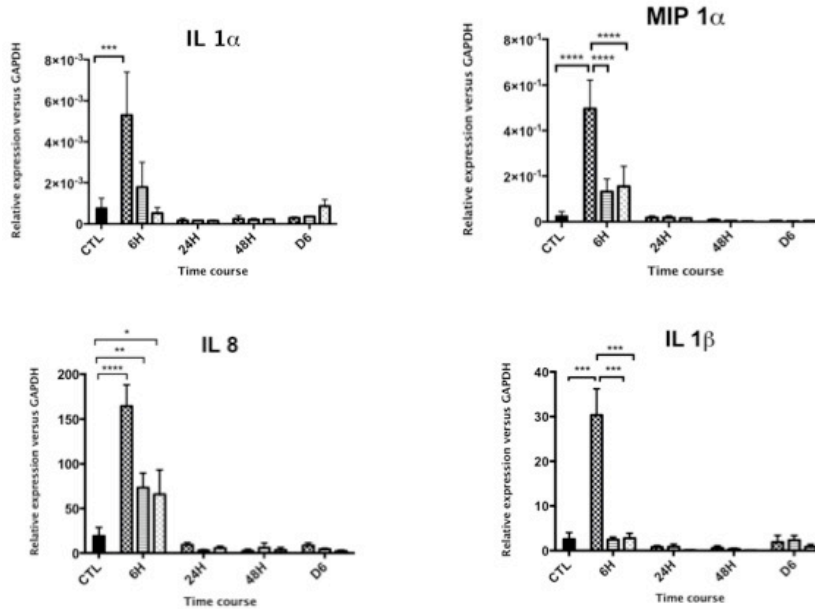
B-3-4 La réponse des macrophages est modérée et atténuée lors des processus phagocytaires.

Nous avons ensuite regardé comment les macrophages répondaient aux différentes modalités d'entrée et d'infection.

Différents indicateurs d'une polarisation classique M1 ou alternative M2 ont été recherchés. Une immuno-détection plus marquée de cd11b (ou CR3 Complement receptor 3) et de la cyclooxygénase 2 (Cox2) des cellules traitées par les différents inoculum suggère que les THP1 adoptent plutôt un phénotype d'activation classique, quelles que soient les conditions.

Le pourcentage de cellules marquées par Cd11b, marqueur par ailleurs signalé comme étant un indicateur des symptômes sévères dans la pathologie Ross River (Morrison, Simmons et al. 2008) passe ainsi de 4% pour les cellules contrôles à près de 10% en 24h pour les cellules infectées. Concernant Cox-2 considéré quant à lui comme un marqueur critique de l'arthrite (Woods, Mogollon et al. 2003), le pourcentage passe également de 3% dans les cellules contrôle à près de 10%, 24h post-infection.

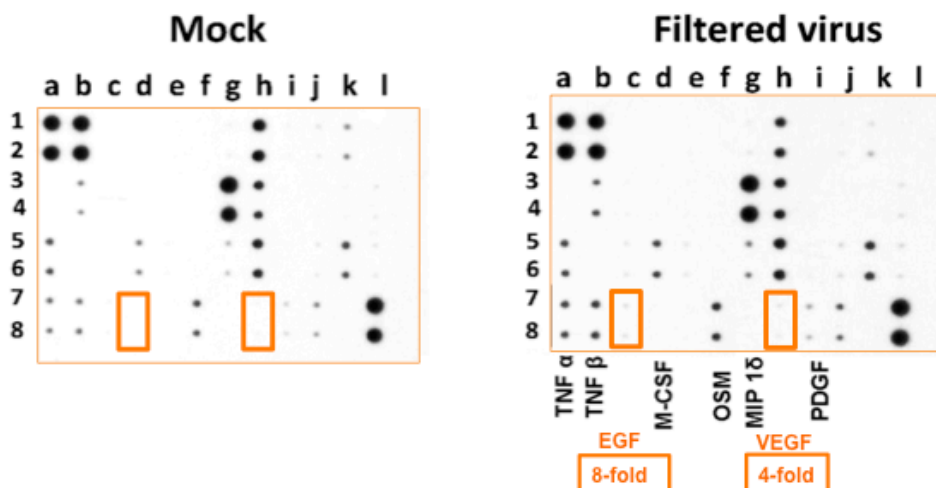
Le niveau d'expression de gènes potentiellement modulés lors d'une réponse immune a été analysé par RTPCR. Parmi les gènes testés (IFN- α , β , γ , IL1- α et β , TNF- α , IL6, IL8, IL12, TGF- β , IL10, IL4, MCP1, MIP1 α), seuls l'IL8, l'IL1 α et β , MCP1 et MIP1 α ont présenté une augmentation notable et significative des quantités de leurs transcrits.



Ces augmentations, d'un facteur 3 à 10 demeurent néanmoins limitées en comparaison des taux obtenus avec un contrôle THP-1 incubé avec des leptospires. Il faut souligner que ces variations n'ont été observées que 6H post-infection et de manière considérablement plus marquée dans les conditions d'une infection avec le virus seul.

Nous avons complété ces données par une analyse des produits de sécrétion détectables dans les surnageants de cultures des macrophages. Nous avons récoltés les surnageants après 6h d'incubation dans les trois conditions d'inoculum viraux.

Les résultats des 'cytokines antibody array' ci-dessus ont permis la mise en évidence d'une sécrétion d'IL8, IL1- α et β , MIP-1 α , MCSF, TNF-(α et β) et PDGF augmentée en moyenne d'un facteur 2 par rapport au contrôle, ainsi qu'une production de EGF augmentée d'un facteur 8 et VEGF d'un facteur 4. Les résultats étaient sensiblement similaires dans les trois conditions.



Nous en avons conclu que l'intrusion de CHIKV dans les macrophages, que ce soit par une voie impliquant des récepteurs de signaux apoptotiques ou par la voie des récepteurs aux Fc γ déclenche une réponse plutôt pro-inflammatoire mais relativement modérée. La nature des cytokines et chémokines produites peut être corrélée aux observations faites *in vivo* dans le tissu synovial et aux résultats obtenus sur un modèle de macrophages de souris (Kumar, Jaffar-Bandjee et al. 2012).

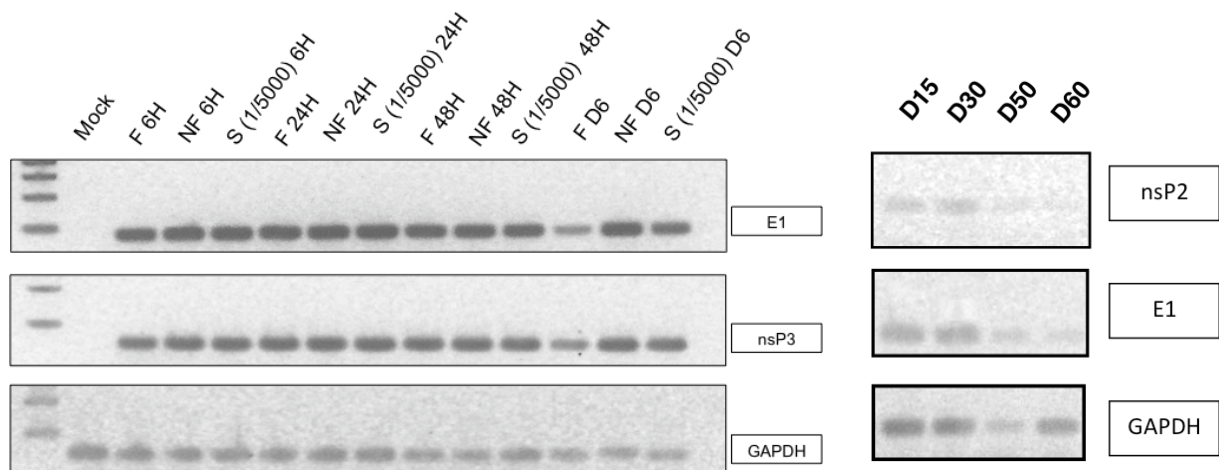
On retrouve ainsi une production d'IL8 par les macrophages dont on sait qu'elle a été impliquée dans l'augmentation de la synthèse des métalloprotéinases de la matrice (MMP) et dans le processus d'angiogenèse au cours des polyarthrites rhumatoïdes (Koch, Polverini et al. 1992; Maruotti, Annese et al. 2013). De plus, la détection d'une sécrétion accrue d'EGF et de VEGF et une expression augmentée au niveau de leurs gènes conforte la mise en place d'une réponse pro-angiogénique dans laquelle les macrophages joueraient un rôle.

L'ensemble des données va cependant dans le sens d'une faible réponse des macrophages qui plus est, atténuée dans les conditions d'incubation avec les corps apoptotiques ou les complexes immuns. L'atténuation de la réponse en fonction du mode d'entrée ne nous a pas surpris. Dans le cas de Ross River, une infection par ADE impliquant la phagocytose par récepteurs Fc γ avait été montrée comme inhibant la réponse antivirale, la production de TNF α et de iNOs (Lidbury and Mahalingam 2000).

B-3-5 CHIKV persiste dans les macrophages *in vitro*.

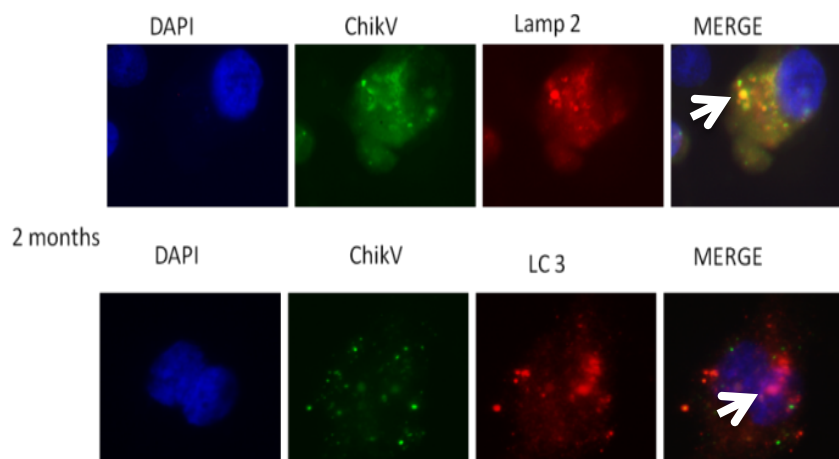
Les THP1 infectés ont été conservés en culture sur de longues périodes et du matériel viral a pu y être détecté jusqu'à deux mois post-infection.

La détection du génome viral a été faite par PCR en point final (ci-dessous). La détection des ARN codant pour E1 ainsi que nsP1, nsP2 et nsP3, mesurable dès 6h post-infection se poursuit 6, 15, 30, 50 et 60 jours post-infection.



Au temps 2 mois post-infection, un signal a également été obtenu bien que très faible, en partie en raison de la faible quantité d'ARN extraite du petit nombre de cellules maintenues en culture sur la période.

Enfin, des macrophages conservés pendant deux mois, ont pu être observés en microscopie à fluorescence après immunodétection des protéines virales, en parallèle d'une détection de différents marqueurs cellulaires tels que la calnexine pour le Reticulum endoplasmique, gp230 pour Golgi, Rab5 et Rab7 respectivement pour les endosomes précoces et tardifs, LC3 pour les autophagosomes et enfin Lamp-2 pour les lysosomes. Les observations effectuées semblent indiquer qu'il y a persistance d'une expression des protéines virales. Celles-ci co-localiseraient avec les protéines Lamp-2 et LC-3 suggérant que le virus a élu domicile dans un compartiment cellulaire de type autophagolysosome.



Ces résultats demandent à être vérifiés. Ils bénéficieront de la mise au point d'outils de détection par hybridation de sondes de grande sensibilité qui seront à même de détecter de faibles quantités d'ARN viral et que je souhaite développer au laboratoire. Il faut souligner qu'il n'a pas été possible de trouver de trace du virus dans le surnageant des cultures à partir de 15 jours post-infection que ce soit des particules infectieuses ou de l'ARN viral. Il y aurait donc une persistance intracellulaire de matériel viral, dissociée d'une production de virions.

La capacité d'infection des macrophages par CHIKV est augmentée si le virus présent au sein de corps apoptotiques ou de complexes immuns est internalisé par les cellules au cours de leur fonction phagocytaire. Les résultats sont sensiblement les mêmes que la voie dépende d'une reconnaissance impliquant les récepteurs de signaux apoptotiques ou les récepteurs aux Fc γ . Dans les deux cas la réponse immune des macrophages est atténuée. En empruntant une voie d'entrée par phagocytose, CHIKV pourrait échapper à la réponse cellulaire, ce qui lui permettrait de persister à long terme. Ce mode d'interaction pourrait rendre compte de la sanctuarisation observée *in vivo* du virus dans les macrophages synoviaux.

IV BILAN ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

A Bilan

Les travaux de Recherche que je viens de présenter, basés sur une modélisation *in vitro* de l'infection Chikungunya ont apporté une meilleure connaissance des interrelations qui s'établissent entre le virus et les cellules qu'il cible chez son hôte.

Nous savons dorénavant que :

- CHIKV détourne la stratégie de défense cellulaire par apoptose comme un moyen d'associer du matériel viral aux blebs et corps apoptotiques. A la manière du cheval de Troie, ces derniers sont internalisés à la suite d'une phagocytose effectuée par les cellules saines. Celles-ci s'infectent alors à leur tour. Le virus augmente et diversifie ainsi ses capacités de propagation vers de nouvelles cibles cellulaires.

- CHIKV induit et utilise l'autophagie pour promouvoir sa multiplication. A l'instar de l'apoptose, l'autophagie apparaît pour les cellules comme une réponse à double détente à la fois essentielle dans la mise en place d'une action antivirale mais dont les effets pluriels favorisent en définitive le virus qui détourne le mécanisme à son profit.

- CHIKV au sein de corps apoptotiques ou de complexes immuns infecte les macrophages en profitant de leur activité phagocytaire. Cette voie d'entrée par phagocytose, en modérant la réponse des macrophages, pourrait expliquer une forme d'échappement du virus à la veille immunologique qui lui permettrait de persister à long terme.

- Une persistance du virus a été observée *in vitro* jusqu'à deux mois post-infection dans des macrophages en culture. Le mode d'interaction basé sur la phagocytose pourrait rendre compte de la sanctuarisation du virus constatée *in vivo* dans les macrophages articulaires.

- La persistance de CHIKV et la relation spécifique qu'il établit avec les macrophages constituent une des clés de la compréhension de l'installation de la chronicité.

Néanmoins, en l'état de nos connaissances sur la pathologie Chikungunya, il apparaît que de nombreuses zones d'ombres demeurent. Celles-ci concernent en particulier les mécanismes à l'origine des formes chroniques.

B Perspectives, projets en cours et à venir sur l'étiologie des arthrites chroniques post-Chikungunya.

Il paraît évident qu'une connaissance affinée des interactions entre le virus et ses cibles articulaires ainsi que des modalités de la réponse de l'hôte ouvrirait des perspectives pour une meilleure prise en charge des patients diagnostiqués en phase chronique du Chikungunya. Aujourd'hui, dans les cas sévères, le traitement des polyarthrites post-Chikungunya par le méthotrexate bien qu'empirique, donne d'excellents résultats. Cependant, compte tenu de nos résultats et de la forte suspicion d'une persistance du virus dans les articulations des patients concernés, la mise en œuvre de traitements immunomodulateurs pose un certain nombre de questions. Il est donc nécessaire de connaître l'ensemble des paramètres qui concourent à l'installation de la chronicité afin de développer les meilleurs outils thérapeutiques.

Dans la perspective d'une évolution du GRI vers une UMRs à l'horizon 2015 je serai coordinatrice, avec Jean-Jacques Hoarau, de la thématique sur les Pathologies chroniques post-infectieuses. Le projet a été défini autour de trois axes :

- **La caractérisation des facteurs biologiques associés à la pathologie chronique et l'évaluation du statut inflammatoire.**
- **La caractérisation de la persistance virale et l'évaluation de sa participation dans la symptomatologie chronique.**
- **L'identification d'une éventuelle composante auto-immune et le rôle des facteurs de l'hôte dans l'évolution vers la chronicité.**

Au sein de ces trois axes, il y a plusieurs aspects que je souhaite développer, dans le prolongement des découvertes effectuées sur le rôle du **couple virus/macrophage** et sur les effets de **l'apoptose** dans la résolution de l'infection, l'orientation des réponses cellulaires et dans un lien possible avec une auto-immunité propre au Chikungunya. Les projets s'appuieront sur les données que nous pourrions obtenir à partir des patients et sur la poursuite des modèles d'infection développés *in vitro*.

B-1 Caractérisation des facteurs biologiques propres aux polyarthrites post-Chikungunya

Il faut rappeler que nous disposons d'un atout exceptionnel lié à notre implantation sur le territoire réunionnais, avec un accès aux patients de l'épidémie de 2006 et grâce aux collaborations établies avec les praticiens hospitaliers du CHU, biologistes, rhumatologues, chirurgiens orthopédistes et anatomo-pathologistes. A partir des cohortes constituées de patients chroniques et des échantillons biologiques disponibles ou à collecter, il sera possible de mener à bien la caractérisation des facteurs biologiques propres aux arthralgies post-Chikungunya afin notamment d'identifier ce qui les différencie de la polyarthrite rhumatoïde.

Cette caractérisation doit se faire à plusieurs niveaux. Il nous faut analyser le profil immunologique des patients et évaluer le statut inflammatoire particulier de l'environnement articulaire.

B-1-1. Arthrites virales, polyarthrite rhumatoïde : Etat des données concernant leurs similitudes et différences, perspectives.

Des arthralgies pouvant persister sur plusieurs semaines sont habituelles dans les tableaux cliniques d'HBV, HCV, et parvovirus B19. Seule l'infection par le virus de la rubéole s'accompagne d'une arthrite avec multiplication virale avérée dans la synoviale. Dans les autres cas, les manifestations périphériques et symétriques, difficilement distinguables d'un rhumatisme inflammatoire, sont réputées dues à des dépôts de complexes immuns. Aucune de ces arthrites virales n'a par ailleurs été décrite comme pouvant perdurer sur plusieurs années. Il n'y a pas non plus d'évidence qu'elles conduisent à des maladies auto-immunes (Suhrbier and Mahalingam 2009).

Le cas des alphavirus et particulièrement du Chikungunya, constitue à cet égard un paradoxe qui mérite d'être relevé et éclairci. Les arthrites post-Chikungunya présentent dans les cas les plus graves une similarité de tableau clinique avec la polyarthrite rhumatoïde. Néanmoins, les paramètres biologiques s'avèrent suffisamment différents pour faire de ces arthrites, des pathologies chroniques propres à CHIKV.

Concernant les polyarthrites rhumatoïdes classiques de l'adulte (PR), elles sont caractérisées par la présence de plusieurs auto-anticorps à valeur pronostique en particulier dans leur évolution vers la destruction articulaire. Ils ne sont pas tous systématiquement retrouvés, mais associent presque toujours une présence de facteurs rhumatoïdes, d'anticorps anti-périnucléaires (APN), d'anticorps anti-kératine (AKA) ou anti-stratum corneum et d'anticorps anti-peptides citrullinés (CCP). Les facteurs rhumatoïdes IgM (FR) sont présents dans 70 % des polyarthrites rhumatoïdes évoluant depuis plus d'un an. Une prédisposition liée au polymorphisme du HLA (human leucocyte antigen) est impliquée dans l'apparition des PR. En effet, le groupe HLA DR4 est significativement plus fréquent dans les PR avec anticorps anti-périnucléaires.

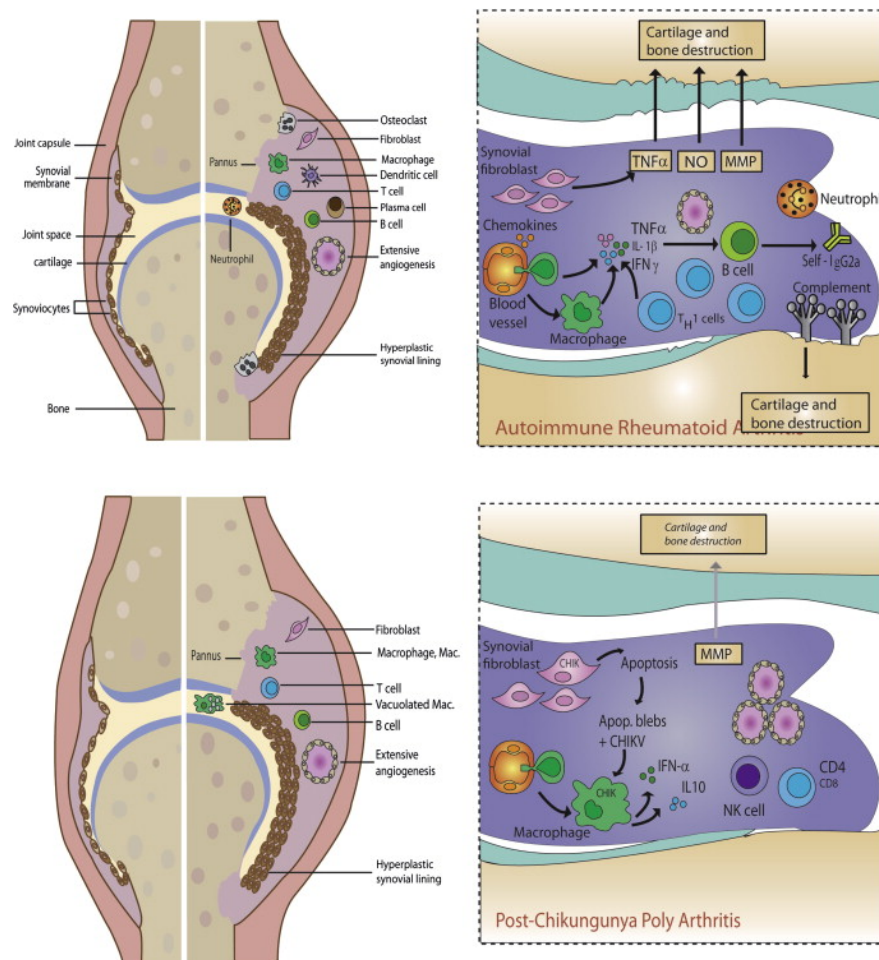
Dans le cas des Polyarthrites post-Chikungunya aucun de ces facteurs n'est apparu comme systématiquement associé, bien que dans certaines études des anti CCP et anti nucléaires aient parfois été retrouvés, ainsi qu'une association avec les groupes HLA-DRB1*01 et HLA-DRB1*04 (Bouquillard and Combe 2009)

Plusieurs études ont entrepris d'analyser les analogies et différences entre Polyarthrites post-Chikungunya et PR. Les unes s'appuient sur le modèle souris (Nakaya, Gardner et al. 2012) qui conforte de nombreuses similitudes avec la PR. D'autres s'appuient sur les données accumulées sur les arthrites post-RRV. Celles-ci font par exemple état d'une présence de cytokines principalement produites par les macrophages dans la PR, avec des taux importants de TNF α alors que les cytokines seraient principalement produites par les LT, avec des taux importants d'IFN γ mais pas de TNF α dans les arthrites post-RRV (Linn, Aaskov et al. 1996).

Enfin diverses équipes ont tenté d'identifier les facteurs spécifiquement associés et prédictifs de l'apparition d'une arthralgie chronique post-Chikungunya (revues par (Dupuis-Maguiraga, Noret et al. 2012) et (Assuncao-Miranda, Cruz-Oliveira et al. 2013)). Notre étude, publiée en 2010, établie à 6 mois et un an post-infection, indique des concentrations sériques d'IL-12 plus importantes dans le groupe des patients chroniques, ainsi qu'une expression importante de l'IFN α dans les PBMCs de ce groupe

par rapport au groupe contrôle. La chronicité pourrait être corrélée à des taux importants de cytokines Th1 en phase aigüe suivie d'un défaut de cytokines Th2. Une étude Indienne indique en revanche plutôt une dominante anti-inflammatoire en phase aigüe et un maintien anormalement élevé d'IL6 chez les patients évoluant vers une phase chronique (Chaaitanya, Muruganandam et al. 2011). D'après cette étude les taux également importants d'IL-8, de MCP-1, MIP-1 et IL1-RA signent la chronicité post-Chikungunya, tout en étant des marqueurs fréquents de polyarthrites d'autres origines. L'étude réalisée sur les patients de Singapour rapporte également la prédominance de l'IL6 associée à de l'IL-1 β et du GM-CSF comme marqueurs de la chronicité (Chow, Her et al. 2011). Enfin, l'étude des patients de l'épidémie italienne suggère que ce sont des taux élevés de CXCL9 et CXCL10, connus comme étant des marqueurs de la destruction articulaire des arthrites rhumatoïdes qui seraient les signatures de la chronicité du Chikungunya et contribueraient à entretenir une activation immune (Kelvin, Banner et al. 2011). Toutes les études s'accordent sur l'importance des chémoattractants (MCP-1, MIP-1 α et β) responsables de l'important trafic des monocytes/macrophages dans le tissu synovial, pour l'évolution vers la chronicité ainsi que sur l'absence remarquée du TNF- α .

Les données concernant le contexte pathologique particulier des articulations arthritiques sont plus parcellaires, probablement à cause de la difficulté à disposer de biopsies de tissu synovial. Le schéma ci-dessous, issu de notre revue (Jaffar-Bandjee, Das et al. 2009) présenté en *annexe 4*, résume un certain nombre de données acquises sur les contextes articulaires de la PR comparé à celui des polyarthrites post-Chikungunya.



L'aperçu de la situation présentée résulte principalement de l'analyse histologique qui a pu être conduite sur les biopsies de tissu synovial de notre patient opéré de son hygroma. La réaction tissulaire dans le cas de l'arthrite post-Chikungunya est caractérisée par une hyperplasie fibroblastique accompagnée d'une apoptose des cellules de la synovie. Elle est marquée par une importante angiogenèse bien que les facteurs VEGF et PDGF n'aient pas été détectés. La métalloprotéinase-2 de la matrice (MMP-2) est présente en quantité importante et contribuerait à la destruction du cartilage. Les phénomènes de destruction sont cependant nettement moins dominants que lors d'une PR. Il a en effet été constaté à la radiographie des signes de ténosynovite et d'enthésite, mais sans les érosions articulaires et osseuses ni les déformations qui accompagnent les tableaux de PR. On note par ailleurs l'absence de neutrophiles ainsi qu'une faible infiltration de LT CD8 qui caractérisent habituellement les articulations des PR. Si le TNF α facteur majeur de la PR s'avère totalement absent, différents médiateurs de l'inflammation tels que l'IL-6, MCP-1/CCL-2 et IL-8 ont été retrouvés avec MMP2 dans le liquide synovial.

► Cet état des lieux indique la nécessité de compléter les données de la caractérisation biologique des arthrites post-Chikungunya. Une recherche exhaustive et systématique des cytokines, chémokines et facteurs proangiogéniques doit être entreprise, tant au niveau circulant qu'au niveau synovial. Une exploitation des biobanques disponibles à La Réunion, ou à constituer et leur étude complète permettront d'identifier les facteurs spécifiques à valeur diagnostique et pronostique.

B-1-2 Evaluation du statut inflammatoire des macrophages synoviaux, et étude de leur rôle dans l'évolution vers une pathologie chronique.

L'étude histologique des biopsies articulaires a révélé une importante infiltration de macrophages périvasculaires, 'ballonnés' dont certains se sont révélés positifs lors de l'immunodétection des constituants viraux. Elle indique également un taux important d'apoptose des cellules de la synovie. Il y a fort à parier que les macrophages recrutés jouent un rôle essentiel dans l'entretien d'un déséquilibre immunologique au sein de l'articulation, en lien avec leurs fonctions d'élimination des cellules apoptotiques.

Une élimination incomplète ou dérégulée des cellules apoptotiques a été impliquée dans la susceptibilité accrue aux infections, dans l'échappement de certains pathogènes conduisant à leur persistance et dans les mécanismes d'inflammation chronique. Elle est également fortement suspectée d'être associée à l'apparition des mécanismes auto-immuns (pour revue récente sur ces mécanismes: (Hochreiter-Hufford and Ravichandran 2013)). En règle générale, pourtant, les macrophages impliqués dans le nettoyage des corps apoptotiques ne produisent pas de réaction inflammatoire et contribuent à faire de l'apoptose *in vivo* une mort 'propre' et immunologiquement silencieuse (Voll, Herrmann et al. 1997). Ils sont même réputés produire des médiateurs anti-inflammatoires tels que l'IL10 et le TGF- β et aboutir à une immunosuppression (Poon, Hulett et al. 2010). Néanmoins en situation d'apoptose massive, une trop grande

quantité de cellules et corps apoptotiques à éliminer pourrait être responsable d'une réaction pro-inflammatoire liée à la nécrose secondaire de cellules apoptotiques incorrectement éliminées. On sait que les cellules nécrotiques mais également apoptotiques libèrent des alarmines telles que HMGB1 qui a été retrouvée associée aux blebs (Schiller, Heyder et al. 2013).

De plus la présence d'un pathogène dans les débris de cellules infectées ensuite ingérés, en stimulant parallèlement les récepteurs de l'immunité innée, pourrait conduire à des effets opposés sur le système immunitaire. Ces situations particulières d'élimination de sous produits de l'infection suggèrent que des modes de contrôle de la réponse inflammatoire ou anti inflammatoire coexistent lors de la phagocytose. La réponse des phagocytes mis dans ces situations serait conditionnée par la hiérarchie d'engagement des voies de signalisation et par l'importance des signaux respectifs.

► Ces mécanismes, nous avons cherché à les modéliser *in vitro* lors de l'infection par CHIKV, en comparant l'entrée du virus seul, au sein de corps apoptotiques ou de complexes immuns. Nous avons d'ores et déjà un certain nombre de réponses. Les macrophages de la lignée THP-1 répondent à la phagocytose de cellules infectées mourantes par une production atténuée de cytokines pro-inflammatoires, avec une absence d'IL6 et d'IL12 mais adoptent une polarisation plutôt de type M1 avec une expression marquée de cd11b et cox2. Ce modèle *in vitro* a évidemment ses inconvénients mais fournit des pistes de compréhension dont de nombreux aspects restent encore à explorer. Je pense qu'il faudra vérifier les données obtenues sur d'autres lignées de monocytes/macrophages (MonoMac6, U937) et sur des cultures de macrophages primaires isolés du sang de donneurs. Compte-tenu de la mise en évidence *in vitro* d'une persistance du virus plusieurs semaines après l'infection et pour comprendre les rôles de ces macrophages dans la chronicité, il faudra ensuite étudier leur statut inflammatoire sur le long terme, en les maintenant en culture sur de longues périodes post-infection.

Le statut inflammatoire et la polarisation des macrophages jouent un rôle essentiel dans la résolution de l'infection, le contrôle de la réponse et de la tolérance immunitaire. Le maintien ou l'évolution du phénotype des macrophages au cours de l'infection pourrait rendre compte de l'installation des manifestations chroniques

Le phénotype et les fonctions des macrophages sont également influencés par différents signaux. Les cytokines de type Th1 (IFN γ , IL-1 β) induisent l'état d'activation considéré comme «classique» de type M1, associé à la production de quantités importantes de cytokines pro-inflammatoires et de chémokines (telles que TNF- α , IL6, IL1- β , IL8, CXCL9 et 10). Les macrophages M1 ont une capacité phagocytaire amplifiée et sont caractérisés par la surexpression de divers marqueurs tels que CD80, la cyclooxygénase (Cox2) et iNOS (Mantovani, Sica et al. 2005). A l'inverse, des cytokines Th2 induisent une activation «alternative» ou M2. Les macrophages M2, pour lesquels trois sous groupes ont été décrits (M2a activés par les IL4 et 13, M2b activés par les complexes immuns et l'IL1- β , M2c activés par l'IL10 et TGF- β) produisent des facteurs anti-inflammatoires tels

que l'IL-10 et le TGF- β . Ils contribuent à l'angiogenèse et ont des capacités de réparation et de remodelage des tissus endommagés. Ils expriment en surface davantage de récepteurs scavenger tels que CD163 (M2c), CD 200 (M2a) ou CD206, le récepteur du mannose qui peuvent constituer des marqueurs pour leur détection (Gordon and Martinez 2010).

Pour faire simple, il est admis que les macrophages de type M1 sont déterminants pour l'élimination du pathogène et les macrophages M2 pour la résolution de l'inflammation. La balance entre les différents phénotypes conditionnerait l'issue de l'infection et la persistance éventuelle du pathogène.

► Il est indispensable, dans le contexte inflammatoire apparemment atypique de l'articulation arthritique post-Chikungunya d'identifier cette orientation phénotypique des macrophages et de la corrélérer avec les résultats que nous aurons pu obtenir *in vitro*.

Le projet consistera, en collaboration avec le service d'anatomo-pathologie du CHU, à caractériser la polarisation des macrophages infiltrés dans le tissu synovial et établir s'il y a une évolution au cours du temps de leur statut. Cette étude se fera par analyse histologique des biopsies de patients chroniques des biobanques disponibles ou à constituer.

La caractérisation du statut des macrophages orientera sur la nature et les causes de l'entretien de réponses immunes inadaptées impliquées dans la pathologie.

► Ces très nombreux macrophages infiltrés dans les tissus articulaires constituent d'ailleurs des cibles thérapeutiques qu'il faut prendre en considération pour l'élaboration de traitements curatifs et préventifs. Des traitements à base d'antagonistes de récepteurs de chémokines (par exemple CCR1) ou d'anticorps dirigés contre les chémokines pro-angiogéniques produites par les macrophages (par exemple IL8, MIP1, MCP-1) ont fait leur preuve dans des modèles arthritiques murins ou dans des essais cliniques actuellement en cours pour le traitement de la PR : revue dans (Maruotti, Annesse et al. 2013). Les modèles *in vitro* que nous développerons pourront servir de base pour tester l'effet de telles molécules.

B-2 Caractérisation de la persistance virale et évaluation de sa participation dans la symptomatologie chronique

L'hypothèse d'une situation pathologique entretenue par la persistance du virus a pris corps lorsqu'on a découvert qu'on avait du matériel viral encore présent dans le tissu synovial de notre patient opéré de son hygroma, 18 mois après avoir contracté le Chikungunya. Divers paramètres de la période post-infectieuse concordent avec le maintien d'une présence virale dans l'organisme. Ainsi plusieurs études ont montré qu'une réponse IgM CHIKV spécifique persistait de long mois après l'infection et particulièrement pour les patients souffrant d'arthralgie chronique (Chopra, Anuradha et al. 2008). Les capacités de persistance des arbovirus sont d'ailleurs connues de longue date et ont été associées à une détection prolongée d'IgM chez différents vertébrés

(humain, rongeurs, oiseaux) (Kuno 2001). Dans l'étude « chikimmunopath » menée sur une cohorte réunionnaise, si la présence persistante d'IgM n'apparaît pas comme significative chez les patients chroniques à 3 ans, leurs IgG présentent une plus grande activité que ceux des patients du groupe 'guéris' (Schilte, Staikovskiy et al. 2013) ce qui pourrait également corroborer une persistance virale. Enfin des niveaux d'IFN α demeurent également anormalement élevés au cours de la phase chronique.

Aucune trace du virus n'est repérable dans la circulation sanguine. La notion de persistance est indissociable de la notion de sanctuarisation au niveau articulaire, qui mobilise à priori principalement les macrophages comme niches virales.

A nouveau, divers travaux souvent anciens viennent étayer ces constatations.

Les travaux menés sur le virus RRV ont montré que les macrophages pouvaient être infectés de manière chronique par ADE (Linn, Aaskov et al. 1996) et qu'ils présentaient une importante résistance à l'activité anti-virale induite par les interférons de type I (Lidbury, Rulli et al. 2011).

Les macrophages ne sont pas les seules cellules qui pourraient héberger le virus sur de longues périodes. Des études supportent une persistance de RRV et CHIKV dans les cellules des muscles squelettiques humains ou de souris et cette persistance pourrait rendre compte des myalgies chroniques (Eaton and Hapel 1976; Ozden, Huerre et al. 2007).

La capacité de persistance de SINV est également connue de longue date (Levine, Hardwick et al. 1994). Des études sur des fibroblastes de souris en culture, remontant aux années 1970 indiquent que SINV peut produire périodiquement une multiplication virale accompagnée d'effets cytopathiques et que cette multiplication peut être amplifiée en ajoutant un anti-interféron dans le milieu de culture (Inglot, Albin et al. 1973). Un contrôle de l'apoptose par le virus a également constitué une des pistes d'explication du mécanisme de persistance (Griffin and Hardwick 1997).

Enfin, les modèles animaux accèdent un maintien du virus à long terme. Comme déjà évoqué, les données obtenues chez le macaque suggèrent une sanctuarisation et une persistance de CHIKV dans plusieurs tissus, entre autres dans le tissu synovial en absence de dommage arthritique évident et identifient les macrophages comme étant les réservoirs du virus (Labadie, Larcher et al. 2010). Des travaux récents sur un modèle de souris arthritiques indiquent que la persistance virale serait responsable des dommages musculo-squelettiques et que la réponse adaptative jouerait un rôle dans l'éradication incomplète du virus (Hawman, Stoermer et al. 2013).

► Cette persistance virale, nous avons pu la modéliser *in vitro* au cours de l'infection des macrophages THP-1 incubés avec des corps apoptotiques de cellules infectées. La détection d'ARN viral dans les extraits cellulaires s'est poursuivie au cours des deux mois qui ont suivi l'infection, durant lesquels nous avons pu conserver assez de cellules en culture. A partir de 15 jours post-infection, il n'a par contre pas été possible de détecter d'ARN viral dans les surnageants de culture, ni de récolter des particules virales infectieuses. Les résultats préliminaires de détection de protéines virales en

immunofluorescence suggèrent une expression persistante de E1 qui pourrait être localisée au niveau d'autophago-lysosomes.

► Il faut poursuivre ces travaux et identifier la forme sous laquelle le virus persiste, regarder comment il se réplique et comment il entretient à bas bruit son maintien dans les cellules.

► Il faut caractériser le ou les compartiments endomembranaires avec lesquels le virus interagit afin de comprendre comment il peut échapper à la veille immunitaire. Plusieurs questions restent à ce titre en suspens. Si l'expression de protéines structurales et non structurales est vérifiée, pourquoi le cycle viral est-il abortif et quelles seraient les conditions qui pourraient aboutir à une nouvelle production virale ? Quel rôle l'autophagie joue-t-elle dans le processus?

► Il faut également préciser les relations engagées entre le virus et les macrophages mais aussi considérer le rôle que pourraient jouer d'autres acteurs de la synovie. Des co-cultures associant les macrophages à des fibroblastes ou des fibrocytes et synoviocytes complèteraient la modélisation des mécanismes à l'origine de la persistance virale et des réponses immunes inadaptées.

► Enfin, il paraît nécessaire de confirmer qu'il y a une persistance virale dans les articulations des patients, et qu'elle est systématiquement associée aux symptômes chroniques. Pour cela, on doit disposer de biopsies articulaires et d'outils de détection du virus de grande sensibilité. Ces aspects seront conditionnés par la possibilité d'étoffer les biobanques dont nous disposons actuellement par la collecte d'échantillons post-opératoires, en collaboration avec les collègues chirurgiens et orthopédistes du CHU. La détection de faibles quantités attendues d'éléments viraux bénéficiera de la mise en place par l'équipe d'une technique performante d'hybridation in situ basée sur le principe d'une sonde branchée.

Cette technologie ouvrira des perspectives de mise au point d'outils potentiellement exploitables pour du diagnostic.

B-3 Les facteurs de l'hôte et la composante auto-immune

Le défaut de résolution de l'infection et la réponse altérée du système immunitaire constituent les clés de l'évolution vers la pathologie chronique. L'association, dans les corps apoptotiques, de matériel viral et de protéines cellulaires et les processus de leur élimination dans un contexte infectieux sont des éléments connus pour contribuer à l'apparition de facteurs pro-immuns qu'il s'agit aujourd'hui d'identifier.

Au jour d'aujourd'hui, les recherches des marqueurs d'une auto-immunité habituellement associée aux tableaux de PR se sont avérées infructueuses dans les

arthrites post-Chikungunya. Néanmoins elles n'excluent pas la possibilité que des néo-antigènes soient impliqués dans l'évolution vers la chronicité post-infectieuse.

Les pathologies auto-immunes et de nombreuses stratégies de persistance des pathogènes montrent que l'élimination des cellules mourantes est facilement manipulable et peut conduire à une altération de la réponse immunitaire. Les blebs et les corps apoptotiques sont riches des auto antigènes fréquemment retrouvés dans les pathologies auto-immunes, notamment lorsque ceux-ci sont de nature nucléaire (fragments d'ADN, nucléoprotéines). Les modèles murins Knock-Out dans les fonctions d'élimination des corps apoptotiques génèrent des pathologies auto-immunes semblables au lupus érythémateux disséminé, caractérisé chez l'homme par l'apparition d'auto-anticorps contre des antigènes nucléaires (Galvan, Greenlee-Wacker et al. 2012). Les complexes immuns résultants produisent chez la souris une inflammation chronique à l'origine des symptômes variés de la pathologie qui touchent les articulations, la peau ou les reins. Un défaut d'efferocytose, avec une mauvaise élimination des corps apoptotiques a d'ailleurs été mis en évidence chez certains patients.

Des études sur les dysfonctionnements à l'origine de l'autoimmunité montrent que le TGF- β , normalement produit par les macrophages lors de l'interaction puis de l'ingestion des cellules apoptotiques, aurait des fonctions immunosuppressives suffisantes pour éviter la production d'auto-anticorps (Erwig and Henson 2007; Erwig and Henson 2008). Or on sait que dans le contexte articulaire propre aux arthrites post-Chikungunya, ce TGF fait défaut.

On sait également que la production d'anticorps auto-réactifs pourrait être liée à la phagocytose de corps apoptotiques par les cellules présentatrices d'antigènes. L'ingestion de corps apoptotiques et de produits de nécrose secondaire lors d'apoptose massive peut conduire à une libération d'IL6 responsable de boucles auto et paracrine impliquées dans la génération des Anticorps autoréactifs (Fransen, Hilbrands et al. 2009; Suber and Rosen 2009).

Au cours de l'infection Chikungunya, de nombreuses conditions telles qu'une apoptose massive des fibroblastes, une absence de production de TGF- β par les macrophages mis en présence des corps apoptotiques infectés, une production durable d'IL6, semblent réunies pour aboutir à un contexte auto-immun.

Les blebs et corps apoptotiques libérés lors de l'infection associeront des facteurs cellulaires et du matériel viral. Ils pourraient également contenir les vésicules ou vacuoles cytopathiques (CPV) produites en cours d'infection et également réputées contenir des éléments viraux associés à un grand nombre de facteurs cellulaires. Ces vésicules ont été identifiées comme étant de nature endolysosomale pour les unes (CPV-1) et servant de plateformes pour la réplication virale ou appartenant au réseau trans-golgien pour les autres (CPV-2) et guidant l'assemblage des virions et leur bourgeonnement (Garoff, Sjoberg et al. 2004; Soonsawad, Xing et al. 2010). Parmi les facteurs cellulaires retrouvés associés, certains facilitent différents stades de l'infection, la formation des complexes réplicatifs, le recrutement de la matrice d'ARN négatif, la stabilisation des ARN positifs. D'autres s'avèrent au contraire recrutés pour restreindre les capacités virales (Nagy and Pogany 2012).

Toujours est-il que près d'une centaine de protéines cellulaires pouvant interagir avec les protéines virales et surtout les ARNs viraux ont été identifiées, parmi lesquelles plusieurs types de hnRNP (Bourai, Lucas-Hourani et al. 2012; Thio, Yusof et al. 2013). On sait que les hnRNP sont des cibles fréquentes des auto-anticorps dans les pathologies auto-immunes, notamment polyarthritiques (Caporali, Bugatti et al. 2005).

L'équipe de Andres Merits a récemment montré qu'il était possible d'isoler les vacuoles cytopathiques de nature endolysosomale (CPV-1) lors de l'infection par SFV (Varjak, Saul et al. 2013). En utilisant des billes magnétiques couvertes de dextran, ils ciblent et peuvent isoler ces compartiments et en analyser le contenu. Dans le cas de SFV ils ont trouvé qu'environ 70 protéines cellulaires étaient surreprésentées dans ces CPV dont 1/3 étaient des protéines et ribonucléoprotéines capables d'interagir avec l'ARN viral.

► Il serait intéressant de regarder le devenir des CPV lors de l'apoptose et de caractériser le contenu des blebs et corps apoptotiques libérés au cours de l'infection. Les produits de dégradation et les différentes protéines cellulaires embarquées dans les vésicules membranaires produites au moment du blebbing constituent autant de candidats possibles à l'émergence d'auto-antigènes.

► Le projet visant à identifier un néo-auto-antigène pourrait bénéficier de la technique d'isolement des CPV et d'une préparation de corps apoptotiques. Nous nous proposons de tester l'existence d'auto anticorps dirigés contre des éléments d'origine cellulaire embarqués dans les CPV ou dans les blebs et corps apoptotiques.

Nous regarderons pour cela la réactivité des sérums des patients chroniques sur ces préparations et isolerons les potentiels composants auto-réactifs afin de les identifier.

V CONCLUSION

Le temps consacré à ce moment de réflexion et d'analyse de mon parcours professionnel me permet aujourd'hui de préciser mes aspirations et les motivations de ma demande d'Habilitation à diriger les Recherches.

Mon parcours de recherche depuis 2007, s'est enraciné dans l'épidémie réunionnaise de Chikungunya. Il m'a permis de comprendre combien la réalité du patient et une collaboration avec les praticiens hospitaliers animaient la démarche scientifique même à son échelle cellulaire et moléculaire. Cet aspect rend infiniment concrets les efforts consentis à une recherche certes fondamentale mais qui prend dès lors une dimension essentielle : comprendre pour améliorer la prise en charge des individus. Il me semble, à ce point de l'évolution de ma carrière, que celle-ci est devenue indissociable du champ de la santé humaine. Je crains, d'une certaine manière, avoir contracté le virus du Chikungunya et devoir partager son histoire dorénavant chronique.

Il me tient en effet plus qu'à cœur d'élucider les mécanismes de l'évolution de la pathologie. M'intéressant plus particulièrement aux aspects cellulaires je compte poursuivre l'identification des relations que le virus établit avec son hôte et vérifierai le rôle joué par la persistance virale chez les patients souffrant d'arthralgies post-Chikungunya. Je pense ces activités indissociables d'un adossement au CHU, au travers des études conduites sur les cohortes de patients. Je souhaiterais donc que soit initiée une collaboration encore plus étroite avec les praticiens hospitaliers, ce qui me semble être le fondement du rapprochement opéré en 2012 entre l'Université de La Réunion et le Centre Hospitalier Régional.

Je ne conçois pas de progression dans la connaissance des mécanismes pathologiques sans la force d'un travail d'équipe. L'Habilitation à Diriger les Recherches m'ouvrira l'opportunité d'accueillir et de m'entourer de doctorants motivés et me permettra d'insuffler une dynamique de groupe pour mener le travail ambitieux d'identification des facteurs associés à la chronicité.

Mon implication dans l'organisation des activités collectives de recherche et la possibilité de guider vers leur émancipation technique et intellectuelle de jeunes chercheurs, constituent un atout pour mener parallèlement un enseignement académique de qualité, en prise avec les réalités scientifiques du terrain. La coordination du projet « Pathologies chroniques post-infectieuses », au-delà de l'enrichissement personnel qu'il me procurera, sera pour moi un formidable point de convergence entre mes activités d'enseignante et de chercheur. Il me confortera, au travers d'un même temps consacré à la Science, dans ma démarche résolue de former à la recherche de jeunes réunionnais engagés et curieux en leur transmettant mes connaissances et mon expérience.

Cette responsabilité nouvelle d'encadrement, si elle m'était permise, me conduira à privilégier un travail de coordination basé sur la reconnaissance et le rassemblement des compétences, la solidarité d'équipe, la capacité d'initiative et la valorisation des engagements individuels et collectifs.

BIBLIOGRAPHIE

Arankalle, V. A., S. Shrivastava, et al. (2007). "Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic." *J Gen Virol* **88**(Pt 7): 1967-1976.

Re-emergence of Chikungunya (CHIK), caused by CHIK virus, was recorded in India during 2005-2006 after a gap of 32 years, causing 1.3 million cases in 13 states. Several islands of the Indian Ocean reported similar outbreaks in the same period. These outbreaks were attributed to the African genotype of CHIK virus. To examine relatedness of the Indian isolates (IND-06) with Reunion Island isolates (RU), full-genome sequences of five CHIK virus isolates representative of different Indian states were determined. In addition, an isolate obtained from mosquitoes in the year 2000 (Yawat-2000), identified as being of the African genotype, and two older strains isolated in 1963 and 1973 (of the Asian genotype), were sequenced. The IND-06 isolates shared 99.9 % nucleotide identity with RU isolates, confirming involvement of the same strain in these outbreaks. The IND-06 isolates shared 98.2 % identity with the Yawat-2000 isolate. Of two crucial substitutions reported for RU isolates in the E1 region, M269V was noted in the Yawat-2000 and IND-06 isolates, whereas D284E was seen only in the IND-06 isolates. The A226V shift observed with the progression of the epidemic in Reunion Island, probably associated with adaptation to the mosquito vector, was absent in all of the Indian isolates. Three unique substitutions were noted in the IND-06 isolates: two (T128K and T376M) in the Nsp1 region and one (P23S) in the capsid protein. The two Asian strains showed 99.4 % nucleotide identity to each other, indicating relative stability of the virus. No evidence of recombination of the Asian and African genotypes, or of positive selection was observed. The results may help in understanding the association, if any, of the unique mutations with the explosive nature of the CHIK outbreak.

Assuncao-Miranda, I., C. Cruz-Oliveira, et al. (2013). "Molecular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Alphavirus-Induced Arthritis." *Biomed Res Int* **2013**: 973516.

Arthritogenic alphaviruses, including Ross River virus (RRV), Chikungunya virus (CHIKV), Sindbis virus (SINV), Mayaro virus (MAYV), O'nyong-nyong virus (ONNV), and Barmah Forest virus (BFV), cause incapacitating and long lasting articular disease/myalgia. Outbreaks of viral arthritis and the global distribution of these diseases point to the emergence of arthritogenic alphaviruses as an important public health problem. This review discusses the molecular mechanisms involved in alphavirus-induced arthritis, exploring the recent data obtained with in vitro systems and in vivo studies using animal models and samples from patients. The factors associated to the extension and persistence of symptoms are highlighted, focusing on (a) virus replication in target cells, and tissues, including macrophages and muscle cells; (b) the inflammatory and immune responses with recruitment and activation of macrophage, NK cells and T lymphocytes to the lesion focus and the increase of inflammatory mediators levels; and (c) the persistence of virus or viral products in joint and muscle tissues. We also discuss the importance of the establishment of novel animal models to test new molecular targets and to develop more efficient and selective drugs to treat these diseases.

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.

BACKGROUND: The replicative cycle of chikungunya virus (CHIKV), an alphavirus that recently re-emerged in India and in Indian Ocean area, remains mostly unknown. The aim of the present study was to investigate the intracellular trafficking pathway(s) hijacked by CHIKV to enter mammalian cells. **METHODOLOGY/PRINCIPAL FINDINGS:** Entry pathways were investigated using a variety of pharmacological inhibitors or overexpression of dominant negative forms of proteins perturbing cellular endocytosis. We found that CHIKV infection of HEK293T mammalian cells is independent of clathrin heavy chain and- dependent of functional Eps15, and requires integrity of Rab5-, but not Rab7-positive endosomal compartment. Cytoskeleton integrity is crucial as cytochalasin D and nocodazole significantly reduced infection of the cells. Finally, both methyl beta-cyclodextrin and lysomotropic agents impaired CHIKV infection, supporting that a cholesterol-, pH-dependent step is required to achieve productive infection. Interestingly, differential sensitivity to lysomotropic agents was observed between the prototypal 37997 African strain of CHIKV and the LR-OPY1 virus isolated from the recent outbreak in Reunion Island. **CONCLUSIONS:** Together our data indicate that CHIKV entry in its target cells is essentially mediated by clathrin-independent, Eps15-dependent endocytosis. Despite that this property is shared by the prototypal 37997 African strain of CHIKV and the LR-OPY1 virus isolated from the recent outbreak in La Reunion Island, differential sensitivity to lysomotropic agents may support that the LR-OPY1 strain has acquired specific entry mechanisms.

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): 782-785.

Bordi, L., S. Meschi, et al. (2011). "Chikungunya virus isolates with/without A226V mutation show different sensitivity to IFN- α , but similar replication kinetics in non human primate cells." New Microbiol **34**(1): 87-91.

Chikungunya virus (CHIKV) is a mosquito-transmitted alphavirus responsible for the first autochthonous Italian outbreak in 2007. A226V mutation in E1 has been associated with enhanced replication in *A. albopictus* vector. Possible involvement of this mutation in enhanced infection capability in primate cells and sensitivity to exogenous interferon (IFN)- α was investigated. No significant differences were observed between the two isolates in terms of replication kinetic, virus yield and cytopathic effect (CPE). Interestingly, the A226V-carrying strain was more susceptible to the antiviral action of recombinant IFN- α . The interplay between A226V mutation and innate defence mechanisms needs further investigation.

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): 469-475.

BACKGROUND: An outbreak of chikungunya virus infection occurred on Reunion Island during the period 2005-2006. Persistent arthralgia after chikungunya

virus infection has been reported, but few studies have treated this aspect of the disease. **METHODS:** Adult patients with laboratory-confirmed acute chikungunya virus infection who were referred to Groupe Hospitalier Sud Reunion during the period 2005-2006 were asked to participate in the study. Patients were assessed a mean of 18 months after acute disease occurred. Assessment consisted of answering questions on a standard form, undergoing a medical examination, and being tested for the presence of IgM antibodies to chikungunya virus. **RESULTS:** Eighty-eight patients (mean age, 58.3 years; male-to-female ratio, 1.1:1.0) were included in this study. Fifty-eight patients (65.9%) had been hospitalized for acute chikungunya virus infection, and a history of arthralgia before chikungunya virus infection was reported by 39 patients (44%). Fifty-six patients (63.6%) reported persistent arthralgia related to chikungunya virus infection, and in almost one-half of the patients, the joint pain had a negative impact on everyday activities. Arthralgia was polyarticular in all cases, and pain was continuous in 31 patients (55.4%). Overall, 35 patients (39.7%) had test results positive for IgM antibodies to chikungunya virus. **CONCLUSIONS:** Persistent and disabling arthralgia was a frequent concern in this cohort of patients who had experienced severe chikungunya virus infection approximately 18 months earlier. Further studies are needed to evaluate the prevalence of persistent arthralgia in the general population to determine the real burden of the disease.

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): 654-657.

OBJECTIVE: In 2005, after an epidemic infection of Chikungunya fever in islands in the Indian Ocean, infected patients exhibited severe musculoskeletal disorders. We report 21 cases of rheumatoid arthritis (RA) after Chikungunya infection that were diagnosed at a rheumatological centre in Reunion Island. **METHODS:** Patients were examined by the same rheumatologist from February 2006 to July 2007. Inclusion criteria were (1) Chikungunya infection confirmed by IgM and IgG antibodies, (2) RA according to ACR criteria, (3) no other definite diagnosis of arthritis and (4) persistent arthritis symptoms from the onset of viral infection to RA diagnosis. **RESULTS:** Twenty-one patients (13 females; mean age, 57+/-12 years) fulfilled the inclusion criteria. Eighteen patients (85.7%) had symmetric polyarthritis and three had oligoarthritis. The mean symptom duration was 10 months (range 4-18). The mean ESR was 40.7+/-28.1 mm/hr and C-reactive protein level 37+/-41 mg/l; 12 patients were positive for rheumatoid factor (57.1%), and six had anti-CCP antibodies (28.6%) and 14 HLA DRB1*04 or 01 alleles (66.6%). Radiographs of hands and feet of 12 patients showed erosions and/or joint space narrowing (JSN). During a mean follow-up of 27.6+/-6.4 months, all patients were treated with DMARDs including methotrexate (n=19) and TNF blockers (n=6). Structural damage progressed, with 17 cases of erosion and/or JSN at follow-up. **CONCLUSION:** We diagnosed RA in 21 patients with Chikungunya fever. The first symptoms occurred at the time of viral infection. Outcome was severe in most of the cases despite low rate of anti-CCP antibodies. These cases suggest a role of viral infection in RA initiation.

Bourai, M., M. Lucas-Hourani, et al. (2012). "Mapping of Chikungunya virus interactions with host proteins identified nsP2 as a highly connected viral component." *J Virol* **86**(6): 3121-3134.

Chikungunya virus (CHIKV) is a mosquito-transmitted alphavirus that has been responsible for an epidemic outbreak of unprecedented magnitude in recent years. Since then, significant efforts have been made to better understand the biology of this virus, but we still have poor knowledge of CHIKV interactions with host cell components at the molecular level. Here we describe the extensive use of high-throughput yeast two-hybrid (HT-Y2H) assays to characterize interactions between CHIKV and human proteins. A total of 22 high-confidence interactions, which essentially involved the viral nonstructural protein nsP2, were identified and further validated in protein complementation assay (PCA). These results were integrated to a larger network obtained by extensive mining of the literature for reports on alphavirus-host interactions. To investigate the role of cellular proteins interacting with nsP2, gene silencing experiments were performed in cells infected by a recombinant CHIKV expressing Renilla luciferase as a reporter. Collected data showed that heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K) and ubiquilin 4 (UBQLN4) participate in CHIKV replication in vitro. In addition, we showed that CHIKV nsP2 induces a cellular shutoff, as previously reported for other Old World alphaviruses, and determined that among binding partners identified by yeast two-hybrid methods, the tetratricopeptide repeat protein 7B (TTC7B) plays a significant role in this activity. Altogether, this report provides the first interaction map between CHIKV and human proteins and describes new host cell proteins involved in the replication cycle of this virus.

Brighton, S. W., O. W. Prozesky, et al. (1983). "Chikungunya virus infection. A retrospective study of 107 cases." *S Afr Med J* **63**(9): 313-315.

A retrospective study of 107 cases of serologically proven chikungunya (CHIK) virus infection was undertaken. All respondents had contracted the disease at least 3 years previously; 87,9% had fully recovered, 3,7% experienced only occasional stiffness or mild discomfort, 2,8% had persistent residual joint stiffness but no pain, while 5,6% had persistent joint pain and stiffness and frequent effusions. Synovial fluid from 3 patients was analysed. All the patients with persistent joint pain and stiffness had very high antibody titres against CHIK virus.

Brighton, S. W. and I. W. Simson (1984). "A destructive arthropathy following Chikungunya virus arthritis--a possible association." *Clin Rheumatol* **3**(2): 253-258.

Chikungunya virus arthritis is an acute severe polyarthrititis following upon the bite of infected mosquitoes in endemic areas. With rapid air transport an increasing number of tourists are being exposed to potential infection. Whether tourists returning home in the incubation viremic stage can infect local mosquito populations in their home countries is unknown. Most cases recover from the severe joint pains within several weeks but up to 12% retain some residual joint symptoms for years. A case report is given of probable Chikungunya arthritis progressing to joint destruction before ultimately subsiding after 15 years leaving a sequela of destroyed metatarsal heads and late osteoarthritic changes in the ankles.

Caporali, R., S. Bugatti, et al. (2005). "Autoantibodies to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins." Autoimmunity **38**(1): 25-32.

Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) are among the most abundant proteins in the eukaryotic cell nucleus and play a direct role in several aspects of the RNA life including splicing, export of the mature RNAs and translation. To date, approximately 30 proteins have been identified. A growing body of evidence points to hnRNPs as an important target of the autoimmune response in rheumatic diseases. Autoantibodies to A and B proteins of the hnRNP complex have been detected in late 1980s in rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus (SLE) and mixed connective tissue disease (MCTD). Beyond their role as diagnostic test in clinical practice, these autoantibodies are starting to be regarded as important tools to obtain deeper insight into the pathogenesis of autoimmune rheumatic diseases. Furthermore, new anti-hnRNP antibodies have been recognized in the last ten years extending the spectrum of anti-hnRNP reactivity in different autoimmune disorders.

Cartault, F., P. Munier, et al. (2012). "Mutation in a primate-conserved retrotransposon reveals a noncoding RNA as a mediator of infantile encephalopathy." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(13): 4980-4985.

The human genome is densely populated with transposons and transposon-like repetitive elements. Although the impact of these transposons and elements on human genome evolution is recognized, the significance of subtle variations in their sequence remains mostly unexplored. Here we report homozygosity mapping of an infantile neurodegenerative disease locus in a genetic isolate. Complete DNA sequencing of the 400-kb linkage locus revealed a point mutation in a primate-specific retrotransposon that was transcribed as part of a unique noncoding RNA, which was expressed in the brain. In vitro knockdown of this RNA increased neuronal apoptosis, consistent with the inappropriate dosage of this RNA in vivo and with the phenotype. Moreover, structural analysis of the sequence revealed a small RNA-like hairpin that was consistent with the putative gain of a functional site when mutated. We show here that a mutation in a unique transposable element-containing RNA is associated with lethal encephalopathy, and we suggest that RNAs that harbor evolutionarily recent repetitive elements may play important roles in human brain development.

Chaitanya, I. K., N. Muruganandam, et al. (2011). "Role of proinflammatory cytokines and chemokines in chronic arthropathy in CHIKV infection." Viral Immunol **24**(4): 265-271.

Chikungunya virus (CHIKV) has caused large outbreaks worldwide in recent years. Acute-phase CHIKV infection has been reported to cause mild to severe febrile illness, and in some patients, this may be followed by long-lasting polyarthritis. The mainstay of treatment includes nonsteroidal anti-inflammatory drugs and other disease-modifying agents, the use of which is based on the assumption of an immunological interference mechanism in the pathogenesis. The present study has been designed to generate preliminary evidence to test this hypothesis. The levels of 30 cytokines were estimated in serum samples of acute CHIKV-infected patients, fully-recovered patients, patients with chronic CHIKV arthritis, and controls, using a quantitative multiplex bead ELISA. The

levels of the proinflammatory cytokines IL-1 and IL-6 were elevated in acute patients, but IFN-gamma/beta and TNF-alpha levels remained stable. IL-10, which might have an anti-inflammatory effect, was also elevated, indicating a predominantly anti-inflammatory response in the acute phase of infection. Elevation of MCP-1, IL-6, IL-8, MIP-1alpha, and MIP-1beta was most prominent in the chronic phase. These cytokines and chemokines have been shown to play important roles in other arthritides, including epidemic polyarthritis (EPA) caused by Ross River virus (RRV) and rheumatoid arthritis (RA). The immunopathogenesis of chronic CHIKV arthritis might have similarities to these arthritides. The novel intervention strategies being developed for EPA and RA, such as IL-6 and IL-8 signaling blockade, may also be considered for chronic CHIKV arthritis.

Charrel, R. N., X. de Lamballerie, et al. (2007). "Chikungunya outbreaks--the globalization of vectorborne diseases." *N Engl J Med* **356**(8): 769-771.

Charrel, R. N., X. de Lamballerie, et al. (2008). "Seasonality of mosquitoes and chikungunya in Italy." *Lancet Infect Dis* **8**(1): 5-6.

Chen, Y. B., S. Y. Seo, et al. (2006). "Alternate functions of viral regulators of cell death." *Cell Death Differ* **13**(8): 1318-1324.

Chevillon, C., L. Briant, et al. (2008). "The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective." *Trends Microbiol* **16**(2): 80-88.

Chikungunya virus (CHIKV) is an emerging mosquito-borne alphavirus. Although primarily African and zoonotic, it is known chiefly for its non-African large urban outbreaks during which it is transmitted by the same vectors as those of Dengue viruses. Unlike Dengue viruses, CHIKV displays a re-emergence pattern that closely depends on long-distance migrations including recent re-immigrations from African (putatively zoonotic) sources. Genus-based differences also emerged when comparing the evolution of Dengue-related (Flaviviruses) and of CHIKV-related (Alphaviruses) arboviruses. In this review, we discuss current information on CHIKV genetics, ecology and human infection. Further investigations on African CHIKV ecology and the differences between Flavivirus and Alphavirus members in adaptive changes and evolutionary constraints are likely to help delineate the potential of further CHIKV (re-)emergence.

Chopra, A., V. Anuradha, et al. (2008). "Chikungunya virus aches and pains: an emerging challenge." *Arthritis Rheum* **58**(9): 2921-2922.

Chow, A., Z. Her, et al. (2011). "Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor." *J Infect Dis* **203**(2): 149-157.

BACKGROUND: Chikungunya virus (CHIKV) infection induces arthralgia. The involvement of inflammatory cytokines and chemokines has been suggested, but very little is known about their secretion profile in CHIKV-infected patients. METHODS: A case-control longitudinal study was performed that involved 30 adult patients with laboratory-confirmed Chikungunya fever. Their profiles of clinical disease, viral load, and immune mediators were investigated. RESULTS:

When patients were segregated into high viral load and low viral load groups during the acute phase, those with high viremia had lymphopenia, lower levels of monocytes, neutrophilia, and signs of inflammation. The high viral load group was also characterized by a higher production of pro-inflammatory cytokines, such as interferon-alpha and interleukin (IL)-6, during the acute phase. As the disease progressed to the chronic phase, IL-17 became detectable. However, persistent arthralgia was associated with higher levels of IL-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor, whereas patients who recovered fully had high levels of Eotaxin and hepatocyte growth factor. CONCLUSIONS: The level of CHIKV viremia during the acute phase determined specific patterns of pro-inflammatory cytokines, which were associated with disease severity. At the chronic phase, levels of IL-6, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor found to be associated with persistent arthralgia provide a possible explanation for the etiology of arthralgia that plagues numerous CHIKV-infected patients.

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.

Chikungunya virus (CHIKV) is a re-emerging arbovirus responsible for a massive outbreak currently afflicting the Indian Ocean region and India. Infection from CHIKV typically induces a mild disease in humans, characterized by fever, myalgia, arthralgia, and rash. Cases of severe CHIKV infection involving the central nervous system (CNS) have recently been described in neonates as well as in adults with underlying conditions. The pathophysiology of CHIKV infection and the basis for disease severity are unknown. To address these critical issues, we have developed an animal model of CHIKV infection. We show here that whereas wild type (WT) adult mice are resistant to CHIKV infection, WT mouse neonates are susceptible and neonatal disease severity is age-dependent. Adult mice with a partially (IFN-alpha/betaR(+/-)) or totally (IFN-alpha/betaR(-/-)) abrogated type-I IFN pathway develop a mild or severe infection, respectively. In mice with a mild infection, after a burst of viral replication in the liver, CHIKV primarily targets muscle, joint, and skin fibroblasts, a cell and tissue tropism similar to that observed in biopsy samples of CHIKV-infected humans. In case of severe infections, CHIKV also disseminates to other tissues including the CNS, where it specifically targets the choroid plexuses and the leptomeninges. Together, these data indicate that CHIKV-associated symptoms match viral tissue and cell tropisms, and demonstrate that the fibroblast is a predominant target cell of CHIKV. These data also identify the neonatal phase and inefficient type-I IFN signaling as risk factors for severe CHIKV-associated disease. The development of a permissive small animal model will expedite the testing of future vaccines and therapeutic candidates.

Couderc, T., N. Khandoudi, et al. (2009). "Prophylaxis and therapy for Chikungunya virus infection." *J Infect Dis* **200**(4): 516-523.

BACKGROUND: Chikungunya virus (CHIKV) is a recently reemerged arbovirus responsible for a massive outbreak of infection in the Indian Ocean region and India that has a very significant potential to spread globally because of the worldwide distribution of its mosquito vectors. CHIKV induces a usually self-

limited disease in humans that is characterized by fever, arthralgia, myalgia, and rash; however, cases of severe CHIKV infection have recently been described, particularly in adults with underlying condition and neonates born to viremic mothers. METHODS: Human polyvalent immunoglobulins were purified from plasma samples obtained from donors in the convalescent phase of CHIKV infection, and the preventive and curative effects of these immunoglobulins were investigated in 2 mouse models of CHIKV infection that we developed. RESULTS: CHIKV immunoglobulins contain anti-CHIKV antibodies and exhibit a high in vitro neutralizing activity and a powerful prophylactic and therapeutic efficacy against CHIKV infection in vivo, including in the neonate. CONCLUSIONS: Administration of CHIKV immunoglobulins may constitute a safe and efficacious prevention strategy and treatment for individuals exposed to CHIKV who are at risk of severe infection, such as neonates born to viremic mothers and adults with underlying conditions. These results provide a proof-of-concept for purifying human immunoglobulins from plasma samples from patients in the convalescent phase of an emerging infectious disease for which neither prevention nor treatment is available.

D'Ortenzio, E., M. Grandadam, et al. (2011). "A226V strains of Chikungunya virus, Reunion Island, 2010." *Emerg Infect Dis* **17**(2): 309-311.

Daigneault, M., J. A. Preston, et al. (2010). "The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages." *PLoS One* **5**(1): e8668.

Differentiated macrophages are the resident tissue phagocytes and sentinel cells of the innate immune response. The phenotype of mature tissue macrophages represents the composite of environmental and differentiation-dependent imprinting. Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and 1,25-dihydroxyvitamin D3 (VD(3)) are stimuli commonly used to induce macrophage differentiation in monocytic cell lines but the extent of differentiation in comparison to primary tissue macrophages is unclear. We have compared the phenotype of the promonocytic THP-1 cell line after various protocols of differentiation utilising VD(3) and PMA in comparison to primary human monocytes or monocyte-derived macrophages (MDM). Both stimuli induced changes in cell morphology indicative of differentiation but neither showed differentiation comparable to MDM. In contrast, PMA treatment followed by 5 days resting in culture without PMA (PMAr) increased cytoplasmic to nuclear ratio, increased mitochondrial and lysosomal numbers and altered differentiation-dependent cell surface markers in a pattern similar to MDM. Moreover, PMAr cells showed relative resistance to apoptotic stimuli and maintained levels of the differentiation-dependent anti-apoptotic protein Mcl-1 similar to MDM. PMAr cells retained a high phagocytic capacity for latex beads, and expressed a cytokine profile that resembled MDM in response to TLR ligands, in particular with marked TLR2 responses. Moreover, both MDM and PMAr retained marked plasticity to stimulus-directed polarization. These findings suggest a modified PMA differentiation protocol can enhance macrophage differentiation of THP-1 cells and identify increased numbers of mitochondria and lysosomes, resistance to apoptosis and the potency of TLR2 responses as important discriminators of the level of macrophage differentiation for transformed cells.

Das, T., M. C. Jaffar-Bandjee, et al. (2010). "Chikungunya fever: CNS infection and pathologies of a re-emerging arbovirus." Prog Neurobiol **91**(2): 121-129.

Chikungunya virus (CHIKV) is transmitted by *Aedes* mosquitoes and causes an acute symptomatic illness with fever, skin rash, and incapacitating arthralgia, which can evolve into chronic rheumatoid arthritis in elderly patients. This is a tropical disease originally described in central/east Africa in the 1960s, but its 2004 re-emergence in Africa and rapid spread in lands in and around the Indian Ocean (Reunion island, India, Malaysia) as well as Europe (Italy) led to almost 6 million cases worldwide. The risk of importation and spreading diseases with long-term sequelae is even greater today given the global distribution of the vectors (including in the Americas), increased tourism and the apparent capacity of CHIKV to produce high levels of viremia (10^9 - 10^{12} virus/ml of blood) and new mutants. CHIKV-associated neuropathology was described early in the 1960s, but it is the unprecedented incidence rate in Indian Ocean areas with efficient clinical facilities that allowed a better description of cases with severe encephalitis, meningoencephalitis, peripheral neuropathies and deaths among newborns (mother-to-child infection), infants and elderly patients. Death rates following CHIKV infection were estimated at 1:1000 cases in la Reunion's outbreak. These clinical observations have been corroborated by experimental infection in several mouse models, leading to CNS pathologies. We further describe in this review the capacity of CHIKV to infect neurons and glial cells, delineate the fundamental innate (intrinsic) immune defence mechanisms to protect from infection and argue about the possible mechanisms involved in the encephalopathy.

Dupuis-Maguiraga, L., M. Noret, et al. (2012). "Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia." PLoS Negl Trop Dis **6**(3): e1446.

At the end of 2005, an outbreak of fever associated with joint pain occurred in La Reunion. The causal agent, chikungunya virus (CHIKV), has been known for 50 years and could thus be readily identified. This arbovirus is present worldwide, particularly in India, but also in Europe, with new variants returning to Africa. In humans, it causes a disease characterized by a typical acute infection, sometimes followed by persistent arthralgia and myalgia lasting months or years. Investigations in the La Reunion cohort and studies in a macaque model of chikungunya implicated monocytes-macrophages in viral persistence. In this Review, we consider the relationship between CHIKV and the immune response and discuss predictive factors for chronic arthralgia and myalgia by providing an overview of current knowledge on chikungunya pathogenesis. Comparisons of data from animal models of the acute and chronic phases of infection, and data from clinical series, provide information about the mechanisms of CHIKV infection-associated inflammation, viral persistence in monocytes-macrophages, and their link to chronic signs.

Eaton, B. T. and A. J. Hapel (1976). "Persistent noncytolytic togavirus infection of primary mouse muscle cells." Virology **72**(1): 266-271.

Elliott, M. R. and K. S. Ravichandran (2010). "Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease." J Cell Biol **189**(7): 1059-1070.

Recent advances in defining the molecular signaling pathways that regulate the phagocytosis of apoptotic cells have improved our understanding of this complex and evolutionarily conserved process. Studies in mice and humans suggest that the prompt removal of dying cells is crucial for immune tolerance and tissue homeostasis. Failed or defective clearance has emerged as an important contributing factor to a range of disease processes. This review addresses how specific molecular alterations of engulfment pathways are linked to pathogenic states. A better understanding of the apoptotic cell clearance process in healthy and diseased states could offer new therapeutic strategies.

Erwig, L. P. and P. M. Henson (2007). "Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis." Am J Pathol **171**(1): 2-8.

Cells undergo apoptosis in development, tissue homeostasis, and disease and are subsequently cleared by professional and nonprofessional phagocytes. There is now overwhelming evidence that phagocyte function is profoundly altered following apoptotic cell uptake, with consequences for the ensuing innate and adaptive immune response. Pathogens and tumors exploit the changes in macrophage function following apoptotic cell uptake. Here, we will outline the consequences of apoptotic cell phagocytosis and illustrate how apoptotic cells could be used to manipulate the immune response for therapeutic gain.

Erwig, L. P. and P. M. Henson (2008). "Clearance of apoptotic cells by phagocytes." Cell Death Differ **15**(2): 243-250.

Phagocytic clearance of apoptotic cells may be considered to consist of four distinct steps: accumulation of phagocytes at the site where apoptotic cells are located; recognition of dying cells through a number of bridge molecules and receptors; engulfment by a unique uptake process; and processing of engulfed cells within phagocytes. Here, we will discuss these individual steps that collectively are essential for the effective removal of apoptotic cells. This will illustrate our relative lack of knowledge about the initial attraction signals, the specific mechanisms of engulfment and processing in comparison to the extensive literature on recognition mechanisms. There is now mounting evidence that clearance defects are responsible for chronic inflammatory disease and contribute to autoimmunity. Therefore, a better understanding of all aspects of the clearance process is required before it can truly be manipulated for therapeutic gain.

Espert, L., M. Denizot, et al. (2006). "Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4." J Clin Invest **116**(8): 2161-2172.

HIV-1 envelope glycoproteins (Env), expressed at the cell surface, induce apoptosis of uninfected CD4⁺ T cells, contributing to the development of AIDS. Here we demonstrate that, independently of HIV replication, transfected or HIV-infected cells that express Env induced autophagy and accumulation of Beclin 1 in uninfected CD4⁺ T lymphocytes via CXCR4. The same phenomena occurred in a T cell line and in transfected HEK.293 cells that expressed both wild-type CXCR4 and a truncated form of CD4 that is unable to bind the lymphocyte-specific protein kinase Lck. Env-mediated autophagy is required to trigger CD4⁺ T cell

apoptosis since blockade of autophagy at different steps, by either drugs (3-methyladenine and bafilomycin A1) or siRNAs specific for Beclin 1/Atg6 and Atg7 genes, totally inhibited the apoptotic process. Furthermore, CD4+ T cells still underwent Env-mediated cell death with autophagic features when apoptosis was inhibited. These results suggest that HIV-infected cells can induce autophagy in bystander CD4+ T lymphocytes through contact of Env with CXCR4, leading to apoptotic cell death, a mechanism most likely contributing to immunodeficiency.

Espert, L., M. Varbanov, et al. (2009). "Differential role of autophagy in CD4 T cells and macrophages during X4 and R5 HIV-1 infection." *PLoS One* 4(6): e5787.

BACKGROUND: HIV-1 can infect and replicate in both CD4 T cells and macrophages. In these cell types, HIV-1 entry is mediated by the binding of envelope glycoproteins (gp120 and gp41, Env) to the receptor CD4 and a coreceptor, principally CCR5 or CXCR4, depending on the viral strain (R5 or X4, respectively). Uninfected CD4 T cells undergo X4 Env-mediated autophagy, leading to their apoptosis, a mechanism now recognized as central to immunodeficiency. METHODOLOGY/PRINCIPAL FINDINGS: We demonstrate here that autophagy and cell death are also induced in the uninfected CD4 T cells by HIV-1 R5 Env, while autophagy is inhibited in productively X4 or R5-infected CD4 T cells. In contrast, uninfected macrophages, a preserved cell population during HIV-1 infection, do not undergo X4 or R5 Env-mediated autophagy. Autophagosomes, however, are present in macrophages exposed to infectious HIV-1 particles, independently of coreceptor use. Interestingly, we observed two populations of autophagic cells: one highly autophagic and the other weakly autophagic. Surprisingly, viruses could be detected in the weakly autophagic cells but not in the highly autophagic cells. In addition, we show that the triggering of autophagy in macrophages is necessary for viral replication but addition of Bafilomycin A1, which blocks the final stages of autophagy, strongly increases productive infection. CONCLUSIONS/SIGNIFICANCE: Taken together, our data suggest that autophagy plays a complex, but essential, role in HIV pathology by regulating both viral replication and the fate of the target cells.

Everett, H. and G. McFadden (1999). "Apoptosis: an innate immune response to virus infection." *Trends Microbiol* 7(4): 160-165.

Viruses can induce apoptosis of infected cells either directly, to assist virus dissemination, or by inadvertently triggering cellular sensors that initiate cell death. Cellular checkpoints that can function as 'alarm bells' to transmit pro-apoptotic signals in response to virus infections include death receptors, protein kinase R, mitochondrial membrane potential, p53 and the endoplasmic reticulum.

Flannagan, R. S., V. Jaumouille, et al. (2012). "The cell biology of phagocytosis." *Annu Rev Pathol* 7: 61-98.

Engulfment and destruction of invading microorganisms by phagocytosis are critical components of the innate immune response. In addition, phagocytosis is also required for the clearance of apoptotic bodies, an essential aspect of tissue homeostasis and remodeling. Here, we summarize the current knowledge of the cellular and molecular basis of phagosome formation and maturation. We discuss

the manner in which phagocytosis is subverted by certain pathogens and consider congenital disorders that affect phagocyte function.

Fransen, J. H., L. B. Hilbrands, et al. (2009). "Both early and late apoptotic blebs are taken up by DC and induce IL-6 production." *Autoimmunity* **42**(4): 325-327.

During apo blebs, containing nuclear components, are formed at the cells' surfaces. When these blebs separate from the dying cell an apo cell body remains. The contents of apo blebs are modified and can be released, especially in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) since impaired clearance of apo material has been observed in this autoimmune condition. Accordingly, autoantibodies present in subjects with SLE bind to apo blebs. Based on AnxA5 binding, and permeability for PI, we show that apo blebs can be categorized as early (AnxA5(+)/PI(-)) or late (AnxA5(+)/PI(+)) apo ones. Both forms of blebs contain apo-induced chromatin modifications and are efficiently phagocytosed by dendritic cell (DC). Uptake by DC of late, but also early apo blebs, stimulate DC to produce IL-6. This bleb-induced effect on DC may be an important step in the initiation of the autoimmune responses in SLE.

Frolova, E. I., R. Gorchakov, et al. (2010). "Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane." *J Virol* **84**(22): 11679-11695.

Formation of virus-specific replicative complexes (RCs) in infected cells is one of the most intriguing and important processes that determine virus replication and ultimately their pathogenesis on the molecular and cellular levels. Alphavirus replication was known to lead to formation of so-called type 1 cytopathic vacuoles (CPV1s), whose distinguishing feature is the presence of numerous membrane invaginations (spherules) and accumulation of viral nonstructural proteins (nsPs) at the cytoplasmic necks of these spherules. These CPV1s, modified endosomes and lysosomes, were proposed as the sites of viral RNA synthesis. However, our recent studies have demonstrated that Sindbis virus (SINV)-specific, double-stranded RNA (dsRNA)- and nonstructural protein (nsP)-containing RCs are initially formed at the plasma membrane. In this new study, we present extensive evidence that (i) in cells of vertebrate origin, at early times postinfection, viral nsPs colocalize with spherules at the plasma membrane; (ii) viral dsRNA intermediates are packed into membrane spherules and are located in their cavities on the external surface of the plasma membrane; (iii) formation of the membrane spherules is induced by the partially processed nonstructural polyprotein P123 and nsP4, but synthesis of dsRNA is an essential prerequisite of their formation; (iv) plasma membrane-associated dsRNA and protein structures are the active sites of single-stranded RNA (ssRNA) synthesis; (v) at late times postinfection, only a small fraction of SINV nsP-containing complexes are relocalized into the cytoplasm on the endosome membrane. (vi) pharmacological drugs inhibiting different endocytotic pathways have either only minor or no negative effects on SINV RNA replication; and (vii) in mosquito cells, at any times postinfection, dsRNA/nsP complexes and spherules are associated with both endosomal/lysosomal and plasma membranes, suggesting that mechanisms of RC formation may differ in cells of insect and vertebrate origins.

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* **84**(20): 10877-10887.

Chikungunya virus (CHIKV) is an emerging human pathogen transmitted by mosquitoes. Like that of other alphaviruses, CHIKV replication causes general host shutoff, leading to severe cytopathicity in mammalian cells, and inhibits the ability of infected cells to respond to interferon (IFN). Recent research, however, suggests that alphaviruses may have additional mechanisms to circumvent the host's antiviral IFN response. Here we show that CHIKV replication is resistant to inhibition by interferon once RNA replication has been established and that CHIKV actively suppresses the antiviral IFN response by preventing IFN-induced gene expression. Both CHIKV infection and CHIKV replicon RNA replication efficiently blocked STAT1 phosphorylation and/or nuclear translocation in mammalian cells induced by either type I or type II IFN. Expression of individual CHIKV nonstructural proteins (nsPs) showed that nsP2 was a potent inhibitor of IFN-induced JAK-STAT signaling. In addition, mutations in CHIKV-nsP2 (P718S) and Sindbis virus (SINV)-nsP2 (P726S) that render alphavirus replicons noncytopathic significantly reduced JAK-STAT inhibition. This host shutoff-independent inhibition of IFN signaling by CHIKV is likely to have an important role in viral pathogenesis.

Froshauer, S., J. Kartenbeck, et al. (1988). "Alphavirus RNA replicase is located on the cytoplasmic surface of endosomes and lysosomes." J Cell Biol **107**(6 Pt 1): 2075-2086.

Using morphological and cell biological techniques, we have shown that the RNA replicase of Semliki Forest and Sindbis virus (two closely related alphaviruses) is located in complex ribonucleoprotein structures associated with the cytoplasmic surface of modified secondary lysosomes and endosomes. These nucleoprotein complexes often form a bridge between the membrane of the endocytic vacuole and the rough endoplasmic reticulum where the synthesis of the structural proteins of these viruses occurs. The results suggest that these cytopathic vacuoles constitute sites not only for viral RNA synthesis, but also for translation of structural proteins, and for the assembly of nucleocapsids.

Galvan, M. D., M. C. Greenlee-Wacker, et al. (2012). "C1q and phagocytosis: the perfect complement to a good meal." J Leukoc Biol **92**(3): 489-497.

Complement component C1q is a member of a family of soluble proteins called defense collagens, which are important in host defense and apoptotic cell clearance. Failure to efficiently clear apoptotic cells in the absence of C1q is associated with autoimmunity. Here, we review the literature describing a central role for C1q in the enhancement of phagocyte function and focus specifically on C1q in apoptotic cell clearance. In addition, we highlight our recent findings demonstrating that C1q elicits a macrophage phenotype that is tailored specifically for clearance of apoptotic cells.

Gardner, J., I. Anraku, et al. (2010). "Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice." J Virol **84**(16): 8021-8032.

Chikungunya virus is a mosquito-borne arthropogenic alphavirus that has recently reemerged to produce the largest epidemic ever documented for this virus. Here we describe a new adult wild-type mouse model of chikungunya virus arthritis, which recapitulates the self-limiting arthritis, tenosynovitis, and myositis seen in humans. Rheumatic disease was associated with a prolific infiltrate of monocytes, macrophages, and NK cells and the production of monocyte chemoattractant

protein 1 (MCP-1), tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), and gamma interferon (IFN-gamma). Infection with a virus isolate from the recent Reunion Island epidemic induced significantly more mononuclear infiltrates, proinflammatory mediators, and foot swelling than did an Asian isolate from the 1960s. Primary mouse macrophages were shown to be productively infected with chikungunya virus; however, the depletion of macrophages ameliorated rheumatic disease and prolonged the viremia. Only 1 microg of an unadjuvanted, inactivated, whole-virus vaccine derived from the Asian isolate completely protected against viremia and arthritis induced by the Reunion Island isolate, illustrating that protection is not strain specific and that low levels of immunity are sufficient to mediate protection. IFN-alpha treatment was able to prevent arthritis only if given before infection, suggesting that IFN-alpha is not a viable therapy. Prior infection with Ross River virus, a related arthrogenic alphavirus, and anti-Ross River virus antibodies protected mice against chikungunya virus disease, suggesting that individuals previously exposed to Ross River virus should be protected from chikungunya virus disease. This new mouse model of chikungunya virus disease thus provides insights into pathogenesis and a simple and convenient system to test potential new interventions.

Garoff, H., M. Sjoberg, et al. (2004). "Budding of alphaviruses." *Virus Res* **106**(2): 103-116.

Alphaviruses are small highly ordered enveloped RNA viruses, which replicate very efficiently in the infected cell. They consist of a nucleocapsid (NC) and a surrounding membrane with glycoproteins. In the NC the positive single stranded RNA genome of the virus is enclosed by a T=4 icosahedral shell of capsid (C) proteins. The glycoproteins form a second shell with corresponding symmetry on the outside of the lipid membrane. These viruses mature by budding at the plasma membrane (PM) of the infected cell and enter into new cells by acid-triggered membrane fusion in endosomes. The viral glycoprotein consists of two subunits, E1, which carries the membrane fusion function, and E2, which suppresses this function until acid activation occurs. In the infected cell the RNA replication and transcription are confined to the cytoplasmic surface of endosome-derived vesicles called cytopathic vacuoles type I (CPV I). These structures are closely associated with membranes of the endoplasmic reticulum (ER), thereby creating a microenvironment for synthesis of viral proteins, assembly of the glycoproteins and formation of genome-C complexes. The budding process of the virus is initiated by C-glycoprotein interactions, possibly already before the glycoproteins arrive at the PM. This might involve a premade, ordered NC or a less ordered form of the genome-C complex. In the latter case, the interactions in the glycoprotein shell provide the major driving force for budding. The nature of the C-glycoprotein interaction has been resolved at atomic resolution by modelling. It involves hydrophobic interactions between a Tyr-X-Leu tripeptide in the internal tail of the E2 subunit and a pocket on the surface of the C protein. When the virus enters the endosome of a new cell the acid conditions trigger rearrangements in the glycoprotein shell, which result in the dissociation of the interactions that drive budding and a concomitant activation of the membrane fusion function in the E1 subunit.

Gerardin, P., A. Fianu, et al. (2011). "Perceived morbidity and community burden after a Chikungunya outbreak: the TELECHIK survey, a population-based cohort study." *BMC Med* **9**: 5.

BACKGROUND: Persistent disabilities are key manifestations of Chikungunya virus (CHIKV) infection, especially incapacitating polyarthralgia and fatigue. So far, little is known about their impact on health status. The present study aimed at describing the burden of CHIKV prolonged or late-onset symptoms on the self-perceived health of La Reunion islanders. **METHODS:** At 18 months after an outbreak of Chikungunya virus, we implemented the TELECHIK survey; a retrospective cohort study conducted on a random sample of the representative SEROCHIK population-based survey. A total of 1,094 subjects sampled for CHIKV-specific IgG antibodies in the setting of La Reunion island in the Indian Ocean, between August 2006 and October 2006, were interviewed about current symptoms divided into musculoskeletal/rheumatic, fatigue, cerebral, sensorineural, digestive and dermatological categories. **RESULTS:** At the time of interview, 43% of seropositive (CHIK+) subjects reported musculoskeletal pain (vs 17% of seronegative (CHIK-) subjects, $P < 0.001$), 54% fatigue (vs 46%, $P = 0.04$), 75% cerebral disorders (vs 57%, $P < 0.001$), 49% sensorineural impairments (vs 37%, $P = 0.001$), 18% digestive complaints (vs 15%, $P = 0.21$), and 36% skin involvement (vs 34%, $P = 0.20$) on average 2 years after infection (range: 15-34 months). After controlling for confounders such as age, gender, body mass index or major comorbidities in different Poisson regression models, 33% of joint pains were attributable to CHIKV, 10% of cerebral disorders and 7.5% of sensorineural impairments, while Chikungunya did not enhance fatigue states, digestive and skin disorders. **CONCLUSIONS:** On average, 2 years after infection 43% to 75% of infected people reported prolonged or late-onset symptoms highly attributable to CHIKV. These manifestations carry a significant burden in the community in the fields of rheumatology, neurology and sensorineural health.

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.

BACKGROUND: Chikungunya virus (CHIKV) caused a major two-wave seventeen-month-long outbreak in La Reunion Island in 2005-2006. The aim of this study was to refine clinical estimates provided by a regional surveillance-system using a two-stage serological assessment as gold standard. **METHODS:** Two serosurveys were implemented: first, a rapid survey using stored sera of pregnant women, in order to assess the attack rate at the epidemic upsurge (s1, February 2006; $n = 888$); second, a population-based survey among a random sample of the community, to assess the herd immunity in the post-epidemic era (s2, October 2006; $n = 2442$). Sera were screened for anti-CHIKV specific antibodies (IgM and IgG in s1, IgG only in s2) using enzyme-linked immunosorbent assays. Seroprevalence rates were compared to clinical estimates of attack rates. **RESULTS:** In s1, 18.2% of the pregnant women were tested positive for CHIKV specific antibodies (13.8% for both IgM and IgG, 4.3% for IgM, 0.1% for IgG only) which provided a congruent estimate with the 16.5% attack rate calculated from the surveillance-system. In s2, the seroprevalence in community was estimated to 38.2% (95% CI, 35.9 to 40.6%). Extrapolations of

seroprevalence rates led to estimate, at 143,000 and at 300,000 (95% CI, 283,000 to 320,000), the number of people infected in s1 and in s2, respectively. In comparison, the surveillance-system estimated at 130,000 and 266,000 the number of people infected for the same periods. CONCLUSION: A rapid serosurvey in pregnant women can be helpful to assess the attack rate when large seroprevalence studies cannot be done. On the other hand, a population-based serosurvey is useful to refine the estimate when clinical diagnosis underestimates it. Our findings give valuable insights to assess the herd immunity along the course of epidemics.

Gordon, S. and F. O. Martinez (2010). "Alternative activation of macrophages: mechanism and functions." *Immunity* **32**(5): 593-604.

Grandadam, M., V. Caro, et al. (2011). "Chikungunya virus, southeastern France." *Emerg Infect Dis* **17**(5): 910-913.

In September 2010, autochthonous transmission of chikungunya virus was recorded in southeastern France, where the *Aedes albopictus* mosquito vector is present. Sequence analysis of the viral genomes of imported and autochthonous isolates indicated new features for the potential emergence and spread of the virus in Europe.

Gregoire, I. P., C. Richetta, et al. (2011). "IRGM is a common target of RNA viruses that subvert the autophagy network." *PLoS Pathog* **7**(12): e1002422.

Autophagy is a conserved degradative pathway used as a host defense mechanism against intracellular pathogens. However, several viruses can evade or subvert autophagy to insure their own replication. Nevertheless, the molecular details of viral interaction with autophagy remain largely unknown. We have determined the ability of 83 proteins of several families of RNA viruses (Paramyxoviridae, Flaviviridae, Orthomyxoviridae, Retroviridae and Togaviridae), to interact with 44 human autophagy-associated proteins using yeast two-hybrid and bioinformatic analysis. We found that the autophagy network is highly targeted by RNA viruses. Although central to autophagy, targeted proteins have also a high number of connections with proteins of other cellular functions. Interestingly, immunity-associated GTPase family M (IRGM), the most targeted protein, was found to interact with the autophagy-associated proteins ATG5, ATG10, MAP1CL3C and SH3GLB1. Strikingly, reduction of IRGM expression using small interfering RNA impairs both Measles virus (MeV), Hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-induced autophagy and viral particle production. Moreover we found that the expression of IRGM-interacting MeV-C, HCV-NS3 or HIV-NEF proteins per se is sufficient to induce autophagy, through an IRGM dependent pathway. Our work reveals an unexpected role of IRGM in virus-induced autophagy and suggests that several different families of RNA viruses may use common strategies to manipulate autophagy to improve viral infectivity.

Griffin, D. E. and J. M. Hardwick (1997). "Regulators of apoptosis on the road to persistent alphavirus infection." *Annu Rev Microbiol* **51**: 565-592.

Alphavirus infection can trigger the host cell to activate its genetically programmed cell death pathway, leading to the morphological features of

apoptosis. The ability to activate this death pathway is dependent on both viral and cellular determinants. The more virulent strains of alphavirus induce apoptosis with increased efficiency both in animal models and in some cultured cells. Although the immune system clearly plays a central role in clearing virus, the importance of other cellular factors in determining the outcome of virus infections are evident from the observation that mature neurons are better able to resist alphavirus-induced apoptosis than immature neurons are, both in culture and in mouse brains. These findings are consistent with the age-dependent susceptibility to disease seen in animals. Cellular genes that are known to regulate the cell death pathway can modulate the outcome of alphavirus infection in cultured cells and perhaps in animals. The cellular bax and bak genes, which are known to accelerate cell death, also accelerate virus-induced apoptosis. In contrast, inhibitors of apoptotic cell death such as bcl-2 suppress virus-induced apoptosis, which can facilitate a persistent virus infection. Thus, the balance of cellular factors that regulate cell death may be critical in virus infections. Additional viral factors also contribute to this balance. The more virulent strains of alphavirus have acquired the ability to induce apoptosis in mature neurons, while mature neurons are resistant to cell death upon infection with less virulent strains. Here we discuss a variety of cellular and viral factors that modulate the outcome of virus infection.

Grimley, P. M., I. K. Berezsky, et al. (1968). "Cytoplasmic structures associated with an arbovirus infection: loci of viral ribonucleic acid synthesis." *J Virol* **2**(11): 1326-1338.

Unique cytoplasmic structures, herein designated as type I cytopathic vacuoles (CPV-I), are found in chick embryo cells early in the logarithmic phase of Semliki Forest virus replication. High resolution autoradiography demonstrated that the CPV-I are loci of (3)H-uridine incorporation. This evidence correlates well with previous biochemical data and electron microscopy of the subcellular fractions active in Semliki Forest virus ribonucleic acid synthesis. Origin of the CPV-I within host cell cytoplasm is confirmed by the distribution of electron-dense tracer particles and sequential ultrastructural observations.

Hahn, N. and W. D. Zimmerman (1970). "Chikungunya virus infection of cell monolayers by cell-to-cell and extracellular transmission." *Appl Microbiol* **19**(2): 389-391.

Both cell-to-cell and extracellular transmission of chikungunya virus infection was demonstrated in BHK21/C13 cell monolayers. The mode of virus infection may depend on the cell line. Virus transmission in L-929 and guinea pig lung cell lines was extracellular.

Halstead, S. B. (2003). "Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses." *Adv Virus Res* **60**: 421-467.

Hawman, D. W., K. A. Stoermer, et al. (2013). "Chronic joint disease caused by persistent chikungunya virus infection is controlled by the adaptive immune response." *J Virol*.

Chikungunya virus (CHIKV) is a re-emerging mosquito-borne pathogen that causes incapacitating disease in humans characterized by intense joint pain that can persist for weeks, months, or even years. Although there is some evidence of persistent CHIKV infection in humans suffering from chronic rheumatologic

disease symptoms, little is known about chronic disease pathogenesis and no specific therapies exist for acute or chronic CHIKV disease. To investigate mechanisms of chronic CHIKV-induced disease, we utilized a mouse model and defined the duration of CHIKV infection in tissues and the associated histopathological changes. Although CHIKV RNA was readily detectable in a variety of tissues very early after infection, CHIKV RNA persisted specifically in joint-associated tissues for at least 16 weeks. Inoculation of Rag1^{-/-} mice, which lack T and B cells, resulted in higher viral levels in a variety of tissues, suggesting that adaptive immunity controls the tissue-specificity and persistence of CHIKV infection. The presence of CHIKV RNA in tissues of wild-type and Rag1^{-/-} mice was associated with histopathological evidence of synovitis, arthritis, and tendonitis; thus CHIKV-induced persistent arthritis is not mediated primarily by adaptive immune responses. Finally, we show that prophylactic administration of CHIKV-specific monoclonal antibodies prevented the establishment of CHIKV persistence whereas therapeutic administration had tissue-specific efficacy. These findings suggest that chronic musculoskeletal tissue pathology is caused by persistent CHIKV infection and controlled by adaptive immune responses. Our results have significant implications for the development of strategies to mitigate the disease burden associated with CHIKV infection in humans.

Heaton, N. S. and G. Randall (2010). "Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism." *Cell Host Microbe* **8**(5): 422-432.

Autophagy influences numerous cellular processes, including innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. However, some viruses, including dengue virus (DENV), usurp autophagy to enhance their replication. The mechanism for a positive role of autophagy in DENV infection is unclear. We present data that DENV induction of autophagy regulates cellular lipid metabolism. DENV infection leads to an autophagy-dependent processing of lipid droplets and triglycerides to release free fatty acids. This results in an increase in cellular beta-oxidation, which generates ATP. These processes are required for efficient DENV replication. Importantly, exogenous fatty acids can supplant the requirement of autophagy in DENV replication. These results define a role for autophagy in DENV infection and provide a mechanism by which viruses can alter cellular lipid metabolism to promote their replication.

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): 5903-5913.

Chikungunya virus (CHIKV) is an alphavirus that causes chronic and incapacitating arthralgia in humans. To date, interactions between the immune system and the different stages of the virus life cycle remain poorly defined. We demonstrated for the first time that CHIKV Ags could be detected in vivo in the monocytes of acutely infected patients. Using in vitro experimental systems, whole blood and purified monocytes, we confirmed that monocytes could be infected and virus growth could be sustained. CHIKV interactions with monocytes, and with other blood leukocytes, induced a robust and rapid innate immune response with the production of specific chemokines and cytokines. In particular, high levels of IFN-alpha were produced rapidly after CHIKV incubation with monocytes. The identification of monocytes during the early phase of CHIKV

infection in vivo is significant as infected monocyte/macrophage cells have been detected in the synovial tissues of chronically CHIKV-infected patients, and these cells may behave as the vehicles for virus dissemination. This may explain the persistence of joint symptoms despite the short duration of viremia. Our results provide a better understanding on the basic mechanisms of infection and early antiviral immune responses and will help in the development of future effective control strategies.

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): 5914-5927.

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 10¹⁰ 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(++) 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.

Hochreiter-Hufford, A. and K. S. Ravichandran (2013). "Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(1): a008748.

Clearance of apoptotic cells is the final stage of programmed cell death. Uncleared corpses can become secondarily necrotic, promoting inflammation and autoimmunity. Remarkably, even in tissues with high cellular turnover, apoptotic cells are rarely seen because of efficient clearance mechanisms in healthy individuals. Recently, significant progress has been made in understanding the steps involved in prompt cell clearance in vivo. These include the sensing of corpses via "find me" signals, the recognition of corpses via "eat me" signals and their cognate receptors, the signaling pathways that regulate cytoskeletal rearrangement necessary for engulfment, and the responses of the phagocyte

that keep cell clearance events "immunologically silent." This study focuses on our understanding of these steps.

Inglot, A. D., M. Albin, et al. (1973). "Persistent infection of mouse cells with Sindbis virus: role of virulence of strains, auto-interfering particles and interferon." J Gen Virol **20**(1): 105-110.

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): 1206-1218.

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.

Jaffar-Bandjee, M. C., D. Ramful, et al. (2010). "Emergence and clinical insights into the pathology of Chikungunya virus infection." Expert Rev Anti Infect Ther **8**(9): 987-996.

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-Barre 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.

Jose, J., J. E. Snyder, et al. (2009). "A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly." Future Microbiol **4**(7): 837-856.

Alphaviruses are small, spherical, enveloped, positive-sense ssRNA viruses responsible for a considerable number of human and animal diseases. Alphavirus members include Chikungunya virus, Sindbis virus, Semliki Forest virus, the western, eastern and Venezuelan equine encephalitis viruses, and the Ross River virus. Alphaviruses can cause arthritic diseases and encephalitis in humans and animals and continue to be a worldwide threat. The viruses are transmitted by blood-sucking arthropods, and replicate in both arthropod and vertebrate hosts. Alphaviruses form spherical particles (65-70 nm in diameter) with icosahedral symmetry and a triangulation number of four. The icosahedral structures of alphaviruses have been defined to very high resolutions by cryo-electron microscopy and crystallographic studies. In this review, we summarize the major events in alphavirus infection: entry, replication, assembly and budding. We focus on data acquired from structural and functional studies of the alphaviruses. These structural and functional data provide a broader perspective of the virus lifecycle and structure, and allow additional insight into these important viruses.

Joubert, P. E., S. Werneke, et al. (2012). "Chikungunya-induced cell death is limited by ER and oxidative stress-induced autophagy." *Autophagy* **8**(8): 1261-1263.

It has been recognized that macroautophagy constitutes an important survival mechanism that allows both the maintenance of cellular homeostasis and the regulation of programmed cell death pathways (e.g., apoptosis). Although several pathogens have been described to induce autophagy, the prosurvival function of this process in infectious models remains poorly characterized. Our recent studies on chikungunya virus (CHIKV), the causative agent of major epidemics in India, Southeast Asia and southern Europe, reveal a novel mechanism by which autophagy limits the cytopathic effects of CHIKV by impinging upon virus-induced cell death pathways.

Joubert, P. E., S. W. Werneke, et al. (2012). "Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death." *J Exp Med* **209**(5): 1029-1047.

Autophagy is an important survival pathway and can participate in the host response to infection. Studying Chikungunya virus (CHIKV), the causative agent of a major epidemic in India, Southeast Asia, and southern Europe, we reveal a novel mechanism by which autophagy limits cell death and mortality after infection. We use biochemical studies and single cell multispectral assays to demonstrate that direct infection triggers both apoptosis and autophagy. CHIKV-induced autophagy is mediated by the independent induction of endoplasmic reticulum and oxidative stress pathways. These cellular responses delay apoptotic cell death by inducing the IRE1alpha-XBP-1 pathway in conjunction with ROS-mediated mTOR inhibition. Silencing of autophagy genes resulted in enhanced intrinsic and extrinsic apoptosis, favoring viral propagation in cultured cells. Providing in vivo evidence for the relevance of our findings, Atg16L(HM) mice, which display reduced levels of autophagy, exhibited increased lethality and showed a higher sensitivity to CHIKV-induced apoptosis. Based on kinetic studies and the observation that features of apoptosis and autophagy were mutually exclusive, we conclude that autophagy inhibits caspase-dependent cell death but is ultimately overwhelmed by viral replication. Our study suggests that inducers of autophagy may limit the pathogenesis of acute Chikungunya disease.

Judith, D., S. Mostowy, et al. (2013). "Species-specific impact of the autophagy machinery on Chikungunya virus infection." *EMBO Rep* **14**(6): 534-544.

Chikungunya virus (CHIKV) is a recently re-emerged arbovirus that triggers autophagy. Here, we show that CHIKV interacts with components of the autophagy machinery during its replication cycle, inducing a cytoprotective effect. The autophagy receptor p62 protects cells from death by binding ubiquitinated capsid and targeting it to autophagolysosomes. By contrast, the human autophagy receptor NDP52--but not its mouse orthologue--interacts with the non-structural protein nsP2, thereby promoting viral replication. These results highlight the distinct roles of p62 and NDP52 in viral infection, and identify NDP52 as a cellular factor that accounts for CHIKV species specificity.

Kelvin, A. A., D. Banner, et al. (2011). "Inflammatory cytokine expression is associated with chikungunya virus resolution and symptom severity." *PLoS Negl Trop Dis* **5**(8): e1279.

The Chikungunya virus infection zones have now quickly spread from Africa to parts of Asia, North America and Europe. Originally thought to trigger a disease of only mild symptoms, recently Chikungunya virus caused large-scale fatalities and widespread economic loss that was linked to recent virus genetic mutation and evolution. Due to the paucity of information on Chikungunya immunological progression, we investigated the serum levels of 13 cytokines/chemokines during the acute phase of Chikungunya disease and 6- and 12-month post-infection follow-up from patients of the Italian outbreak. We found that CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1, IL-6 and CXCL10/IP-10 were significantly raised in the acute phase compared to follow-up samples. Furthermore, IL-1beta, TNF-alpha, IL-12, IL-10, IFN-gamma and IL-5 had low initial acute phase levels that significantly increased at later time points. Analysis of symptom severity showed association with CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 and IgG levels. These data give insight into Chikungunya disease establishment and subsequent convalescence, which is imperative to the treatment and containment of this quickly evolving and frequently re-emerging disease.

Koch, A. E., P. J. Polverini, et al. (1992). "Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis." *Science* **258**(5089): 1798-1801.

Angiogenic factors produced by monocytes-macrophages are involved in the pathogenesis of chronic inflammatory disorders characterized by persistent angiogenesis. The possibility was tested that interleukin-8 (IL-8), which is a cytokine that is chemotactic for lymphocytes and neutrophils, is also angiogenic. Human recombinant IL-8 was potently angiogenic when implanted in the rat cornea and induced proliferation and chemotaxis of human umbilical vein endothelial cells. Angiogenic activity present in the conditioned media of inflamed human rheumatoid synovial tissue macrophages or lipopolysaccharide-stimulated blood monocytes was equally blocked by antibodies to either IL-8 or tumor necrosis factor-alpha. An IL-8 antisense oligonucleotide specifically blocked the production of monocyte-induced angiogenic activity. These data suggest a function for macrophage-derived IL-8 in angiogenesis-dependent disorders such as rheumatoid arthritis, tumor growth, and wound repair.

Krejebich-Trotot, P., M. Denizot, et al. (2011). "Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses." *FASEB J* **25**(1): 314-325.

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.

Krejchich-Trotot, P., B. Gay, et al. (2011). "Chikungunya triggers an autophagic process which promotes viral replication." *Virology* **8**: 432.

BACKGROUND: Chikungunya Virus (ChikV) surprised by a massive re-emerging outbreak in Indian Ocean in 2006, reaching Europe in 2007 and exhibited exceptional severe physiopathology in infants and elderly patients. In this context, it is important to analyze the innate immune host responses triggered against ChikV. Autophagy has been shown to be an important component of the innate immune response and is involved in host defense elimination of different pathogens. However, the autophagic process was recently observed to be hijacked by virus for their own replication. Here we provide the first evidence that hallmarks of autophagy are specifically found in HEK.293 infected cells and are involved in ChikV replication. **METHODS:** To test the capacity of ChikV to mobilize the autophagic machinery, we performed fluorescence microscopy experiments on HEK.GFP.LC3 stable cells, and followed the LC3 distribution during the time course of ChikV infection. To confirm this, we performed electron microscopy on HEK.293 infected cells. To test the effect of ChikV-induced-autophagy on viral replication, we blocked the autophagic process, either by pharmacological (3-MA) or genetic inhibition (siRNA against the transcript of Beclin 1, an autophagic protein), and analyzed the percentage of infected cells and the viral RNA load released in the supernatant. Moreover, the effect of induction of autophagy by Rapamycin on viral replication was tested. **RESULTS:** The increasing number of GFP-LC3 positive cells with a punctate staining together with the enhanced number of GFP-LC3 dots per cell showed that ChikV triggered an autophagic process in HEK.293 infected cells. Those results were confirmed by electron microscopy analysis since numerous membrane-bound vacuoles characteristic of autophagosomes were observed in infected cells. Moreover, we found that inhibition of autophagy, either by biochemical reagent and RNA interference, dramatically decreases ChikV replication. **CONCLUSIONS:** Taken together, our results suggest that autophagy may play a promoting role in ChikV replication. Investigating in details the relationship between autophagy and viral replication will greatly improve our knowledge of the pathogenesis of ChikV and provide insight for the design of candidate antiviral therapeutics.

Kucharz, E. J. and I. Cebula-Byrska (2012). "Chikungunya fever." *Eur J Intern Med* **23**(4): 325-329.

Chikungunya fever (CF) is an acute illness caused by Chikungunya virus (CHIKV) belonging to the alphavirus genus of the Alphaviruses (Togaviridae) family. The virus is transmitted by *Aedes* mosquitoes. CF is primarily tropical disease occurring in Africa, Asia and Indian Ocean islands but in the last decade an outbreak of CHIKV autochthonous infections were reported in Italy and France. It is associated with viral genome mutations facilitating transmission of the disease by *Aedes albopictus*, a mosquito occurring in several European countries. The CF

is highly symptomatic, characterized by fever, cutaneous rash and severe arthralgia and arthritis. In some patients severe neurological or hemorrhagic manifestations occur. The disease is self-limiting but a part of the patients suffers from a long-lasting arthritis akin to rheumatoid arthritis. Treatment is only symptomatic. Prevention includes reduction of mosquito bite (mosquito net, repellent) or application of measures against mosquito larvae. Vaccination is not currently available but investigations are in progress. Chikungunya virus (CHIKV) presents a significant worldwide health problem affecting in the last decade millions of persons, and currently dangerous also for European countries.

Kumar, S., M. C. Jaffar-Bandjee, et al. (2012). "Mouse macrophage innate immune response to Chikungunya virus infection." *Virology* **9**: 313.

BACKGROUND: Infection with Chikungunya alphavirus (CHIKV) can cause severe arthralgia and chronic arthritis in humans with persistence of the virus in perivascular macrophages of the synovial membrane by mechanisms largely ill-characterized. **FINDINGS:** We herein analysed the innate immune response (cytokine and programmed cell death) of RAW264.7 mouse macrophages following CHIKV infection. We found that the infection was restrained to a small percentage of cells and was not associated with a robust type I IFN innate immune response (IFN- α 4 and ISG56). TNF- α , IL-6 and GM-CSF expression were upregulated while IFN- γ , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 or IL-17 expression could not be evidenced prior to and after CHIKV exposure. Although CHIKV is known to drive apoptosis in many cell types, we found no canonical signs of programmed cell death (cleaved caspase-3, -9) in infected RAW264.7 cells. **CONCLUSION:** These data argue for the capacity of CHIKV to infect and drive a specific innate immune response in RAW264.7 macrophage cell which seems to be polarized to assist viral persistence through the control of apoptosis and IFN signalling.

Kuno, G. (2001). "Persistence of arboviruses and antiviral antibodies in vertebrate hosts: its occurrence and impacts." *Rev Med Virol* **11**(3): 165-190.

The recent isolation of West Nile virus from a bird in mid-winter in New York immediately raised, as one of a few explanations, the possibility of long-term persistence of arboviruses in vertebrate hosts. Although it was a highly popular topic for research many years ago, generally it has since been neglected and its meaning under appreciated. This comprehensive survey of literature worldwide uncovered, contrary to the general perception that it is a rather infrequent phenomenon, a large number of important observations involving all groups of arboviruses that have been accumulating over the years without drawing much attention. In this review, the data and observations were analysed in terms of the occurrence, role in natural transmission, mechanisms and genesis of persistence, source of problems in research and impact. The outcome of the analyses clearly demonstrates that asymptomatic, long-term infection in the absence of viraemia with or without the induction of neutralising antibody, the most frequent characteristics of arboviral persistence, presents a serious question about the validity of some of the past animal experiments that were conducted without the consideration of such a possibility. Likewise, significant impacts are felt on diverse fields ranging from epidemiology to diagnostic virology and from

veterinary medicine to agricultural commerce. Published in 2001 by John Wiley & Sons, Ltd.

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.

Chikungunya virus (CHIKV) is a mosquito-borne alphavirus that induces in humans a disease characterized by fever, rash, and pain in muscles and joints. The recent emergence or reemergence of CHIKV in the Indian Ocean Islands and India has stressed the need to better understand the pathogenesis of this disease. Previous CHIKV disease models have used young or immunodeficient mice, but these do not recapitulate human disease patterns and are unsuitable for testing immune-based therapies. Herein, we describe what we believe to be a new model for CHIKV infection in adult, immunocompetent cynomolgus macaques. CHIKV infection in these animals recapitulated the viral, clinical, and pathological features observed in human disease. In the macaques, long-term CHIKV infection was observed in joints, muscles, lymphoid organs, and liver, which could explain the long-lasting CHIKV disease symptoms observed in humans. In addition, the study identified macrophages as the main cellular reservoirs during the late stages of CHIKV infection in vivo. This model of CHIKV physiopathology should allow the development of new therapeutic and/or prophylactic strategies.

Leung, J. Y., M. M. Ng, et al. (2011). "Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells." Adv Virol **2011**: 249640.

Alphaviruses are small, enveloped viruses, ~70 nm in diameter, containing a single-stranded, positive-sense, RNA genome. Viruses belonging to this genus are predominantly arthropod-borne viruses, known to cause disease in humans. Their potential threat to human health was most recently exemplified by the 2005 Chikungunya virus outbreak in La Reunion, highlighting the necessity to understand events in the life-cycle of these medically important human pathogens. The replication and propagation of viruses is dependent on entry into permissive cells. Viral entry is initiated by attachment of virions to cells, leading to internalization, and uncoating to release genetic material for replication and propagation. Studies on alphaviruses have revealed entry via a receptor-mediated, endocytic pathway. In this paper, the different stages of alphavirus entry are examined, with examples from Semliki Forest virus, Sindbis virus, Chikungunya virus, and Venezuelan equine encephalitis virus described.

Levine, B., J. M. Hardwick, et al. (1994). "Persistence of alphaviruses in vertebrate hosts." Trends Microbiol **2**(1): 25-28.

Alphaviruses are a group of arthropod-borne, positive-strand RNA viruses that cause acute encephalitis or arthritis. These viruses were previously thought to cause only acute infections in vertebrates, but recent evidence suggests that host immunological and tissue-specific factors may act together to promote the persistence of alphavirus genomes in vivo.

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): 157-162.

An attenuated chikungunya (CHIK) virus clone was developed for production of a live vaccine for human use. CHIK strain 15561 was subjected to 18 plaque-to-

plaque passages in MRC-5 cultures before CHIK 181/clone 25 was selected as vaccine seed based on homogeneous small plaque size, suckling mouse avirulence, reduced monkey viraemia and genetic stability. Oligonucleotide mapping demonstrated differences between parent and clone. Vaccine (pilot-lot production) elicited neutralizing antibody and protected mice and rhesus monkeys against challenge. After challenge, viraemias were absent in vaccinated monkeys. Vaccine was then produced and tested in accordance with governmental regulatory requirements of human use.

Lewthwaite, P., R. Vasanthapuram, et al. (2009). "Chikungunya virus and central nervous system infections in children, India." Emerg Infect Dis **15**(2): 329-331.

Chikungunya virus (CHIKV) is a mosquito-borne alphavirus best known for causing fever, rash, arthralgia, and occasional neurologic disease. By using real-time reverse transcription-PCR, we detected CHIKV in plasma samples of 8 (14%) of 58 children with suspected central nervous system infection in Bellary, India. CHIKV was also detected in the cerebrospinal fluid of 3 children.

Lidbury, B. A. and S. Mahalingam (2000). "Specific ablation of antiviral gene expression in macrophages by antibody-dependent enhancement of Ross River virus infection." J Virol **74**(18): 8376-8381.

Ross River virus (RRV) is an indigenous Australian arthropod-borne alphavirus responsible for epidemic polyarthritides (EPA), myalgia, and lethargy in humans. Macrophages and monocytes have been associated with human RRV disease, and previous studies have shown that RRV is capable of infecting macrophages via both a natural virus receptor and by Fc receptor-mediated antibody-dependent enhancement (ADE). Similar to other viruses, such as human immunodeficiency virus and dengue virus, ADE infection results in dramatic RRV growth increases for in vitro macrophage cultures. This study demonstrates that RRV could resist lipopolysaccharide (LPS)-induced antiviral activity in macrophage cultures when infection was via the ADE pathway. Investigation of this infection pathway found that RRV was able to suppress the transcription and translation of key antiviral genes (tumor necrosis factor and inducible nitric oxide synthase) in LPS-stimulated macrophages by disrupting the transcription into mRNA of the genes coding for the associated transcription factors IRF-1 and NF-kappaB. The transcription of non-antiviral control genes was not perturbed by RRV-ADE infection, and de novo protein synthesis also was not significantly affected in RRV-ADE infected cells. The ADE pathway of infection allowed RRV to specifically target antiviral genes in macrophages, resulting in unrestricted virus replication. As ADE has been observed for several virus families and associated with disease and adverse vaccination outcomes, these findings may have broad relevance to viral disease formation and antiviral vaccination strategies.

Lidbury, B. A., N. E. Rulli, et al. (2011). "Identification and characterization of a Ross River virus variant that grows persistently in macrophages, shows altered disease kinetics in a mouse model, and exhibits resistance to type I interferon." J Virol **85**(11): 5651-5663.

Alphaviruses, such as chikungunya virus, o'nyong-nyong virus, and Ross River virus (RRV), cause outbreaks of human rheumatic disease worldwide. RRV is a positive-sense single-stranded RNA virus endemic to Australia and Papua New Guinea. In this study, we sought to establish an in vitro model of RRV evolution in

response to cellular antiviral defense mechanisms. RRV was able to establish persistent infection in activated macrophages, and a small-plaque variant (RRV(PERS)) was isolated after several weeks of culture. Nucleotide sequence analysis of RRV(PERS) found several nucleotide differences in the nonstructural protein (nsP) region of the RRV(PERS) genome. A point mutation was also detected in the E2 gene. Compared to the parent virus (RRV-T48), RRV(PERS) showed significantly enhanced resistance to beta interferon (IFN-beta)-stimulated antiviral activity. RRV(PERS) infection of RAW 264.7 macrophages induced lower levels of IFN-beta expression and production than infection with RRV-T48. RRV(PERS) was also able to inhibit type I IFN signaling. Mice infected with RRV(PERS) exhibited significantly enhanced disease severity and mortality compared to mice infected with RRV-T48. These results provide strong evidence that the cellular antiviral response can direct selective pressure for viral sequence evolution that impacts on virus fitness and sensitivity to alpha/beta IFN (IFN-alpha/beta).

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)**: 407-411.

Ross River virus (RRV) is the aetiological agent of epidemic polyarthritis (EPA) a predominantly rheumatic disease afflicting up to 5000 Australians annually. We show here for the first time that macrophages can be productively infected by RRV. Subneutralizing titres of anti-RRV IgG (but not IgM) also showed classical antibody-dependent enhancement (ADE) of RRV infection in macrophage and monocyte cell lines. No correlation between development of EPA and the pre-existence of ADE titres was apparent, nor could sera raised against a related arbovirus, Barmah Forest, enhance RRV infection. Tumour necrosis factor-alpha, implicated in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis, was not secreted by RRV-infected monocytes or macrophages. Macrophage cell lines infected with RRV were, however, capable of producing virus for over 50 days. RRV-induced arthritis may therefore be due to the persistent productive infection of macrophages, perhaps established by a brief period of ADE early in infection.

Lo Presti, A., M. Ciccozzi, et al. (2012). "Origin, evolution, and phylogeography of recent epidemic CHIKV strains." *Infect Genet Evol* **12(2)**: 392-398.

Chikungunya virus (CHIKV) is an arthropod-borne virus of the Alphavirus genus, which is transmitted to humans by *Aedes* spp. mosquitoes and was firstly identified in Tanzania in the mid 1950s. In this article, the findings of a phylogenetic and phylogeographic analysis of the recent CHIKV pandemic are reported. We estimated time of origin of the ancestral virus, time and place of occurrence of A226V mutation, and the flow of viral strains from an area to the other. The Bayesian phylogenetic and phylogeographic analysis was performed on the whole dataset, which consisted of 195 E1 (envelope 1) CHIKV sequences, and on a subset (D2), including 146 of the 195 previous sequences. Using the relaxed clock model, we estimated a CHIKV E1 mean evolutionary rate (in the whole dataset) of 1.4×10^{-3} substitution/site/year (95% highest posterior density interval HPD 6.4×10^{-4} - 2.5×10^{-3}), and of 2.2×10^{-3} (95% HPD 9.6×10^{-4} - 3.8×10^{-3}) in the D2 subset, including only the strains involved in the recent Indian Ocean epidemic. The phylogeographical analysis suggested an

African origin of CHIKV with a tMRCA of 146 years corresponding to 1863 (95% HPD 1741-1941). Moreover D2 subset most probably originated in Kenya, with a tMRCA corresponding to the year 2002 (95% HPD 2000-2004), then spread following two distinct routes: one throughout the Indian Ocean (Reunion, Comoros) and the other moving from India then scattered in the South East Asia and reached Italy. In conclusion, we reconstructed the geographic spread of CHIKV during the last epidemic wave, which showed an eastward path from Africa to Indian Ocean island to India, and from there to other South East Asian countries. Whether A226V variants followed the same migration path remains undefined, since local independent mutations, followed by fixation due to selective advantage conferred by better adaptation to local vectors of infection, cannot be excluded.

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.

Mahendradas, P., S. K. Ranganna, et al. (2008). "Ocular manifestations associated with chikungunya." Ophthalmology **115**(2): 287-291.

PURPOSE: To report ocular manifestations associated with chikungunya. DESIGN: Retrospective, nonrandomized, observational case series. PARTICIPANTS: Nine chikungunya patients with ocular involvement. METHODS: All patients with chikungunya infection presenting with ocular complaints from September 2006 to October 2006 were included in the study. The infection was confirmed by demonstration of chikungunya immunoglobulin M antibody in sera of all patients. All patients underwent an ophthalmic examination including fundus photography, fundus fluorescein angiography, confocal microscopy of keratic precipitates, and optical coherence tomography. Positive ocular changes were recorded and tabulated. MAIN OUTCOME MEASURES: Characteristics, frequency, and locations of ocular lesions found in the participants. RESULTS: There were 9 patients with ocular lesions; 1 had nodular episcleritis, 5 presented with acute iridocyclitis, and 3 had retinitis. Four to 12 weeks before the development of ocular manifestations, all of these patients had fever. Although there were no specific changes of iridocyclitis that were diagnostic of the fever, the retinal changes were consistent with viral retinitis. All patients recovered from the infection with relatively good vision. CONCLUSION: It appears that iridocyclitis and retinitis are the most common ocular manifestations associated with chikungunya, with a typically benign clinical course. Less frequent ocular lesions include episcleritis. All the patients responded well to the treatment with preservation of good vision. To the best of our knowledge, similar ocular manifestations associated with chikungunya infection have not been reported. In the differential diagnosis of iridocyclitis and retinitis with features suggestive of a viral infection, the entity of chikungunya-associated ocular changes should be considered in the regions affected by the epidemic.

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): 392-399.

This longitudinal follow-up study of 203 patients with serologically confirmed chikungunya (CHIK) virus infection describes the clinical features of CHIK fever during the first and tenth months of illness. During the acute stage CHIK fever presents with a wide array of symptoms. The foremost chronic symptoms at the end of a month were rheumatism (75%) and fatigue (30%). During the tenth month of follow-up the symptoms/signs observed were joint pain/swelling (46%), fatigue (13%) and neuritis (6%). The cure rate at the end of 9 months was 51%. Among the patients who had joint pain, 36% (34/94) met the American College of Rheumatology criteria to classify them as having rheumatoid arthritis. A subpopulation of the patients with joint pain (20/94) was tested for rheumatoid factor (RF) and anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibody, and the joints were imaged by X-ray and magnetic resonance imaging (MRI). All tested negative for RF and one tested positive for anti-CCP. A radiolucent lesion in the X-ray was seen in the bones of five patients. The MRI findings were joint effusion, bony erosion, marrow oedema, synovial thickening, tendinitis and tenosynovitis. The study proves with relative certainty that CHIK arthritis is chronic inflammatory erosive arthritis, which has implications for management of the infection.

Mantovani, A., A. Sica, et al. (2005). "Macrophage polarization comes of age." *Immunity* **23**(4): 344-346.

Martins, I., O. Kepp, et al. (2010). "Surface-exposed calreticulin in the interaction between dying cells and phagocytes." *Ann N Y Acad Sci* **1209**: 77-82.

Phagocytosis is essential for pathogen elimination and for the removal of apoptotic corpses, a process that has been long considered immunologically silent. The phagocytic uptake of apoptotic/necrotic cells involves a plethora of molecules, including immunoglobulins, lectins, components of the complement system (all of which act as opsonins), as well as the phospholipid phosphatidylserine (PS) and the endoplasmic reticulum chaperone calreticulin (CRT), both of which can be exposed on the surface of dying cells. For a long time, surface-exposed CRT was believed to participate in phagocytosis, mostly as a (co)receptor for specific opsonins. Recently, this view has been challenged by the observations that, similar to PS, CRT acts as a facultative recognition ligand on apoptotic cells, and that cytotoxic agents such as anthracyclines induce the exposure of CRT on the surface of dying tumor cells, thereby generating an engulfment signal that stimulates the uptake of apoptotic corpses and the presentation of the corresponding antigens by dendritic cells. Here, we summarize the current knowledge on the role of CRT and CRT-interacting proteins during corpse removal.

Maruotti, N., T. Annese, et al. (2013). "Macrophages and angiogenesis in rheumatic diseases." *Vasc Cell* **5**(1): 11.

Angiogenesis plays a key role in several rheumatic diseases, including rheumatoid arthritis, osteoarthritis, ankylosing spondylitis, systemic sclerosis, systemic lupus erythematosus, and vasculitides. An imbalance between angiogenic inducers and inhibitors seems to be a critical factor in pathogenesis of these diseases. Macrophages promote angiogenesis during rheumatoid arthritis. In addition, macrophages can produce a variety of pro-angiogenic factors that

have been associated with the angiogenic response occurring during other rheumatic diseases. Lastly, macrophages could be a target in the treatment of rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases. Nevertheless, further studies are needed to better elucidate the exact role of macrophage in angiogenesis in these diseases.

Mercer, J. and A. Helenius (2008). "Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells." *Science* **320**(5875): 531-535.

Viruses employ many different strategies to enter host cells. Vaccinia virus, a prototype poxvirus, enters cells in a pH-dependent fashion. Live cell imaging showed that fluorescent virus particles associated with and moved along filopodia to the cell body, where they were internalized after inducing the extrusion of large transient membrane blebs. p21-activated kinase 1 (PAK1) was activated by the virus, and the endocytic process had the general characteristics of macropinocytosis. The induction of blebs, the endocytic event, and infection were all critically dependent on the presence of exposed phosphatidylserine in the viral membrane, which suggests that vaccinia virus uses apoptotic mimicry to enter cells.

Messaoudi, I., J. Vomaske, et al. (2013). "Chikungunya virus infection results in higher and persistent viral replication in aged rhesus macaques due to defects in anti-viral immunity." *PLoS Negl Trop Dis* **7**(7): e2343.

Chikungunya virus (CHIKV) is a re-emerging mosquito-borne Alphavirus that causes a clinical disease involving fever, myalgia, nausea and rash. The distinguishing feature of CHIKV infection is the severe debilitating poly-arthralgia that may persist for several months after viral clearance. Since its re-emergence in 2004, CHIKV has spread from the Indian Ocean region to new locations including metropolitan Europe, Japan, and even the United States. The risk of importing CHIKV to new areas of the world is increasing due to high levels of viremia in infected individuals as well as the recent adaptation of the virus to the mosquito species *Aedes albopictus*. CHIKV re-emergence is also associated with new clinical complications including severe morbidity and, for the first time, mortality. In this study, we characterized disease progression and host immune responses in adult and aged Rhesus macaques infected with either the recent CHIKV outbreak strain La Reunion (LR) or the West African strain 37997. Our results indicate that following intravenous infection and regardless of the virus used, Rhesus macaques become viremic between days 1-5 post infection. While adult animals are able to control viral infection, aged animals show persistent virus in the spleen. Virus-specific T cell responses in the aged animals were reduced compared to adult animals and the B cell responses were also delayed and reduced in aged animals. Interestingly, regardless of age, T cell and antibody responses were more robust in animals infected with LR compared to 37997 CHIKV strain. Taken together these data suggest that the reduced immune responses in the aged animals promotes long-term virus persistence in CHIKV-LR infected Rhesus monkeys.

Morrison, T. E., L. Oko, et al. (2011). "A mouse model of chikungunya virus-induced musculoskeletal inflammatory disease: evidence of arthritis, tenosynovitis, myositis, and persistence." *Am J Pathol* **178**(1): 32-40.

Chikungunya virus (CHIKV), an emerging mosquito-borne Alphavirus, causes debilitating rheumatic disease in humans that can last for weeks to months. Starting in 2004, a CHIKV outbreak in the Indian Ocean region affected millions of people, and infected travelers introduced CHIKV to new regions. The pathogenesis of CHIKV is poorly understood, and no approved vaccines or specific therapies exist. A major challenge to the study of CHIKV disease is the lack of a small animal model that recapitulates the major outcomes of human infection. In this study, the pathogenesis of CHIKV in C57BL/6J mice was investigated using biological and molecular clones of CHIKV isolated from human serum (CHIKV SL15649). After 14-day-old mice were inoculated with CHIKV SL15649 in the footpad, they displayed reduced weight gain and swelling of the inoculated limb. Histologic analysis of hind limb sections revealed severe necrotizing myositis, mixed inflammatory cell arthritis, chronic active tenosynovitis, and multifocal vasculitis. Interestingly, these disease signs and viral RNA persisted in musculoskeletal tissues for at least 3 weeks after inoculation. This work demonstrates the development of a mouse model of CHIKV infection with clinical manifestations and histopathologic findings that are consistent with the disease signs of CHIKV-infected humans, providing a useful tool for studying viral and host factors that drive CHIKV pathogenesis and for evaluating potential therapeutics against this emerging viral disease.

Morrison, T. E., J. D. Simmons, et al. (2008). "Complement receptor 3 promotes severe Ross River virus-induced disease." *J Virol* **82**(22): 11263-11272.

Munz, C. (2009). "Enhancing immunity through autophagy." *Annu Rev Immunol* **27**: 423-449.

Next to the proteasome, autophagy is the main catabolic pathway for the degradation of cytoplasmic constituents. The immune system uses it both as an effector mechanism to clear intracellular pathogens and as a mechanism to monitor its products for evidence of pathogen invasion and cellular transformation. Because autophagy delivers intracellular material for lysosomal degradation, its products are primarily loaded onto MHC class II molecules and are able to stimulate CD4⁺ T cells. This process might shape the self-tolerance of the CD4⁺ T cell repertoire and stimulate CD4⁺ T cell responses against pathogens and tumors. Beyond antigen processing, autophagy's role in cell survival is to assist the clonal expansion of B and T cells for efficient adaptive immune responses. These immune-enhancing functions make autophagy an attractive target for therapeutic manipulation in human disease.

Nagy, P. D. and J. Pogany (2012). "The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors." *Nat Rev Microbiol* **10**(2): 137-149.

Positive-sense RNA ((+)RNA) viruses such as hepatitis C virus exploit host cells by subverting host proteins, remodelling subcellular membranes, co-opting and modulating protein and ribonucleoprotein complexes, and altering cellular metabolic pathways during infection. To facilitate RNA replication, (+)RNA viruses interact with numerous host molecules through protein-protein, RNA-protein and protein-lipid interactions. These interactions lead to the formation of viral replication complexes, which produce new viral RNA progeny in host cells. This Review presents the recent progress that has been made in understanding

the role of co-opted host proteins and membranes during (+)RNA virus replication, and discusses common themes employed by different viruses.

Nakaya, H. I., J. Gardner, et al. (2012). "Gene profiling of Chikungunya virus arthritis in a mouse model reveals significant overlap with rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **64**(11): 3553-3563.

OBJECTIVE: Chikungunya virus (CHIKV) is a mosquito-borne alphavirus that causes a chronic debilitating polyarthralgia/polyarthritis, for which current treatments are often inadequate. To assess whether new drugs being developed for rheumatoid arthritis (RA) might find utility in the treatment of alphaviral arthritides, we sought to determine whether the inflammatory gene expression signature of CHIKV arthritis shows any similarities with RA or collagen-induced arthritis (CIA), a mouse model of RA. **METHODS:** Using a recently developed animal model of CHIKV arthritis in adult wild-type mice, we generated a consensus CHIKV arthritis gene expression signature, which was used to interrogate publicly available microarray studies of RA and CIA. Pathway analyses were then performed using the overlapping gene signatures. **RESULTS:** Gene set enrichment analysis showed that there was a highly significant overlap in the differentially expressed genes in the CHIKV arthritis model and in RA. This concordance also increased with the severity of RA, as measured by the inflammation score. A highly significant overlap was also seen between CHIKV arthritis and CIA. Pathway analysis revealed that the overlap between these arthritides was spread over a range of different inflammatory processes. Involvement of T cells and interferon-gamma (IFN γ) in CHIKV arthritis was confirmed in studies of MHCII-deficient mice and IFN γ -deficient mice, respectively. **CONCLUSION:** These results suggest that RA, a chronic autoimmune arthritis, and CHIKV disease, usually a self-limiting viral arthropathy, share multiple inflammatory processes. New drugs and biologic therapies being developed for RA may thus find application in the treatment of alphaviral arthritides.

Ng, L. F., A. Chow, et al. (2009). "IL-1 β , IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity." PLoS One **4**(1): e4261.

BACKGROUND: Little is known about the immunopathogenesis of Chikungunya virus. Circulating levels of immune mediators and growth factors were analyzed from patients infected during the first Singaporean Chikungunya fever outbreak in early 2008 to establish biomarkers associated with infection and/or disease severity. **METHODS AND FINDINGS:** Adult patients with laboratory-confirmed Chikungunya fever infection, who were referred to the Communicable Disease Centre/Tan Tock Seng Hospital during the period from January to February 2008, were included in this retrospective study. Plasma fractions were analyzed using a multiplex-microbead immunoassay. Among the patients, the most common clinical features were fever (100%), arthralgia (90%), rash (50%) and conjunctivitis (40%). Profiles of 30 cytokines, chemokines, and growth factors were able to discriminate the clinical forms of Chikungunya from healthy controls, with patients classified as non-severe and severe disease. Levels of 8 plasma cytokines and 4 growth factors were significantly elevated. Statistical analysis showed that an increase in IL-1 β , IL-6 and a decrease in RANTES were associated with disease severity. **CONCLUSIONS:** This is the first

comprehensive report on the production of cytokines, chemokines, and growth factors during acute Chikungunya virus infection. Using these biomarkers, we were able to distinguish between mild disease and more severe forms of Chikungunya fever, thus enabling the identification of patients with poor prognosis and monitoring of the disease.

Ozden, S., M. Huerre, et al. (2007). "Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection." *PLoS One* **2**(6): e527.

BACKGROUND: Chikungunya (CHIK) virus is a mosquito-transmitted alphavirus that causes in humans an acute infection characterised by fever, polyarthralgia, head-ache, and myalgia. Since 2005, the emergence of CHIK virus was associated with an unprecedented magnitude outbreak of CHIK disease in the Indian Ocean. Clinically, this outbreak was characterized by invalidating poly-arthralgia, with myalgia being reported in 97.7% of cases. Since the cellular targets of CHIK virus in humans are unknown, we studied the pathogenic events and targets of CHIK infection in skeletal muscle. **METHODOLOGY/PRINCIPAL FINDINGS:** Immunohistology on muscle biopsies from two CHIK virus-infected patients with myositic syndrome showed that viral antigens were found exclusively inside skeletal muscle progenitor cells (designed as satellite cells), and not in muscle fibers. To evaluate the ability of CHIK virus to replicate in human satellite cells, we assessed virus infection on primary human muscle cells; viral growth was observed in CHIK virus-infected satellite cells with a cytopathic effect, whereas myotubes were essentially refractory to infection. **CONCLUSIONS/SIGNIFICANCE:** This report provides new insights into CHIK virus pathogenesis, since it is the first to identify a cellular target of CHIK virus in humans and to report a selective infection of muscle satellite cells by a viral agent in humans.

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): 416-422.

Chikungunya fever has spread through several Indian Ocean islands and India, including popular travel destinations. To compare usefulness of diagnostic tests and to understand reasons for the magnitude and severity of an outbreak, we used 3 diagnostic methods to test 720 samples from 680 patients returning to Europe from the Indian Ocean region in 2006. Chikungunya infection was confirmed for 24.4% patients in the first half of the year and for 9.9% in the second half. Reverse transcription-PCR was positive for all samples taken up to day 4 after symptom onset. Immunofluorescence detected immunoglobulin (Ig) M on day 1 and IgG on day 2 for some patients, and in all patients from day 5 onward. Soon after onset of symptoms, patients had IgG and IgM and high viral loads (some >10⁹ copies/mL plasma). These data will help healthcare providers select diagnostic tests for returning travelers.

Parnaik, R., M. C. Raff, et al. (2000). "Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes." *Curr Biol* **10**(14): 857-860.

Both professional and non-professional phagocytes [1] participate in clearing the massive numbers of cells that undergo apoptosis during animal development [2], but it is not known how they divide this task. Using time-lapse recordings of cells in culture, we show that professional phagocytes (brain macrophages or

microglia) are highly motile, ingest apoptotic cells immediately, and digest them quickly. Non-professionals such as BHK and lens epithelial cells are sessile, often recognize apoptotic cells as soon as they die by showing characteristic palpatory movements, but delay ingestion until several hours later. By pre-ageing apoptotic cells, we show that this delay is because the apoptotic cells must undergo further changes before non-professionals can ingest them. The difference was also apparent in vivo, using immunofluorescence and electron microscopy of the developing central nervous system. This arrangement favours prompt clearance by professionals if present in adequate numbers; if they are scarce, however, non-professional bystanders will reluctantly clear the apoptotic cells.

Peyrefitte, C. N., D. Rousset, et al. (2007). "Chikungunya virus, Cameroon, 2006." Emerg Infect Dis **13**(5): 768-771.

We report the isolation of chikungunya virus from a patient during an outbreak of a denguelike syndrome in Cameroon in 2006. The virus was phylogenetically grouped in the Democratic Republic of the Congo cluster, indicating a continuous circulation of a genetically similar chikungunya virus population during 6 years in Central Africa.

Pialoux, G., B. A. Gauzere, et al. (2007). "Chikungunya, an epidemic arbovirolosis." Lancet Infect Dis **7**(5): 319-327.

Chikungunya is an arboviral disease transmitted by aedes mosquitoes. The virus was first isolated in 1953 in Tanzania. Chikungunya virus is a member of the genus Alphavirus and the family Togaviridae. The disease typically consists of an acute illness characterised by fever, rash, and incapacitating arthralgia. The word chikungunya, used for both the virus and the disease, means "to walk bent over" in some east African languages, and refers to the effect of the joint pains that characterise this dengue-like infection. Chikungunya is a specifically tropical disease, but it is geographically restricted and outbreaks are relatively uncommon. It is only occasionally observed in travellers and military personnel. More than 266 000 people have been infected during the ongoing outbreak in Reunion, in which *Aedes albopictus* is the presumed vector. In the ongoing Indian outbreak, in which *Aedes aegypti* is the presumed vector, 1 400 000 cases of chikungunya were reported during 2006. The reasons for the re-emergence of chikungunya on the Indian subcontinent, and for its unprecedented incidence rate in the Indian Ocean region, are unclear. Plausible explanations include increased tourism, chikungunya virus introduction into a naive population, and viral mutation.

Poon, I. K., M. D. Hulett, et al. (2010). "Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance." Cell Death Differ **17**(3): 381-397.

Phagocytosis serves as one of the key processes involved in development, maintenance of tissue homeostasis, as well as in eliminating pathogens from an organism. Under normal physiological conditions, dying cells (e.g., apoptotic and necrotic cells) and pathogens (e.g., bacteria and fungi) are rapidly detected and removed by professional phagocytes such as macrophages and dendritic cells (DCs). In most cases, specific receptors and opsonins are used by phagocytes to recognize and bind their target cells, which can trigger the intracellular signalling events required for phagocytosis. Depending on the type of target cell,

phagocytes may also release both immunomodulatory molecules and growth factors to orchestrate a subsequent immune response and wound healing process. In recent years, evidence is growing that opsonins and receptors involved in the removal of pathogens can also aid the disposal of dying cells at all stages of cell death, in particular plasma membrane-damaged cells such as late apoptotic and necrotic cells. This review provides an overview of the molecular mechanisms and the immunological outcomes of late apoptotic/necrotic cell removal and highlights the striking similarities between late apoptotic/necrotic cell and pathogen clearance.

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): 471-479.

Chikungunya (CHIK) virus is a member of the genus Alphavirus in the family TOGAVIRIDAE: Serologically, it is most closely related to o'nyong-nyong (ONN) virus and is a member of the Semliki Forest antigenic complex. CHIK virus is believed to be enzootic throughout much of Africa and historical evidence indicates that it spread to other parts of the world from this origin. Strains from Africa and Asia are reported to differ biologically, indicating that distinct lineages may exist. To examine the relatedness of CHIK and ONN viruses using genetic data, we conducted phylogenetic studies on isolates obtained throughout Africa and Southeast Asia. Analyses revealed that ONN virus is indeed distinct from CHIK viruses, and these viruses probably diverged thousands of years ago. Two distinct CHIK virus lineages were delineated, one containing all isolates from western Africa and the second comprising all southern and East African strains, as well as isolates from Asia. Phylogenetic trees corroborated historical evidence that CHIK virus originated in Africa and subsequently was introduced into Asia. Within the eastern Africa and southern Africa/Asia lineage, Asian strains grouped together in a genotype distinct from the African groups. These different geographical genotypes exhibit differences in their transmission cycles: in Asia, the virus appears to be maintained in an urban cycle with *Aedes aegypti* mosquito vectors, while CHIK virus transmission in Africa involves a sylvatic cycle, primarily with *AE: fuscifer* and *AE: africanus* mosquitoes.

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): 2363-2377.

Randow, F. and C. Munz (2012). "Autophagy in the regulation of pathogen replication and adaptive immunity." Trends Immunol **33**(10): 475-487.

Autophagy is an evolutionarily conserved homeostatic process by which cells deliver cytoplasmic material for degradation into lysosomes. Autophagy may have evolved as a nutrient-providing homeostatic pathway induced upon starvation, but with the acquisition of cargo receptors, autophagy has become an important cellular defence mechanism as well as a generator of antigenic peptides for major histocompatibility complex (MHC) presentation. We propose that autophagy efficiently protects against microbes encountering the cytosolic environment accidentally, for example, upon phagosomal damage, whereas pathogens routinely accessing the host cytosol have evolved to avoid or even benefit from autophagy.

Rathore, A. P., M. L. Ng, et al. (2013). "Differential unfolded protein response during Chikungunya and Sindbis virus infection: CHIKV nsP4 suppresses eIF2alpha phosphorylation." *Virology* **10**: 36.

Chikungunya (CHIKV) and Sindbis (SINV) are arboviruses belonging to the alphavirus genus within the *Togaviridae* family. They cause frequent epidemics of febrile illness and long-term arthralgic sequelae that affect millions of people each year. Both viruses replicate prodigiously in infected patients and in vitro in mammalian cells, suggesting some level of control over the host cellular translational machinery that senses and appropriately directs the cell's fate through the unfolded protein response (UPR). The mammalian UPR involves BIP (or GRP78), the master sensor in the endoplasmic reticulum (ER) together with the three downstream effector branches: inositol-requiring ser/thr protein kinase/endonuclease (IRE-1), PKR-like ER resident kinase (PERK) and activating transcription factor 6 (ATF-6). Through careful analysis of CHIKV and SINV infections in cell culture we found that the former selectively activates ATF-6 and IRE-1 branches of UPR and suppresses the PERK pathway. By separately expressing each of the CHIKV proteins as GFP-fusion proteins, we found that non-structural protein 4 (nsP4), which is a RNA-dependent-RNA polymerase, suppresses the serine-51 phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor, alpha subunit (eIF2alpha), which in turn regulates the PERK pathway. This study provides insight into a mechanism by which CHIKV replication responds to overcome the host UPR machinery.

Rezza, G., L. Nicoletti, et al. (2007). "Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region." *Lancet* **370**(9602): 1840-1846.

BACKGROUND: Chikungunya virus (CHIKV), which is transmitted by *Aedes* spp mosquitoes, has recently caused several outbreaks on islands in the Indian Ocean and on the Indian subcontinent. We report on an outbreak in Italy. **METHODS:** After reports of a large number of cases of febrile illness of unknown origin in two contiguous villages in northeastern Italy, an outbreak investigation was done to identify the primary source of infection and modes of transmission. An active surveillance system was also implemented. The clinical case definition was presentation with fever and joint pain. Blood samples were gathered and analysed by PCR and serological assays to identify the causal agent. Locally captured mosquitoes were also tested by PCR. Phylogenetic analysis of the CHIKV E1 region was done. **FINDINGS:** Analysis of samples from human beings and from mosquitoes showed that the outbreak was caused by CHIKV. We identified 205 cases of infection with CHIKV between July 4 and Sept 27, 2007. The presumed index case was a man from India who developed symptoms while visiting relatives in one of the villages. Phylogenetic analysis showed a high similarity between the strains found in Italy and those identified during an earlier outbreak on islands in the Indian Ocean. The disease was fairly mild in nearly all cases, with only one reported death. **INTERPRETATION:** This outbreak of CHIKV disease in a non-tropical area was to some extent unexpected and emphasises the need for preparedness and response to emerging infectious threats in the era of globalisation.

Ribera, A., I. Degasne, et al. (2012). "[Chronic rheumatic manifestations following chikungunya virus infection: clinical description and therapeutic considerations]." Med Trop (Mars) **72 Spec No**: 83-85.

The chikungunya virus epidemic that occurred on Reunion Island from May 2005 to the end of 2006 affected 30% of the population (more than 250 000 people). As a result of its major clinical impact, this outbreak allowed better documentation of the acute phase of the disease. The disease generally has a slowly self-limiting course over a period of several months with rheumatic manifestations. For practitioners, these symptoms raise numerous questions at several levels, i.e., i) role of the virus in pain, ii) most appropriate treatment, and iii) prevention of development of chronic symptoms. This study in two patient cohorts on Reunion Island was carried out in an attempt to improve understanding and management of chronic rheumatic manifestations following chikungunya virus infection. Findings in 360 patients presenting painful manifestations following chikungunya virus infection showed that the risk of developing inflammatory polyarthritis was higher if the initial acute phase lasted longer than 3 weeks. Based on this observation, it is recommended that these patients undergo rheumatologic evaluation at 3 months to assess the need for possible immunosuppressor treatment (methotrexate).

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.

INTRODUCTION: The aim of this study was to describe a pediatric case series of Chikungunya infection associated with extensive bullous skin lesions, a severe and unknown form of the disease, during the 2005-2006 outbreak in La Reunion Island. MATERIALS AND METHODS: Retrospective descriptive hospital-based study in children presenting blisters \geq 10% of total body surface area with laboratory-confirmed Chikungunya infection. RESULTS: Eight boys and five girls with a mean age of 3.4 months were included. Blistering began after an average of 2 days after onset of fever and affected 21.5% (10% to 35%) of the total body surface area. Reverse transcription-polymerase chain reaction of blister fluid (n = 5) was positive with a mean viral load sometimes higher than in concurrent serum. Histopathologic examination (n = 10) showed intraepidermal blisters. Hospitalization and repeated dressing changes under general anesthesia were required. No death occurred. On follow-up, long term repigmentation was excellent with sometimes cosmetic sequelae. CONCLUSION: Chikungunya should be included in the differential diagnosis of febrile blistering dermatoses in small infants in epidemic areas.

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.

Rosen, A., L. Casciola-Rosen, et al. (1995). "Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis." J Exp Med **181**(4): 1557-1561.

Immune context is an essential determinant of the host response to potential autoantigens. The clustering of the autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus within surface blebs of apoptotic cells generates high concentrations of autoantigen within discrete subcellular packages. We demonstrate here that when apoptosis is induced by Sindbis virus infection, viral

antigens and autoantigens cocluster exclusively in small surface blebs of apoptotic cells. The surface of these blebs is rich in viral glycoproteins, and virions can be seen blebbing from their surface. We propose that these blebs of mixed foreign and self-origin define a novel immune context that may challenge self-tolerance.

Rubinsztein, D. C., P. Codogno, et al. (2012). "Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases." *Nat Rev Drug Discov* **11**(9): 709-730.

Autophagy is an essential, conserved lysosomal degradation pathway that controls the quality of the cytoplasm by eliminating protein aggregates and damaged organelles. It begins when double-membraned autophagosomes engulf portions of the cytoplasm, which is followed by fusion of these vesicles with lysosomes and degradation of the autophagic contents. In addition to its vital homeostatic role, this degradation pathway is involved in various human disorders, including metabolic conditions, neurodegenerative diseases, cancers and infectious diseases. This article provides an overview of the mechanisms and regulation of autophagy, the role of this pathway in disease and strategies for therapeutic modulation.

Ruiz-Moreno, D., I. S. Vargas, et al. (2012). "Modeling dynamic introduction of Chikungunya virus in the United States." *PLoS Negl Trop Dis* **6**(11): e1918.

Chikungunya is a mosquito-borne viral infection of humans that previously was confined to regions in central Africa. However, during this century, the virus has shown surprising potential for geographic expansion as it invaded other countries including more temperate regions. With no vaccine and no specific treatment, the main control strategy for Chikungunya remains preventive control of mosquito populations. In consideration for the risk of Chikungunya introduction to the US, we developed a model for disease introduction based on virus introduction by one individual. Our study combines a climate-based mosquito population dynamics stochastic model with an epidemiological model to identify temporal windows that have epidemic risk. We ran this model with temperature data from different locations to study the geographic sensitivity of epidemic potential. We found that in locations with marked seasonal variation in temperature there also was a season of epidemic risk matching the period of the year in which mosquito populations survive and grow. In these locations controlling mosquito population sizes might be an efficient strategy. But, in other locations where the temperature supports mosquito development all year the epidemic risk is high and (practically) constant. In these locations, mosquito population control alone might not be an efficient disease control strategy and other approaches should be implemented to complement it. Our results strongly suggest that, in the event of an introduction and establishment of Chikungunya in the US, endemic and epidemic regions would emerge initially, primarily defined by environmental factors controlling annual mosquito population cycles. These regions should be identified to plan different intervention measures. In addition, reducing vector: human ratios can lower the probability and magnitude of outbreaks for regions with strong seasonal temperature patterns. This is the first model to consider Chikungunya risk in the US and can be applied to other vector borne diseases.

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.

Alphaviruses such as the Sindbis-group viruses, Scandinavian Ockelbo virus, the African Asian chikungunya virus, the African O'nyong-nyong virus, the South American Mayaro virus, and the Australasian Barmah Forest and Ross River viruses, are commonly associated with outbreaks of acute and persistent arthritis and arthralgia in humans. The mechanisms by which these viruses cause arthritis/arthralgia are poorly understood. This chapter summarizes our current understanding of viral arthritides using our newly developed mouse model of Ross River virus-induced joint and muscle inflammation.

Rulli, N. E., M. S. Rolph, et al. (2011). "Protection from arthritis and myositis in a mouse model of acute chikungunya virus disease by bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic protein-1 synthesis." J Infect Dis **204**(7): 1026-1030.

Chikungunya virus (CHIKV) is associated with outbreaks of infectious rheumatic disease in humans. Using a mouse model of CHIKV arthritis and myositis, we show that tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) were dramatically induced in tissues from infected mice. The same factors were detected in the serum of patients with CHIKV-induced polyarthralgia and polyarthritis, with MCP-1 levels being particularly elevated. Bindarit (MCP inhibitor) treatment ameliorated CHIKV disease in mice. Histological analysis of muscle and joint tissues showed a reduction in inflammatory infiltrate in infected mice treated with bindarit. These results suggest that bindarit may be useful in treating CHIKV-induced arthritides in humans.

Schiller, M., P. Heyder, et al. (2013). "During apoptosis HMGB1 is translocated into apoptotic cell-derived membrane vesicles." Autoimmunity **46**(5): 342-346.

High mobility group box protein B1 (HMGB1), a nuclear protein reportedly involved in the structural organisation of DNA, is released from necrotic cells or upon cellular activation. After its release into the extracellular space, HMGB1 serves as a mediator of inflammation. In contrast to necrotic cells, apoptotic ones usually do not release HMGB1. Formation and release of membrane vesicles is a well-known feature of apoptotic cell death. Only recently, subcellular membrane vesicles, such as those released during apoptotic cell death have been identified as immune regulators and as mediators of cell to cell communication. We and others have previously detected nuclear antigens within apoptosis-released membranous vesicles and HMGB1 together with nuclear antigens has been discussed to be a key player in etiology and pathogenesis of autoimmune diseases. On this background, we analysed whether HMGB1 is included in the membrane vesicles generated by apoptosing cells. Employing immune blots we observed abundant amounts of HMGB1 in the fraction of the small membrane particles isolated from cell culture supernatants and conclude that HMGB1 is translocated into vesicles generated during apoptosis.

Schilte, C., M. R. Buckwalter, et al. (2012). "Cutting edge: independent roles for IRF-3 and IRF-7 in hematopoietic and nonhematopoietic cells during host response to Chikungunya infection." J Immunol **188**(7): 2967-2971.

The host response to Chikungunya virus is dependent on the direct action of type I IFN on infected nonhematopoietic cells. Prior studies have demonstrated that multiple host sensors coordinate an antiviral response; however, the tissue source(s) and signaling pathways for IFN production remain unknown. In this study, we demonstrate that IRF-3 and IRF-7 are functionally redundant, but lack of both factors results in lethal infection in adult mice. Reciprocal bone marrow chimeras indicated that IRF-3 or IRF-7 expression in either hematopoietic or nonhematopoietic cell compartments was capable of inducing an antiviral response. Interestingly, redundancy of IRF-3 and IRF-7 was age dependent, as neonatal animals lacking either factor succumbed to infection. We further demonstrate that IPS-1 is essential in nonhematopoietic cells and preferentially required during early life. These results highlight the interplay between nonimmune and immune cells during Chikungunya virus infection and suggest an important role for nonhematopoietic cells as a critical source of IFN-alpha/beta.

Schilte, C., T. Couderc, et al. (2010). "Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells." *J Exp Med* **207**(2): 429-442.

Chikungunya virus (CHIKV) is the causative agent of an outbreak that began in La Reunion in 2005 and remains a major public health concern in India, Southeast Asia, and southern Europe. CHIKV is transmitted to humans by mosquitoes and the associated disease is characterized by fever, myalgia, arthralgia, and rash. As viral load in infected patients declines before the appearance of neutralizing antibodies, we studied the role of type I interferon (IFN) in CHIKV pathogenesis. Based on human studies and mouse experimentation, we show that CHIKV does not directly stimulate type I IFN production in immune cells. Instead, infected nonhematopoietic cells sense viral RNA in a Cardif-dependent manner and participate in the control of infection through their production of type I IFNs. Although the Cardif signaling pathway contributes to the immune response, we also find evidence for a MyD88-dependent sensor that is critical for preventing viral dissemination. Moreover, we demonstrate that IFN-alpha/beta receptor (IFNAR) expression is required in the periphery but not on immune cells, as IFNAR(-/-)-->WT bone marrow chimeras are capable of clearing the infection, whereas WT-->IFNAR(-/-) chimeras succumb. This study defines an essential role for type I IFN, produced via cooperation between multiple host sensors and acting directly on nonhematopoietic cells, in the control of CHIKV.

Schilte, C., F. Staikovsky, et al. (2013). "Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study." *PLoS Negl Trop Dis* **7**(3): e2137.

BACKGROUND: Arthritogenic alphaviruses, including Chikungunya virus (CHIKV), are responsible for acute fever and arthralgia, but can also lead to chronic symptoms. In 2006, a Chikungunya outbreak occurred in La Reunion Island, during which we constituted a prospective cohort of viremic patients (n = 180) and defined the clinical and biological features of acute infection. Individuals were followed as part of a longitudinal study to investigate in details the long-term outcome of Chikungunya. METHODOLOGY/PRINCIPAL FINDINGS: Patients were submitted to clinical investigations 4, 6, 14 and 36 months after presentation with acute CHIKV infection. At 36 months, 22 patients with arthralgia and 20 patients without arthralgia were randomly selected from the cohort and consented for blood sampling. During the 3 years following acute

infection, 60% of patients had experienced symptoms of arthralgia, with most reporting episodic relapse and recovery periods. Long-term arthralgias were typically polyarthralgia (70%), that were usually symmetrical (90%) and highly incapacitating (77%). They were often associated with local swelling (63%), asthenia (77%) or depression (56%). The age over 35 years and the presence of arthralgia 4 months after the disease onset are risk factors of long-term arthralgia. Patients with long-term arthralgia did not display biological markers typically found in autoimmune or rheumatoid diseases. These data helped define the features of CHIKV-associated chronic arthralgia and permitted an estimation of the economic burden associated with arthralgia. CONCLUSIONS/SIGNIFICANCE: This study demonstrates that chronic arthralgia is a frequent complication of acute Chikungunya disease and suggests that it results from a local rather than systemic inflammation.

Schuffenecker, I., I. Iteman, et al. (2006). "Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak." *PLoS Med* **3**(7): e263.

BACKGROUND: A chikungunya virus outbreak of unprecedented magnitude is currently ongoing in Indian Ocean territories. In Reunion Island, this alphavirus has already infected about one-third of the human population. The main clinical symptom of the disease is a painful and invalidating poly-arthralgia. Besides the arthralgic form, 123 patients with a confirmed chikungunya infection have developed severe clinical signs, i.e., neurological signs or fulminant hepatitis. **METHODS AND FINDINGS:** We report the nearly complete genome sequence of six selected viral isolates (isolated from five sera and one cerebrospinal fluid), along with partial sequences of glycoprotein E1 from a total of 127 patients from Reunion, Seychelles, Mauritius, Madagascar, and Mayotte islands. Our results indicate that the outbreak was initiated by a strain related to East-African isolates, from which viral variants have evolved following a traceable microevolution history. Unique molecular features of the outbreak isolates were identified. Notably, in the region coding for the non-structural proteins, ten amino acid changes were found, four of which were located in alphavirus-conserved positions of nsP2 (which contains helicase, protease, and RNA triphosphatase activities) and of the polymerase nsP4. The sole isolate obtained from the cerebrospinal fluid showed unique changes in nsP1 (T301I), nsP2 (Y642N), and nsP3 (E460 deletion), not obtained from isolates from sera. In the structural proteins region, two noteworthy changes (A226V and D284E) were observed in the membrane fusion glycoprotein E1. Homology 3D modelling allowed mapping of these two changes to regions that are important for membrane fusion and virion assembly. Change E1-A226V was absent in the initial strains but was observed in >90% of subsequent viral sequences from Reunion, denoting evolutionary success possibly due to adaptation to the mosquito vector. **CONCLUSIONS:** The unique molecular features of the analyzed Indian Ocean isolates of chikungunya virus demonstrate their high evolutionary potential and suggest possible clues for understanding the atypical magnitude and virulence of this outbreak.

Schwartz, O. and M. L. Albert (2010). "Biology and pathogenesis of chikungunya virus." *Nat Rev Microbiol* **8**(7): 491-500.

Chikungunya virus (CHIKV) is a re-emerging mosquito-borne alphavirus responsible for a recent, unexpectedly severe epidemic in countries of the Indian Ocean region. Although many alphaviruses have been well studied, little was known about the biology and pathogenesis of CHIKV at the time of the 2005 outbreak. Over the past 5 years there has been a multidisciplinary effort aimed at deciphering the clinical, physiopathological, immunological and virological features of CHIKV infection. This Review highlights some of the most recent advances in our understanding of the biology of CHIKV and its interactions with the host.

Simon, F., E. Javelle, et al. (2011). "Chikungunya virus infection." *Curr Infect Dis Rep* **13**(3): 218-228.

Chikungunya virus (CHIKV) is an alphavirus transmitted by mosquitoes, mostly *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. After half a century of focal outbreaks of acute febrile polyarthralgia in Africa and Asia, the disease unexpectedly spread in the past decade with large outbreaks in Africa and around the Indian Ocean and rare autochthonous transmission in temperate areas. This emergence brought new insights on its pathogenesis, notably the role of the A226V mutation that improved CHIKV fitness in *Ae. albopictus* and the possible CHIKV persistence in deep tissue sanctuaries for months after infection. Massive outbreaks also revealed new aspects of the acute stage: the high number of symptomatic cases, unexpected complications, mother-to-child transmission, and low lethality in debilitated patients. The follow-up of patients in epidemic areas has identified frequent, long-lasting, rheumatic disorders, including rare inflammatory joint destruction, and common chronic mood changes associated with quality-of-life impairment. Thus, the globalization of CHIKV exposes countries with *Aedes* mosquitoes both to brutal outbreaks of acute incapacitating episodes and endemic long-lasting disorders.

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.

Although the acute manifestations of Chikungunya virus (CHIKV) illness are well-documented, few data exist about the long-term rheumatic outcomes of CHIKV-infected patients. We undertook between June and September 2006 a retrospective cohort study aimed at assessing the course of late rheumatic manifestations and investigating potential risk factors associated with the persistence of these rheumatic manifestations over 15 months. 147 participants (>16 yrs) with laboratory-confirmed CHIKV disease diagnosed between March 1 and June 30, 2005, were identified through a surveillance database and interviewed by telephone. At the 15-month-period evaluation after diagnosis, 84 of 147 participants (57%) self-reported rheumatic symptoms. Of these 84 patients, 53 (63%) reported permanent trouble while 31 (37%) had recurrent symptoms. Age \geq 45 years (OR = 3.9, 95% CI 1.7-9.7), severe initial joint pain (OR = 4.8, 95% CI 1.9-12.1), and presence of underlying osteoarthritis comorbidity (OR = 2.9, 95% CI 1.1-7.4) were predictors of nonrecovery. Our findings suggest that long-term CHIKV rheumatic manifestations seem to be a frequent underlying post-epidemic condition. Three independent risk factors that may aid in early recognition of patients with the highest risk of presenting

prolonged CHIKV illness were identified. Such findings may be particularly useful in the development of future prevention and care strategies for this emerging virus infection.

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): 365-369.

OBJECTIVE: To document the histology of Ross River virus (RRV) arthritis and to examine inflamed synovium for viral RNA. METHODS: Biopsy tissue from the inflamed knees of 12 patients with RRV infection was studied using conventional and immunostaining techniques. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction technology was used to probe for the presence of viral RNA in the synovial biopsy samples and in serum. RESULTS: Hyperplasia of the synovial lining layer, vascular proliferation, and mononuclear cell infiltration were the main histologic changes. RRV RNA was found in knee biopsy tissue that was obtained from 2 patients at 5 weeks after the onset of symptoms. CONCLUSION: RRV RNA was identified in inflamed synovium more than a month after symptoms began. Inflammation was apparent in the absence of detectable virus in the majority of patients.

Solignat, M., B. Gay, et al. (2009). "Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus." *Virology* **393**(2): 183-197.

Arboviruses (or arthropod-borne viruses), represent a threat for the new century. The 2005-2006 year unprecedented epidemics of chikungunya virus (CHIKV) in the French Reunion Island in the Indian Ocean, followed by several outbreaks in other parts of the world such as India, have attracted the attention of clinicians, scientists, and state authorities about the risks linked to this re-emerging mosquito-borne virus. CHIKV, which belongs to the Alphaviruses genus, was not previously regarded as a highly pathogenic arbovirus. However, this opinion was challenged by the death of several CHIKV-infected persons in Reunion Island. The epidemic episode began in December 2005 and four months later the seroprevalence survey report indicated that 236,000 persons, more than 30% of Reunion Island population, had been infected with CHIKV, among which 0.4-0.5% of cases were fatal. Since the epidemic peak, the infection case number has continued to increase to almost 40% of the population, with a total of more than 250 fatalities. Although information available on CHIKV is growing quite rapidly, we are still far from understanding the strategies required for the ecologic success of this virus, virus replication, its interactions with its vertebrate hosts and arthropod vectors, and its genetic evolution. In this paper, we summarize the current knowledge of CHIKV genomic organization, cell tropism, and the virus replication cycle, and evaluate the possibility to predict its future evolution. Such understanding may be applied in order to anticipate future epidemics and reduce the incidence by development and application of, for example, vaccination and antiviral therapy.

Soonsawad, P., L. Xing, et al. (2010). "Structural evidence of glycoprotein assembly in cellular membrane compartments prior to Alphavirus budding." *J Virol* **84**(21): 11145-11151.

Membrane glycoproteins of alphavirus play a critical role in the assembly and budding of progeny virions. However, knowledge regarding transport of viral glycoproteins to the plasma membrane is obscure. In this study, we investigated the role of cytopathic vacuole type II (CPV-II) through in situ electron tomography of alphavirus-infected cells. The results revealed that CPV-II contains viral glycoproteins arranged in helical tubular arrays resembling the basic organization of glycoprotein trimers on the envelope of the mature virions. The location of CPV-II adjacent to the site of viral budding suggests a model for the transport of structural components to the site of budding. Thus, the structural characteristics of CPV-II can be used in evaluating the design of a packaging cell line for replicon production.

Sourisseau, M., C. Schilte, et al. (2007). "Characterization of reemerging chikungunya virus." *PLoS Pathog* **3**(6): e89.

An unprecedented epidemic of chikungunya virus (CHIKV) infection recently started in countries of the Indian Ocean area, causing an acute and painful syndrome with strong fever, asthenia, skin rash, polyarthritides, and lethal cases of encephalitis. The basis for chikungunya disease and the tropism of CHIKV remain unknown. Here, we describe the replication characteristics of recent clinical CHIKV strains. Human epithelial and endothelial cells, primary fibroblasts and, to a lesser extent, monocyte-derived macrophages, were susceptible to infection and allowed viral production. In contrast, CHIKV did not replicate in lymphoid and monocytoid cell lines, primary lymphocytes and monocytes, or monocyte-derived dendritic cells. CHIKV replication was cytopathic and associated with an induction of apoptosis in infected cells. Chloroquine, bafilomycin-A1, and short hairpin RNAs against dynamin-2 inhibited viral production, indicating that viral entry occurs through pH-dependent endocytosis. CHIKV was highly sensitive to the antiviral activity of type I and II interferons. These results provide a general insight into the interaction between CHIKV and its mammalian host.

Spuul, P., G. Balistreri, et al. (2010). "Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes." *J Virol* **84**(15): 7543-7557.

Like other positive-strand RNA viruses, alphaviruses replicate their genomes in association with modified intracellular membranes. Alphavirus replication sites consist of numerous bulb-shaped membrane invaginations (spherules), which contain the double-stranded replication intermediates. Time course studies with Semliki Forest virus (SFV)-infected cells were combined with live-cell imaging and electron microscopy to reveal that the replication complex spherules of SFV undergo an unprecedented large-scale movement between cellular compartments. The spherules first accumulated at the plasma membrane and were then internalized using an endocytic process that required a functional actin-myosin network, as shown by blebbistatin treatment. Wortmannin and other inhibitors indicated that the internalization of spherules also required the activity of phosphatidylinositol 3-kinase. The spherules therefore represent an unusual type of endocytic cargo. After endocytosis, spherule-containing vesicles were highly dynamic and had a neutral pH. These primary carriers fused with acidic endosomes and moved long distances on microtubules, in a manner prevented by nocodazole. The result of the large-scale migration was the

formation of a very stable compartment, where the spherules were accumulated on the outer surfaces of unusually large and static acidic vacuoles localized in the pericentriolar region. Our work highlights both fundamental similarities and important differences in the processes that lead to the modified membrane compartments in cells infected by distinct groups of positive-sense RNA viruses.

Staples, J. E., R. F. Breiman, et al. (2009). "Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease." Clin Infect Dis **49**(6): 942-948.

Chikungunya fever is an acute febrile illness associated with severe, often debilitating polyarthralgias. The disease is caused by Chikungunya virus (CHIKV), an arthropod-borne virus that is transmitted to humans primarily via the bite of an infected mosquito. Since a re-emergence of CHIKV in 2004, the virus has spread into novel locations, such as Europe, and has led to millions of cases of disease throughout countries in and around the Indian Ocean. The risk of importation of CHIKV into new areas is ever present because of the high attack rates associated with the recurring epidemics, the high levels of viremia in infected humans, and the worldwide distribution of the vectors responsible for transmitting CHIKV. In this review, we will characterize the epidemiology and global expansion of CHIKV, describe the clinical features and laboratory testing for the disease, and discuss priorities for further studies needed for effective disease control and prevention.

Strauss, J. H. and E. G. Strauss (1994). "The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution." Microbiol Rev **58**(3): 491-562.

The alphaviruses are a genus of 26 enveloped viruses that cause disease in humans and domestic animals. Mosquitoes or other hematophagous arthropods serve as vectors for these viruses. The complete sequences of the +/- 11.7-kb plus-strand RNA genomes of eight alphaviruses have been determined, and partial sequences are known for several others; this has made possible evolutionary comparisons between different alphaviruses as well as comparisons of this group of viruses with other animal and plant viruses. Full-length cDNA clones from which infectious RNA can be recovered have been constructed for four alphaviruses; these clones have facilitated many molecular genetic studies as well as the development of these viruses as expression vectors. From these and studies involving biochemical approaches, many details of the replication cycle of the alphaviruses are known. The interactions of the viruses with host cells and host organisms have been exclusively studied, and the molecular basis of virulence and recovery from viral infection have been addressed in a large number of recent papers. The structure of the viruses has been determined to about 2.5 nm, making them the best-characterized enveloped virus to date. Because of the wealth of data that has appeared, these viruses represent a well-characterized system that tell us much about the evolution of RNA viruses, their replication, and their interactions with their hosts. This review summarizes our current knowledge of this group of viruses.

Suber, T. and A. Rosen (2009). "Apoptotic cell blebs: repositories of autoantigens and contributors to immune context." Arthritis Rheum **60**(8): 2216-2219.

Suhrbier, A., M. C. Jaffar-Bandjee, et al. (2012). "Arthritogenic alphaviruses--an overview." Nat Rev Rheumatol **8**(7): 420-429.

Mosquito-transmitted alphaviruses causing human rheumatic disease are globally distributed and include chikungunya virus, Ross River virus, Barmah Forest virus, Sindbis virus, o'nyong-nyong virus and Mayaro virus. These viruses cause endemic disease and, occasionally, large epidemics; for instance, the 2004-2011 chikungunya epidemic resulted in 1.4-6.5 million cases, with imported cases reported in nearly 40 countries. The disease is usually self-limiting and characterized by acute and chronic symmetrical peripheral polyarthralgia-polyarthritis, with acute disease usually including fever, myalgia and/or rash. Arthropathy can be debilitating, usually lasts weeks to months and can be protracted; although adequate attention to differential diagnoses is recommended. The latest chikungunya virus epidemic was also associated with some severe disease manifestations and mortality, primarily in elderly patients with comorbidities and the young. Chronic alphaviral rheumatic disease probably arises from inflammatory responses stimulated by the virus persisting in joint tissues, despite robust antiviral immune responses. Serodiagnosis by ELISA is the standard; although international standardization is often lacking. Treatment usually involves simple analgesics and/or NSAIDs, which can provide relief, but better drug treatments are clearly needed. However, the small market size and/or the unpredictable and rapid nature of epidemics present major hurdles for development and deployment of new alphavirus-specific interventions.

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): 374-379.

Suhrbier, A. and S. Mahalingam (2009). "The immunobiology of viral arthritides." Pharmacol Ther **124**(3): 301-308.

A large range of human viruses are associated with the development of arthritis or arthralgia. Although there are many parallels with autoimmune arthritides, there is little evidence that viral arthritides lead to autoimmune disease. In humans viral arthritides usually last from weeks to months, can be debilitating, and are usually treated with non-steroidal anti-inflammatory drugs, but with variable success. Viral arthritides likely arise from immunopathological inflammatory responses directed at viruses and/or their products residing and/or replicating within joint tissues. Macrophages recruited by monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and activated by interferon, and proinflammatory mediators like tumour necrosis factor alpha, interferon gamma, interleukin-6 and interleukin-1beta appear to be common elements in this group of diseases. The challenge for new treatments is to target excessive inflammation without compromising anti-viral immunity. Recent evidence from mouse models suggests targeting MCP-1 or complement may emerge as viable new treatment options for viral arthritides.

Takada, A. and Y. Kawaoka (2003). "Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and in vivo implications." Rev Med Virol **13**(6): 387-398.

Besides the common receptor/coreceptor-dependent mechanism of cellular attachment, some viruses rely on antiviral antibodies for their efficient entry into target cells. This mechanism, known as antibody-dependent enhancement (ADE)

of viral infection, depends on the cross-linking of complexes of virus-antibody or virus-activated complement components through interaction with cellular molecules such as Fc receptors or complement receptors, leading to enhanced infection of susceptible cells. Recent studies have suggested that additional mechanisms underlie ADE: involvement of complement component C1q and its receptor (Ebola virus), antibody-mediated modulation of the interaction between viral protein and its coreceptor (human immunodeficiency virus) and suppression of cellular antiviral genes by the replication of viruses entering cells via ADE (Ross River virus). Since ADE is exploited by a variety of viruses and has been associated with disease exacerbation, it may have broad relevance to the pathogenesis of viral infection and antiviral strategies.

Thiboutot, M. M., S. Kannan, et al. (2010). "Chikungunya: a potentially emerging epidemic?" *PLoS Negl Trop Dis* **4**(4): e623.

Chikungunya virus is a mosquito-borne emerging pathogen that has a major health impact in humans and causes fever disease, headache, rash, nausea, vomiting, myalgia, and arthralgia. Indigenous to tropical Africa, recent large outbreaks have been reported in parts of South East Asia and several of its neighboring islands in 2005-07 and in Europe in 2007. Furthermore, positive cases have been confirmed in the United States in travelers returning from known outbreak areas. Currently, there is no vaccine or antiviral treatment. With the threat of an emerging global pandemic, the peculiar problems associated with the more immediate and seasonal epidemics warrant the development of an effective vaccine. In this review, we summarize the evidence supporting these concepts.

Thio, C. L., R. Yusof, et al. (2013). "Differential proteome analysis of chikungunya virus infection on host cells." *PLoS One* **8**(4): e61444.

BACKGROUND: Chikungunya virus (CHIKV) is an emerging mosquito-borne alphavirus that has caused multiple unprecedented and re-emerging outbreaks in both tropical and temperate countries. Despite ongoing research efforts, the underlying factors involved in facilitating CHIKV replication during early infection remains ill-characterized. The present study serves to identify host proteins modulated in response to early CHIKV infection using a proteomics approach. **METHODOLOGY AND PRINCIPAL FINDINGS:** The whole cell proteome profiles of CHIKV-infected and mock control WRL-68 cells were compared and analyzed using two-dimensional gel electrophoresis (2-DGE). Fifty-three spots were found to be differentially modulated and 50 were successfully identified by MALDI-TOF/TOF. Eight were significantly up-regulated and 42 were down-regulated. The mRNA expressions of 15 genes were also found to correlate with the corresponding protein expression. **STRING** network analysis identified several biological processes to be affected, including mRNA processing, translation, energy production and cellular metabolism, ubiquitin-proteasome pathway (UPP) and cell cycle regulation. **CONCLUSION/SIGNIFICANCE:** This study constitutes a first attempt to investigate alteration of the host cellular proteome during early CHIKV infection. Our proteomics data showed that during early infection, CHIKV affected the expression of proteins that are involved in mRNA processing, host metabolic machinery, UPP, and cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) regulation (in favour of virus survival, replication and transmission).

While results from this study complement the proteomics results obtained from previous late host response studies, functional characterization of these proteins is warranted to reinforce our understanding of their roles during early CHIKV infection in humans.

Thon-Hon, V. G., M. Denizot, et al. (2012). "Deciphering the differential response of two human fibroblast cell lines following Chikungunya virus infection." *Virology* **9**: 213.

BACKGROUND: Chikungunya virus (CHIKV) is an arthritogenic member of the Alphavirus genus (family *Togaviridae*) transmitted by *Aedes* mosquitoes. CHIKV is now known to target non hematopoietic cells such as epithelial, endothelial cells, fibroblasts and to less extent monocytes/macrophages. The type I interferon (IFN) response is an early innate immune mechanism that protects cells against viral infection. Cells express different pattern recognition receptors (including TLR7 and RIG-I) to sense viruses and to induce production of type I IFNs which in turn will bind to their receptor. This should result in the phosphorylation and translocation of STAT molecules into the nucleus to promote the transcription of IFN-stimulated antiviral genes (ISGs). We herein tested the capacity of CHIKV clinical isolate to infect two different human fibroblast cell lines HS 633T and HT-1080 and we analyzed the resulting type I IFN innate immune response. **METHODS:** Indirect immunofluorescence and quantitative RT-PCR were used to test for the susceptibility of both fibroblast cell lines to CHIKV. **RESULTS:** Interestingly, the two fibroblast cell lines HS 633T and HT-1080 were differently susceptible to CHIKV infection and the former producing at least 30-fold higher viral load at 48 h post-infection (PI). We found that the expression of antiviral genes (RIG-I, IFN-beta, ISG54 and ISG56) was more robust in the more susceptible cell line HS 633T at 48 h PI. Moreover, CHIKV was shown to similarly interfere with the nuclear translocation of pSTAT1 in both cell lines. **CONCLUSION:** Critically, CHIKV can control the IFN response by preventing the nuclear translocation of pSTAT1 in both fibroblast cell lines. Counter-intuitively, the relative resistance of HT-1080 cells to CHIKV infection could not be attributed to more robust innate IFN- and ISG-dependent antiviral responses. These cell lines may prove to be valuable models to screen for novel mechanisms mobilized differentially by fibroblasts to control CHIKV infection, replication and spreading from cell to cell.

Tirado, S. M. and K. J. Yoon (2003). "Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease." *Viral Immunology* **16**(1): 69-86.

Toivanen, A. (2008). "Alphaviruses: an emerging cause of arthritis?" *Curr Opin Rheumatol* **20**(4): 486-490.

PURPOSE OF REVIEW: In recent years some extensive and alarming outbreaks of disease caused by alphaviruses, including arthralgia or even severe and long-lasting arthritis have taken place. Therefore, awareness of this possibility should be increased. **RECENT FINDINGS:** Studies on the epidemiology of alphaviruses, especially regarding Ross River, Chikungunya and pogo disease have been carried out. They appear to have spread into new geographic areas. The biological cycle of these viruses involves vertebrate hosts and arthropod vectors, of which mosquitoes are the most important and pass the infection to humans. It is apparent that not only changes in the climate but also increasing travel and

trade, and urbanization favour the spread of both alphaviruses and of mosquitoes. Clinical studies have confirmed that arthritis, which is a part of the disease entity, may be quite severe and long lasting. The need of better control of mosquitoes and proper control measures against them is pointed out. SUMMARY: The most important alphaviruses causing joint inflammation, the clinical picture of the diseases and their epidemiological features are described. Arthritis caused by alphaviruses is certainly increasing and it should be kept in mind as a possibility especially in those cases where the disease starts with flulike symptoms, and rash is involved.

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.

Chikungunya virus (CHIKV) is an emerging arbovirus associated with several recent large-scale epidemics. The 2005-2006 epidemic on Reunion island that resulted in approximately 266,000 human cases was associated with a strain of CHIKV with a mutation in the envelope protein gene (E1-A226V). To test the hypothesis that this mutation in the epidemic CHIKV (strain LR2006 OPY1) might influence fitness for different vector species, viral infectivity, dissemination, and transmission of CHIKV were compared in *Aedes albopictus*, the species implicated in the epidemic, and the recognized vector *Ae. aegypti*. Using viral infectious clones of the Reunion strain and a West African strain of CHIKV, into which either the E1-226 A or V mutation was engineered, we demonstrated that the E1-A226V mutation was directly responsible for a significant increase in CHIKV infectivity for *Ae. albopictus*, and led to more efficient viral dissemination into mosquito secondary organs and transmission to suckling mice. This mutation caused a marginal decrease in CHIKV *Ae. aegypti* midgut infectivity, had no effect on viral dissemination, and was associated with a slight increase in transmission by *Ae. aegypti* to suckling mice in competition experiments. The effect of the E1-A226V mutation on cholesterol dependence of CHIKV was also analyzed, revealing an association between cholesterol dependence and increased fitness of CHIKV in *Ae. albopictus*. Our observation that a single amino acid substitution can influence vector specificity provides a plausible explanation of how this mutant virus caused an epidemic in a region lacking the typical vector. This has important implications with respect to how viruses may establish a transmission cycle when introduced into a new area. Due to the widespread distribution of *Ae. albopictus*, this mutation increases the potential for CHIKV to permanently extend its range into Europe and the Americas.

Varjak, M., S. Saul, et al. (2013). "Magnetic fractionation and proteomic dissection of cellular organelles occupied by the late replication complexes of semliki forest virus." *J Virol* **87**(18): 10295-10312.

Alphavirus replicase complexes are initially formed at the plasma membrane and are subsequently internalized by endocytosis. During the late stages of infection, viral replication organelles are represented by large cytopathic vacuoles, where replicase complexes bind to membranes of endolysosomal origin. In addition to viral components, these organelles harbor an unknown number of host proteins. In this study, a fraction of modified lysosomes carrying functionally intact replicase complexes was obtained by feeding Semliki Forest virus (SFV)-infected HeLa cells with dextran-covered magnetic nanoparticles and later magnetically

isolating the nanoparticle-containing lysosomes. Stable isotope labeling with amino acids in cell culture combined with quantitative proteomics was used to reveal 78 distinct cellular proteins that were at least 2.5-fold more abundant in replicase complex-carrying vesicles than in vesicles obtained from noninfected cells. These host components included the RNA-binding proteins PCBP1, hnRNP M, hnRNP C, and hnRNP K, which were shown to colocalize with the viral replicase. Silencing of hnRNP M and hnRNP C expression enhanced the replication of SFV, Chikungunya virus (CHIKV), and Sindbis virus (SINV). PCBP1 silencing decreased SFV-mediated protein synthesis, whereas hnRNP K silencing increased this synthesis. Notably, the effect of hnRNP K silencing on CHIKV- and SINV-mediated protein synthesis was opposite to that observed for SFV. This study provides a new approach for analyzing the proteome of the virus replication organelle of positive-strand RNA viruses and helps to elucidate how host RNA-binding proteins exert important but diverse functions during positive-strand RNA viral infection.

Vasilakis, N., J. Cardoso, et al. (2011). "Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health." Nat Rev Microbiol **9**(7): 532-541.

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.

BACKGROUND: A Chikungunya (CHIK) outbreak hit La Reunion Island in 2005-2006. The implicated vector was *Aedes albopictus*. Here, we present the first study on the susceptibility of *Ae. albopictus* populations to sympatric CHIKV isolates from La Reunion Island and compare it to other virus/vector combinations. **METHODOLOGY AND FINDINGS:** We orally infected 8 *Ae. albopictus* collections from La Reunion and 3 from Mayotte collected in March 2006 with two Chikungunya virus (CHIKV) from La Reunion: (i) strain 05.115 collected in June 2005 with an Alanine at the position 226 of the glycoprotein E1 and (ii) strain 06.21 collected in November 2005 with a substitution A226V. Two other CHIKV isolates and four additional mosquito strains/species were also tested. The viral titer of the infectious blood-meal was 10⁽⁷⁾ plaque forming units (pfu)/mL. Dissemination rates were assessed by immunofluorescent staining on head squashes of surviving females 14 days after infection. Rates were at least two times higher with CHIKV 06.21 compared to CHIKV 05.115. In addition, 10 individuals were analyzed every day by quantitative RT-PCR. Viral RNA was quantified on (i) whole females and (ii) midguts and salivary glands of infected females. When comparing profiles, CHIKV 06.21 produced nearly 2 log more viral RNA copies than CHIKV 05.115. Furthermore, females infected with CHIKV 05.115 could be divided in two categories: weakly susceptible or strongly susceptible, comparable to those infected by CHIKV 06.21. Histological analysis detected the presence of CHIKV in salivary glands two days after infection. In addition, *Ae. albopictus* from La Reunion was as efficient vector as *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* from Vietnam when infected with the CHIKV 06.21. **CONCLUSIONS:** Our findings support the hypothesis that the CHIK outbreak in La Reunion Island was due to a highly competent vector *Ae. albopictus* which allowed an efficient replication and dissemination of CHIKV 06.21.

Voll, R. E., M. Herrmann, et al. (1997). "Immunosuppressive effects of apoptotic cells." Nature **390**(6658): 350-351.

Wahala, W. M. and A. M. Silva (2011). "The human antibody response to dengue virus infection." Viruses **3**(12): 2374-2395.

Wang, E., E. Volkova, et al. (2008). "Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya." Vaccine **26**(39): 5030-5039.

Chikungunya virus (CHIKV) is an emerging alphavirus that has caused major epidemics in India and islands off the east coast of Africa since 2005. Importations into Europe and the Americas, including one that led to epidemic transmission in Italy during 2007, underscore the risk of endemic establishment elsewhere. Because there is no licensed human vaccine, and an attenuated Investigational New Drug product developed by the U.S. Army causes mild arthritis in some vaccinees, we developed chimeric alphavirus vaccine candidates using either Venezuelan equine encephalitis attenuated vaccine strain TC-83, a naturally attenuated strain of eastern equine encephalitis virus (EEEV), or Sindbis virus as a backbone and the structural protein genes of CHIKV. All vaccine candidates replicated efficiently in cell cultures, and were highly attenuated in mice. All of the chimeras also produced robust neutralizing antibody responses, although the TC-83 and EEEV backbones appeared to offer greater immunogenicity. Vaccinated mice were fully protected against disease and viremia after CHIKV challenge.

Wauquier, N., P. Becquart, et al. (2011). "The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation." J Infect Dis **204**(1): 115-123.

BACKGROUND: Rapidly spreading to new regions, including the islands of the Indian Ocean, Central Africa, and Europe, Chikungunya fever is becoming a major problem of public health. Unlike other members of the alphavirus genus, immune responses to Chikungunya virus (CHIKV) have been poorly investigated. **METHODS:** We conducted a large ex vivo multiplex study of 50 cytokine, chemokine, and growth factor plasma profiles in 69 acutely infected patients from the Gabonese outbreak of 2007. We also assessed a phenotypic study of T lymphocyte responses during human acute CHIKV infection. **RESULTS:** CHIKV infection in humans elicited strong innate immunity involving the production of numerous proinflammatory mediators. Interestingly, high levels of Interferon (IFN) alpha were consistently found. Production of interleukin (IL) 4, IL-10, and IFN-gamma suggested the engagement of the adaptive immunity. This was confirmed by flow cytometry of circulating T lymphocytes that showed a CD8+ T lymphocyte response in the early stages of the disease, and a CD4+ T lymphocyte mediated response in the later stages. For the first time to our knowledge, we found evidence of CD95-mediated apoptosis of CD4+ T lymphocytes during the first 2 days after symptoms onset, ex vivo. **CONCLUSIONS:** Together, our findings suggest that strong innate immunity is required to control CHIKV infection.

Werneke, S. W., C. Schilte, et al. (2011). "ISG15 is critical in the control of Chikungunya virus infection independent of Ube1L mediated conjugation." *PLoS Pathog* 7(10): e1002322.

Chikungunya virus (CHIKV) is a re-emerging alphavirus that has caused significant disease in the Indian Ocean region since 2005. During this outbreak, in addition to fever, rash and arthritis, severe cases of CHIKV infection have been observed in infants. Challenging the notion that the innate immune response in infants is immature or defective, we demonstrate that both human infants and neonatal mice generate a robust type I interferon (IFN) response during CHIKV infection that contributes to, but is insufficient for, the complete control of infection. To characterize the mechanism by which type I IFNs control CHIKV infection, we evaluated the role of ISG15 and defined it as a central player in the host response, as neonatal mice lacking ISG15 were profoundly susceptible to CHIKV infection. Surprisingly, Ube1L(-)/(-) mice, which lack the ISG15 E1 enzyme and therefore are unable to form ISG15 conjugates, displayed no increase in lethality following CHIKV infection, thus pointing to a non-classical role for ISG15. No differences in viral loads were observed between wild-type (WT) and ISG15(-)/(-) mice, however, a dramatic increase in proinflammatory cytokines and chemokines was observed in ISG15(-)/(-) mice, suggesting that the innate immune response to CHIKV contributes to their lethality. This study provides new insight into the control of CHIKV infection, and establishes a new model for how ISG15 functions as an immunomodulatory molecule in the blunting of potentially pathologic levels of innate effector molecules during the host response to viral infection.

White, L. K., T. Sali, et al. (2011). "Chikungunya virus induces IPS-1-dependent innate immune activation and protein kinase R-independent translational shutoff." *J Virol* 85(1): 606-620.

Chikungunya virus (CHIKV) is an arthritogenic mosquito-transmitted alphavirus that is undergoing reemergence in areas around the Indian Ocean. Despite the current and potential danger posed by this virus, we know surprisingly little about the induction and evasion of CHIKV-associated antiviral immune responses. With this in mind we investigated innate immune reactions to CHIKV in human fibroblasts, a demonstrable *in vivo* target of virus replication and spread. We show that CHIKV infection leads to activation of the transcription factor interferon regulatory factor 3 (IRF3) and subsequent transcription of IRF3-dependent antiviral genes, including beta interferon (IFN-beta). IRF3 activation occurs by way of a virus-induced innate immune signaling pathway that includes the adaptor molecule interferon promoter stimulator 1 (IPS-1). Despite strong transcriptional upregulation of these genes, however, translation of the corresponding proteins is not observed. We further demonstrate that translation of cellular (but not viral) genes is blocked during infection and that although CHIKV is found to trigger inactivation of the translational molecule eukaryotic initiation factor subunit 2alpha by way of the double-stranded RNA sensor protein kinase R, this response is not required for the block to protein synthesis. Furthermore, overall diminution of cellular RNA synthesis is also observed in the presence of CHIKV and transcription of IRF3-dependent antiviral genes appears specifically blocked late in infection. We hypothesize that the observed absence of IFN-beta and antiviral proteins during infection results from

an evasion mechanism exhibited by CHIKV that is dependent on widespread shutoff of cellular protein synthesis and a targeted block to late synthesis of antiviral mRNA transcripts.

Wickman, G., L. Julian, et al. (2012). "How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies." *Cell Death Differ* **19**(5): 735-742.

Apoptotic cell clearance facilitates the removal of aged, damaged, infected or dangerous cells although minimizing perturbation of surrounding tissues, and is a vital process in the development and homeostasis of multicellular organisms. Importantly, failure to correctly execute programmed cell death and subsequent corpse clearance is broadly associated with chronic inflammatory and/or autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus. Apoptotic cells develop dramatic morphological changes including contraction, membrane blebbing and apoptotic body formation, which were among the first and most readily identifiable features of cellular suicide. However, understanding the purpose of apoptotic cell morphological changes has proven to be elusive, and recent studies have made somewhat surprising, and occasionally opposing, conclusions about the contribution of blebbing to phagocytic clearance and prevention of inflammatory/autoimmune disease. We review the evidence indicating how apoptotic blebs actively promote corpse recognition, uptake, and generation of auto-reactive antibodies.

Wikan, N., P. Sakoonwatanyoo, et al. (2012). "Chikungunya virus infection of cell lines: analysis of the East, Central and South African lineage." *PLoS One* **7**(1): e31102.

Chikungunya virus (CHIKV) is a re-emerging mosquito borne alphavirus that has caused large scale epidemics in the countries around the Indian Ocean, as well as leading to autochthonous transmission in some European countries. The transmission of the disease has been driven by the emergence of an African lineage of CHIKV with enhanced transmission and dissemination in *Aedes* mosquito hosts. Two main genotypes of this lineage have been circulating, characterized by the presence of a substitution of a valine for an alanine at position 226 of the E1 protein. The outbreak, numbering in millions of cases in the infected areas, has been associated with increasing numbers of cases with non-classical presentation including encephalitis and meningitis. This study sought to compare the original Ross strain with two isolates from the recent outbreak of chikungunya fever in respect of infectivity and the induction of apoptosis in eight mammalian cell lines and two insect cell lines, in addition to generating a comprehensive virus production profile for one of the newer isolates. Results showed that in mammalian cells there were few differences in either tropism or pathogenicity as assessed by induction of apoptosis with the exception of HeLa cells where the recent valine isolate showed less infectivity. The *Aedes albopictus* C6/36 cell line was however significantly more permissive for both of the more recent isolates than the Ross strain. The results suggest that the increased infectivity seen in insect cells derives from an evolution of the CHIKV genome not solely associated with the E1:226 substitution.

Wileman, T. (2006). "Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication." *Science* **312**(5775): 875-878.

The replication of many viruses is associated with specific intracellular compartments called virus factories or viroplasm. These are thought to provide a physical scaffold to concentrate viral components and thereby increase the efficiency of replication. The formation of virus replication sites often results in rearrangement of cellular membranes and reorganization of the cytoskeleton. Similar rearrangements are seen in cells in response to protein aggregation, where aggresomes and autophagosomes are produced to facilitate protein degradation. Here I review the evidence that some viruses induce aggresomes and autophagosomes to generate sites of replication.

Wintachai, P., N. Wikan, et al. (2012). "Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein." J Med Virol **84**(11): 1757-1770.

Chikungunya virus (CHIKV) has recently re-emerged causing millions of infections in countries around the Indian Ocean. While CHIKV has a broad host cell range and productively infects a number of different cell types, macrophages have been identified as a potential viral reservoir serving to increase the duration of symptoms. To date no CHIKV interacting protein has been characterized and this study sought to identify CHIKV binding proteins expressed on target cell membranes. Two-dimensional virus overlay identified prohibitin (PHB) as a microglial cell expressed CHIKV binding protein. Co-localization, co-immunoprecipitation as well as antibody and siRNA mediated infection inhibition studies all confirmed a role for PHB in mediating internalization of CHIKV into microglial cells. PHB is the first identified CHIKV receptor protein, and this study is evidence that PHB may play a role in the internalization of multiple viruses.

Woods, J. M., A. Mogollon, et al. (2003). "The role of COX-2 in angiogenesis and rheumatoid arthritis." Exp Mol Pathol **74**(3): 282-290.

Wu, D., J. Wu, et al. (2012). "Chikungunya outbreak in Guangdong Province, China, 2010." Emerg Infect Dis **18**(3): 493-495.

A disease outbreak with dengue-like symptoms was reported in Guangdong Province, China, in October 2010. Testing results confirmed that the pathogen causing the outbreak was chikungunya virus. Phylogenetic analysis indicated that this virus was a member of the Indian Ocean clade of the East/Center/South African subgroup of chikungunya virus.

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): 133-139.

Newborn and 14-day-old mice inoculated subcutaneously with chikungunya virus (CHIKV) developed lethargy, difficulty walking, dragging of hind limbs, and reduced weight gain within 7-10 days after infection (PI). During the initial 6-7 days PI, the animals had viremia; high levels (10⁶-10⁸) PFU of CHIKV were also present in leg muscle. The virus persisted in muscle for several days after viremia disappeared. The major histopathologic changes were in skeletal muscle, which were focal necrosis and inflammation, followed by fibrosis and dystrophic calcification. Some mice also showed dystrophic calcification in the joint cartilage, but there were few deaths, and most of the animals eventually recovered. CHIKV antigen was shown by immunohistochemistry in the muscle

for several weeks after infection. Based on the clinical and pathologic similarities with CHIKV infection in humans, young ICR and CD-1 mice offer a useful and realistic model for further study of the pathogenesis and treatment of CHIKV infection.

ABBREVIATIONS

BFFV : Barmah Forest virus

CFSE : Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester

CHIKV: Chikungunya virus

Cox-2: Cyclooxygenase 2

CR3: Complement receptor 3

DENV: Dengue virus

dsRNA: double-stranded RNA

EAO: Espèces activées de l'oxygène

GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

HMGB1 : High Mobility Group Box Protein1

IFN: Interferon

IRF-3 et IRF-7 :facteurs de transcription interferon regulatory factor 3 et 7

LAMP2: Lysosomal associated membrane protein 2

MAYV : Mayaro virus

MCP-1 :monocyte chemoattractant protein 1

M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor

MIP: Macrophage inflammatory protein

NK: Natural Killer

ONNV : O'nyong-nyong virus

OSM: Oncostatin M

PARP: Poly (ADP Ribose) polymerase

PBMC: peripheral blood mononuclear cell

PDGF: Platelets derived growth factor

PMA: Phorbol myristate acetate

PR : Polyarthrite rhumatoïde

PRR: Pattern recognition receptor

RRV: Ross River Virus

SINV : Sindbis virus

TLR: Toll like receptor

TNF- α tumor necrosis factor alpha

UPR : Unfolded protein Response

ANNEXES-PUBLICATIONS

ANNEXE 1

- Cartault F, Munier P, Benko E, Desguerre I, Hanein S, Boddaert N, Bandiera S, Vellayoudom J, **Krejbich-Trotot P**, Bintner M, Fourmaintraux A, Hoarau JJ, Girard M, Génin E, de Lonlay P, Naville M, Rodriguez D, Feingold J, Renouil M, Munnich A, Westhof E, Föhling M, Lyonnet S, Henrion-Caude A.

Mutation in a primate-conserved retrotransposon reveals a noncoding RNA as a mediator of infantile encephalopathy.

Proceedings of the National Academy of Sciences 03/2012; 109:4980-5.

9.68 Impact Factor

ANNEXE 2

- **Krejbich-Trotot P**, Denizot M, Hoarau JJ, Jaffar-Bandjee MC, Das T, Gasque P.
Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses.
The FASEB Journal 09/2010; 25(1):314-25. ·
5.71 Impact Factor

ANNEXE 3

- **Krejbich-Trotot P**, Gay B, Li-Pat-Yuen G, Hoarau JJ, Jaffar-Bandjee MC, Briant L, Gasque P, Denizot D.
Chikungunya triggers an autophagic process which promotes viral replication.
Virology Journal 09/2011; 8:432.
2.34 Impact Factor

ANNEXE 4

- Jaffar-Bandjee MC, DasT, Hoarau JJ, **Krejbich-Trotot P**, Denizot M, Ribera A, Roques P, Gasque P.
Chikungunya virus takes centre stage in virally induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis.
Microbes and Infection 10/2009; 11(14-15):1206-18.
3.10 Impact Factor