



**AIX-MARSEILLE UNIVERSITE  
FACULTE DE MEDECINE DE LA TIMONE  
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Discipline : Pathologie humaine  
Spécialité : Maladies transmissibles et pathologies tropicales

THESE du GRADE de DOCTEUR ès sciences

Présentée par  
**Ilenia DELOGU**

**VIRUS CHIKUNGUNYA ET TRAITEMENT ANTIVIRAL**

Soutenue le 2 Mai 2011

COMPOSITION DU JURY

Professeur Jean-Louis MEGE	Président du jury
Docteur Elyes ZHIOUA	Rapporteur
Docteur Arezki IZRI	Rapporteur
Professeur Xavier NICOLAS DE LAMBALLERIE	Directeur de thèse

UMR 190 – Emergence des Pathologies Virales

Faculté de Médecine de la Timone

Marseille, France





## REMERCIEMENTS

Que les membres du jury trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements :

Monsieur le Pr. Elyes Zhioua pour avoir accepté de s'acquitter de la tâche de rapporteur

Monsieur le Dr. Izri Arezki pour avoir accepté de s'acquitter de la tâche de rapporteur

Monsieur le Pr. Jean-Louis Mege pour sa disponibilité et pour avoir accepté de faire partie de mon jury

J'exprime mes profonds remerciements à mon directeur de thèse, Monsieur le Pr. Xavier de Lamballerie pour l'aide compétente qu'il m'a apportée, pour sa patience et son encouragement à finir le travail. Son œil critique m'a été très précieux pour structurer ce travail.

Ensuite je tiens à remercier Monsieur le Dr. Rémi Charrel pour m'avoir donné la possibilité de participer à la rédaction du livre : *Epidemiology, transmission cycles, evolution and emergence of chikungunya virus*. Ilenia DELOGU, Xavier de LAMBALLERIE, Rémi N. CHARREL. *Wild life viral diseases in humans*, Editors Antonio Tenorio, Matthias Niedrig, Juan R Arbiza. Bentham Publishers

Monsieur le Pr. Paolo La Colla de me donner l'occasion d'avoir entrepris cette aventure, à la Région Sardaigne pour avoir soutenu ce projet.

Je tiens à remercier respectivement tous ceux qui m'ont aidée, soutenue, et encouragée pour la réalisation de ce travail : Emilie, Boris, Antoine, Maël, Yannik, Nico, Cécile B., D'autres personnes m'ont encouragé à finir ce travail par des gestes d'amitié dont je suis reconnaissant à Karine toujours là pour me soutenir, Merci pour tout à : Charlène, Juju, Sabrina, Prajakta.

Mes copines Titou, Alex sans oublier tous l'équipe : Marie-Thérèse, Roland, Elie, Nathalie, Morgan, Gilles, Greg, Ernest, Shelley, Reine, Laetitia, Djamel, Jean-Jacques, Odile, Laurence T., Ines, Laurence B., Cécile F., Céline, ont beaucoup contribué à mettre en forme mon français très approximatif. Sans eux, j'aurais sans doute été découragé par cette langue que j'aime bien au quotidien, il reste certainement des corrections à faire et je m'engage à les effectuer avant une éventuelle impression.

J'exprime aussi ma gratitude à tous les gens merveilleux que j'ai rencontrés pendant cette aventure, Asharaf, Loubna, Mylène, Sonia, Elena A., Sebastiana, Hervé, Jury, Anna, Giuseppe, Roberto, Valeria e Francesca. Je suis sûr que j'ai oublié quelqu'un donc à vous aussi merci et pardonnez moi.

Infine non perché siano meno importanti ma anzi sempre i primi nel mio cuore un ringraziamento speciale per mio Padre, le mie sorelle e tutta la mia famiglia sempre qui vicina anche se lontana, grazie di cuore anche agli amici lontani ma sempre presenti a regalarmi un sorriso ed a tirarmi su quando ne ho avuto bisogno, grazie perché so che potro' sempre contare su di voi in particolare grazie a : Nicoletta, Paolo, Carla, Luca, Andrea, Manu, Stefano, Tizi e tanti altri che non ho scritto siete tantissimi ! GRAZIE A ME STESSA ! nonostante tutto é finita.

Un Grazie pieno d'Amore all'uomo della vita mia Roberto Armerino grazie per avermi sopportato e supportato sempre con un entusiasmo grandissimo, presente senza far rumore ma forte quando ne ho avuto bisogno.

**“A MIO PADRE “**



# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	
LISTE DES ABREVIATIONS.....	4
<b>CHAPITRE I: INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I Les Alphavirus .....</b>	<b>7</b>
A Taxinomie.....	9
B Distribution géographique.....	10
C Organisation du génome des Alphavirus.....	11
1. Les régions non traduites du génome.....	11
2. Les protéines non structurales.....	12
a) nsP1	
b) nsP2	
c) nsP3	
d) nsP4	
3. Les protéines structurales.....	14
a) La protéine de capsid	
b) Les glycoprotéines d'enveloppe	
c) Protéine 6K	
D Cycle réplcatif des Alphavirus.....	17
1. Mécanismes d'entrée dans la cellule hôte.....	18
a) Récepteurs viraux	
b) Mécanismes d'attachement	
c) Fusion	
d) Décapsidation	
2. La réplication.....	20
a) La transcription de l'ARN (+)	
b) Transcription de l'ARN subgénomique	
<b>II : Le virus CHIKUNGUNYA.....</b>	<b>24</b>
A Les épidémies de CHIKV.....	25
1. L'Afrique.....	25
2. L'Inde et Asie.....	25
3. L'épidémie de 2005-2006.....	25
4. Phylogenic du CHIKV.....	26
B. Les insectes vecteurs du CHIKV.....	27
1 Vecteurs et cycles de transmission du CHIKV.....	29
a) Les réservoirs du CHIKV	
b) L'infection virale chez le moustique	
c) La pathogenèse chez le moustique	
2 Caractéristiques et distribution géographique du vecteur.....	31
C Aspects cliniques de l'infection.....	34
1. Les formes classiques.....	34
a) Forme asymptomatique	
b) Forme aiguë typique	
2. Effets secondaires.....	34

	3. Formes atypiques.....	35
	4. Forme létale.....	35
D	Physiopathologie de l'infection par le CHIKV.....	35
	1. Tropisme.....	36
	2. Sites de la réplication virale.....	36
	3. Réponses immunitaires.....	37
	a) Réponse innée	
	b) Réponse adaptative	
E	Diagnostic.....	38
	1. Tests sérologiques.....	38
	2. RT-PCR.....	38
F.	Les traitements.....	39
	1. Les vaccins.....	39
	2. Les molécules antivirales.....	39
<b>III :Valorisation du travail bibliographique.....</b>		<b>40</b>
	Article de revue: Understanding the alphaviruses: recent research on important emerging pathogens and progress towards their control.....	40
	Article de phylogénie: Epidemiological and evolutionary aspects of the recent Chikungunya virus epidemics.....	54
<b>CHAPITRE II: OBJECTIFS DU TRAVAIL ET STRATEGIES EXPERIMENTALES</b>		
<b>I</b>	<b>Le développement des antiviraux contre le CHIKV.....</b>	<b>60</b>
	A. Résumé.....	62
	1. Chloroquine.....	62
	2. Ribavirine.....	62
	3. Carbodine.....	63
	B. Vaccin anti-CHIKV.....	63
<b>II</b>	<b>Définition des modèles d'études.....</b>	<b>64</b>
	A Arbidol.....	64
	B Virus Chikungunya.....	64
<b>III</b>	<b>Stratégies expérimentales.....</b>	<b>65</b>
	A Tests d'efficacité in vitro.....	66
	1. Matériels et méthodes.....	66
	a) Cellules et virus	
	b) Test de cytotoxicité d'Arbidol HZ2 sur les cellules MRC5 et VERO	
	c) Tests d'infection des cellules MRC5 par le CHIKV	
	d) Test de sensibilité du CHIKV-Opy1 à l'Arbidol	
	e) Test de sensibilité du CHIKV-Opy1 à l'Arbidol activé	
	f) Test de sensibilité du CHIKV-Opy1 aux métabolites de l'Arbidol	
	g) Test cinétique de l'activité de l'Arbidol sur le CHIKV-Opy1	
	B Effet direct de l'Arbidol sur le virus.....	70

1. Obtention d'un CHIKV mutant Arbidol résistant (CHIKV-Opy1-ARB).....	70
2. Séquençage du génome complet du CHIKV mutant résistant à l'Arbidol.....	71
3. Construction de l'IC Tonile.....	71
4. Insertion de la mutation G407R dans l'IC Tonile.....	73
a) Construction de l'IC Tonile-ARB	
b) Construction de l'amplicon de 3833 pb	
c) Assemblage	
d) Ligation, Transformation et Transfection	
e) Détermination de l'IC <sub>50</sub> en utilisant la RT-PCR quantitative	

### CHAPITRE III: RESULTATS

Article 1.....	77
Avant-propos.....	77
« <i>In vitro</i> antiviral activity of arbidol against Chikungunya virus and characteristics of a selected resistant mutant».....	79
Discussion.....	88
Article 2.....	90
Avant-propos.....	90
«Chikungunya disease and chloroquine treatment».....	91
Discussion.....	95
References Bibliographiques.....	96
Annexe.....	124

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>6K</b> : Protéine de 6kDa	<b>L, mL, µL, nL</b> : litre, millilitre, microlitre, nanolitre
<b>ADN</b> : Acide désoxyribonucléique	<b>M, mM, µM, nM</b> : molaire, millimolaire, micromolaire, nanomolaire
<b>ADNc</b> : ADN complémentaire	<b>min</b> : minute
<b>Ae.</b> : Genre <i>Aedes</i>	<b>MRC5</b> : (fibroblastes humains)
<b>ARN</b> : Acide ribonucléique	<b>MS/MS</b> : tandem mass spectrometry
<b>ARN(+)/(-)</b> : ARN de polarité positive/ARN de polarité négative	<b>NLS</b> : <i>nuclear localization sequence</i>
<b>ARNi</b> : ARN intérence	<b>nm</b> : nanometre
<b>ARNm</b> : ARN messenger	<b>nsP</b> : Non structural protein
<b>ATP</b> : adénosine triphosphate	<b>NTP</b> : nucléoside triphosphate
<b>°C</b> : degré Celsius	<b>NTPase</b> : nucleoside triphosphatase
<b>CDC</b> : <i>Center for Disease Control and Prevention</i>	<b>Nter</b> : Amino-terminal
<b>CMH</b> : Complexe majeur d'histocompatibilité	<b>NTR</b> : Non translated region
<b>CSE</b> : Conserved sequence element	<b>nts</b> : Nucléotides
<b>Cter</b> : Carboxy-terminal	<b>ORF</b> : Open-reading frame
<b>Da, kDa</b> : dalton, kilodalton	<b>PLO</b> : phase de lecture ouverte
<b>Db</b> : Double brin	<b>pb</b> : paire de bases
<b>DEET ; NNDB</b> : N, N-diéthyl-m-toluamide, également appelé N, N'-diéthyl-3-méthylbenzamide	<b>PBS</b> : <i>phosphate buffer saline</i>
<b>DMSO</b> : diméthylsulfoxyde	<b>pC</b> : Protéine de capsid
<b>E.coli</b> : <i>Escherichia coli</i>	<b>PM</b> : poids moléculaire
<b>ELISA</b> : <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	<b>polyA</b> : Polyadénylé
<b>g, mg, µg, ng</b> : gramme, milligramme, microgramme, nanogramme	<b>q-PCR</b> : Quantitative chain polymerization reaction
<b>GFP</b> : <i>green fluorescent protein</i>	<b>RE</b> : réticulum endoplasmique
<b>h</b> : heure	<b>RER</b> : réticulum endoplasmique rugueux
<b>HEK-293</b> : Human Embryonic Kidney 293 cells	<b>RIG</b> : <i>retinoic acid inducible gene</i>
<b>HZ1</b> : (6-bromo-4-(diméthylamino)-5-hydroxy-1-méthyl-2-(phenylsulphonylmethyl)-1H-indole-3-carboxylate)	<b>RNC</b> : région non-codante
<b>HZ2</b> : Arbidol	<b>RT-PCR</b> : Real time chain polymerization reaction
<b>HZ3</b> : (6-bromo -4-diméthylamino)-5-hydroxy-1-méthyl-2-(methylphenylsulphoxyde)-1H-indole-3-carboxylate)	<b>s</b> : seconde
<b>IC</b> : clone infectieux	<b>SVF</b> : sérum de veau foetal
<b>IFN</b> : interferon	<b>STAT</b> : <i>Signal transducers and activators of transcription</i>
<b>IF</b> : Immunofluorescence Indirecte	<b>TATase</b> : <i>Terminal Adénylyltransférase</i>
<b>Ig</b> : Immunoglobuline	<b>TCID<sub>50</sub></b> : Dose <sub>50</sub> Tissue Culture Infectieuse
<b>IL</b> : interleukine	<b>TLR</b> : <i>Toll-like receptors</i>
<b>IMAC</b> : immobilized-metal ion affinity chromatography	<b>VERO</b> : Cellules rénales de singe vert africain
<b>IRF</b> : interferon regulatory factor	
<b>KBR3023</b> : icaridine également connu sous le nom picaridine.	Virus:

*Les abréviations des noms des virus sont conformes aux recommandations du Comité international pour la taxonomie des virus*

**AURAV** : Aura virus

**BFV/BF** : Barmah forest virus/Barmah forest complex

**CMV** : Cytomegalovirus

**CHIKV** : Chikungunya virus

**DENV** : virus de la dengue

**EEEV** : virus de l'encéphalite équine de l'est

**FVV** : *French viscerotropic virus*

**HBV** : virus de l'hépatite B

**HCV** : virus de l'hépatite C

**HSV** : virus herpes simplex

**HIV** : virus de l'immunodéficience humaine

**ONNV** : virus O'nyong-nyong

**RRV** : virus du Ross River

**RSV** : virus respiratoire syncytial

**SFV** : virus de la forêt de Semliki

**SINV** : virus Sindbis

**SRASV** : virus du syndrome respiratoire aigu sévère

**VEEV** : virus de l'encéphalite équine du

Venezuela **WEEV** : virus de l'encéphalite équine de l'ouest

#### Les acides aminés

Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Aspartate ou acide aspartique	D	Asp
Cystéine	C	Cys
Glutamate ou acide glutamique	E	Glu
Glutamine	Q	Gln
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

**CHAPITRE I:  
INTRODUCTION  
BIBLIOGRAPHIQUE**

# I Les Alphavirus

Les Alphavirus sont des virus à ARN enveloppés, d'un diamètre de 70 nm, à structure icosaédrique à symétrie de type T=4 (Choi et al. 1991; Cheng et al. 1995; Garoff et al. 2004). Ces virus, dont la répartition est mondiale, sont capables d'infecter une grande variété d'animaux vertébrés (mammifères, oiseaux, poissons). Ces virus sont des arbovirus, c'est-à-dire des virus transmis par des arthropodes hématophages, dans le cas des Alphavirus, la vectorisation est faite par des moustiques appartenant à plusieurs espèces.

A ce jour, 29 espèces d'Alphavirus ont été identifiées, dont au moins 6 sont pathogènes pour l'Homme. Chez l'Homme, certains Alphavirus sont responsables d'encéphalites, d'arthrites, de fièvres, d'éruptions cutanées et peuvent être fatals (Thiruvengadam et al. 1965; Pialoux et al. 2006).

Le premier Alphavirus isolé fut l'Encephalite Equine de l'Ouest (WEE), en 1930 (Meyer et al. 1931). Les virus de l'encéphalite de l'Est (VEE) et le virus de l'Encephalite Equine du Vénézuéla (VEEV) furent isolés respectivement en 1933 et 1938 (Gibbs EP. 1976 ; Beck et al. 1938 ; Kubes et al. 1939). Le Virus Sindbis isolé en Egypte en 1952 (Taylor et al. 1955), fut le premier Alphavirus responsables d'arthrites à être isolé. La mise en évidence de l'existence du CHIKV se fera 1952 en Tanzanie (Robinson 1955) (Lumsden 1955). Suivent alors les découvertes de l'ensemble des autres Alphavirus. Le South Elephant Seal virus (SESV), identifié en 2000 sur l'île australienne de Macquarie a été récemment identifié, le virus de la maladie du pancréas du saumon (SPDV) est à l'heure actuelle le dernier Alphavirus découvert.

Tableaux 1.1;1.2

Famille	Genre	Virus	Acide nucléique Bc:bicaténaire Mc:monocaténaire	Capside Symétrie Nombre de capsomères	Enveloppe	Taille (nm)
Adenoviridae	Mastadenovirus	Adénovirus (42 types)	ADN Bc	Icosaédrique 252	(-)	70 à 90
Hepadnaviridae		(VHB)	ADN Bc (circulaire)	Icosaédrique	(+)	42
Herpesviridae	$\alpha$ Herpesvirinae	(HSV-1) (HSV-2)	ADN Bc	Icosaédrique 162	(+)	150 A 200
	$\beta$ Herpesvirinae	(VZV) (CMV) (HHV-6)				
	$\gamma$ Herpesvirinae	(HHV-7) (EBV) (HHV-8)				
Parvoviridae	Parvovirus	(B19)	ADN Mc	Icosaédrique 32	(-)	25
Papillomaviridae	Papillomavirus	(VPH) (120 Types)	ADN Bc Superenroulé	Icosaédrique	(-)	45 A 55
Polyomaviridae	Polyomavirus	(BK,JC)	ADN Bc Superenroulé	Icosaédrique	(-)	40 à 50
Poxviridae	Orthopoxvirus	Variole Vaccine Cowpox Monkeypox	ADN Bc		(+)	200 A 300X100

Tab. 1.1

Famille	Genre	Virus	Acide nucléique Bc:bicaténaire Mc:monocaténaire	Capside Symétrie Nombre de capsomères	Enveloppe	Taille (nm)
Arenaviridae	Arenavirus	(CML) Fièvre de Lassa Junin Mchupo Tascaribe Sabia	ARN Mc Segmenté	Hélicoïdale	(+)	80 à 150
Bunyaviridae	Bunyavirus  Nairovirus Phlebovirus	Bunyamwera California Tahyna Hataan  Crimée-Congo Fièvre à phlébotomes Rift	ARN Mc Segmenté	Hélicoïdale	(+)	90 à 100
Coronaviridae	Coronavirus	Coronavirus Entériques 229 E SARS	ARN Mc	Hélicoïdale	(+)	80 à 120
Filoviridae	Filovirus	Marburg Ebola	ARN Mc	Hélicoïdale	(+)	800 à 1000X80
Flaviviridae	Flavivirus  Rubivirus	Fièvre jaune (DEN 1,2,3,4) (WN) (SLE) (JE) (VHC) (VHG) Rubéole	ARN Mc	Icosaédrique	(+)	40
Orthomyxoviridae	Influenzavirus	InfluenzaA InfluenzaB InfluenzaC	ARN Mc Segmenté	Hélicoïdale	(+)	80 à20
Paramyxoviridae	Paramyxovirus  Morbillivirus Pneumovirus	Parainfluenza 1,2,3,4 Oreillons Rougeole (VRS) Métagpneumovirus	ARN	Hélicoïdale	(-)	150 à 300
Picornaviridae	Entérovirus	Poliovirus 1,2,3 Coxsckie A(23) Coxsckie B(6) Entérovirus 68 à 71	ARN Mc	Icosaédrique	(-)	20 à 30
Reoviridae	Rotavirus	Rotavirus humains	ARN Bc Segmenté	Icosaédrique double 32	(-)	70 à 80
Retroviridae	Oncornavirus Lentivirus	HTLV-I,HTLV-II HIV-1,HIV-2	ARN Mc+Transcriptase inverse	(core)	(+)	100
Togaviridae	Alphavirus	CHIK WEE,EEE ONN	ARN Mc	Icosaédrique	(+)	40 à80

Tab. 1.2

## A Taxonomie

Les Alphavirus peuvent être divisés en deux groupes: les Alphavirus de l'Ancien Monde, dont le prototype est le virus Sindbis (SINV), responsables d'arthrites et d'éruptions cutanées et les Alphavirus du Nouveau Monde responsables d'encéphalites et répartis en deux complexes de l'encéphalite équine de l'Est (EEEV) et de l'encéphalite équine du Venezuela (VEEV) sont les représentants (*Weaver et al. 1997*). Ces virus transmis par des arthropodes étaient initialement regroupés parmi les Arbovirus du groupe A (*Porterfield 1986*). Cette classification, fondée sur les réactions croisées à la suite des tests d'inhibition d'hémagglutination (*Casals et al. 1954*), laissera place à une classification reposant sur les caractéristiques fondamentales des virus et de leurs génomes.

La famille des Togaviridae contient également le genre des Rubivirus qui ne compte qu'une seule espèce (*Westaway et al. 1985 ; Powers et al. 2001; Weaver et al. 2005; Gould E.A. et al. 2009*) et genre Alphavirus sont actuellement 29 les espèces connus. Sur la base de l'analyse comparative des séquences, les Alphavirus transmis par les arthropodes partagent un minimum d'environ 40% d'identité en acides aminés dans la plus divergentes des protéines de structure et 60% dans les protéines non structurales, laissant la place à une classification reposant sur les caractéristiques fondamentales des virus et de leurs génomes (Fig1).

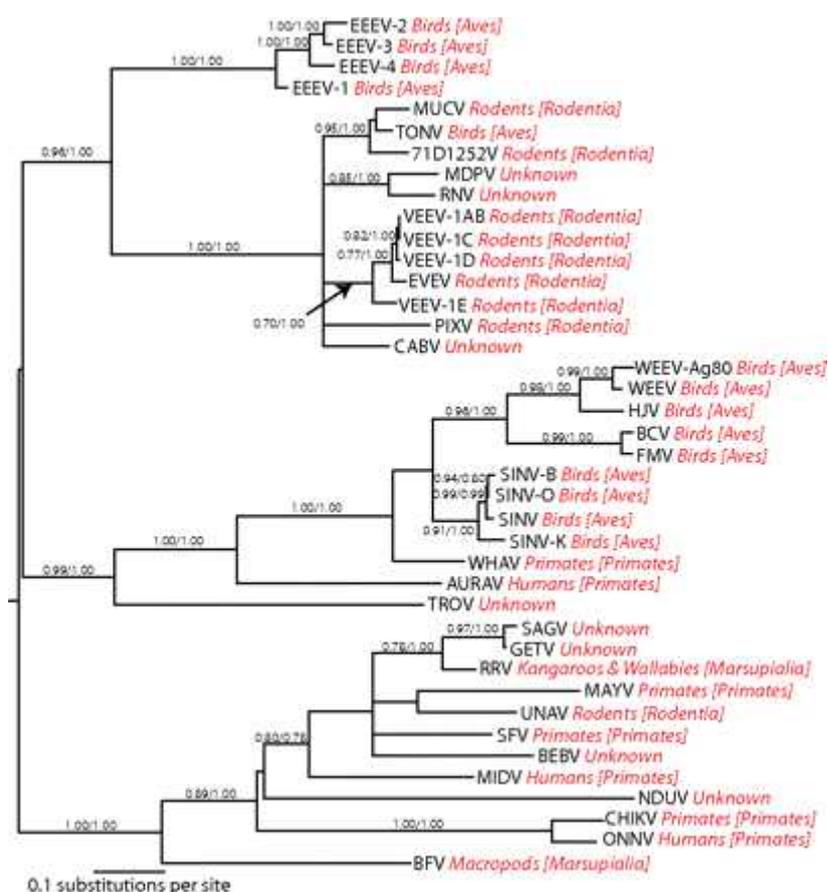


Fig.1 Arbre phylogénétique des Alphavirus taxons viraux indiqués en noir, à côté de leur aire de répartition réservoir hôte probable (en rouge) (*Kitchen A. et al. 2010*)

## B Distribution géographique

Différentes études ont été réalisées pour expliquer la distribution géographique des Alphavirus à travers le monde. Plusieurs hypothèses sont fondées sur l'évolution des Alphavirus et tentent d'expliquer cette large diffusion. En 1988, la comparaison des séquences nucléotidiques a révélé que plusieurs Alphavirus résultaient de la recombinaison entre différents virus. Par exemple le WEEV est un virus recombinant entre les formes ancestrales des EEEV et SINV (*Hahn et al. 1988*). La suite des analyses phylogénétiques a confirmé cette interprétation (*Levinson et al. 1990*) et il a été estimé que la recombinaison avait eu lieu avant la divergence des EEEV pour produire les lignées Sud américaines (*Weaver et al. 1993*). Ces observations ont une grande importance dans notre compréhension des Alphavirus, et leur diversité. Elles soulèvent une question intéressante concernant l'origine géographique des arbovirus dans le genre Alphavirus. Les arbres phylogénétiques basés sur des séquences qui incluent les protéines d'enveloppe (E1, E2) sont congruentes avec celles qui sont fondées uniquement sur la séquence des gènes non-structuraux. Tous les arbres basés sur la région E1 montrent que la séquence SINV, un virus de l'Ancien Monde, diverge avec le WEEV virus complexe, soit la Nouvelle-virus du monde, alors que l'autre Nouveau Monde virus encéphalite équine, i.e. EEEV et VEEV divergent indépendamment de la WEEV/SINV complexes et aussi indépendamment des virus autochtones du Vieux Monde qui comprennent le Semliki Forest virus (SFV), le virus Ross River (RRV) et CHIKV. Selon les études de gènes non structuraux, SINV et AURAV divergent indépendamment du WEEV complexe virus qui sont aujourd'hui considérés comme ayant divergé avec VEEE et VEEV. Une autre observation importante est que les arbres sur la base soit E1 ou des gènes non-structurels montrent que le Nouveau Monde Alphavirus, virus Mayaro (MAYV) et le virus de Una (VNU), toujours avec le cluster Alphavirus Vieux Monde, RRV, SFV, GETV dans le SFV complexe antigénique, confirmant que les introductions transocéaniques des Alphavirus ont eu lieu, comme proposé précédemment (*Powers et al. 2001; Weaver et al. 1997*). Dans le cas de MAYV la supposition d'introductions transocéaniques est également appuyée par la preuve que le Nouveau Monde virus provoque une maladie arthritique chez l'homme, comme cela est caractéristique de l'Ancien Alphavirus mondial, plutôt que la maladie encéphalique, comme celles relatives aux virus du Nouveau Monde, et VEEE VEEV (*Poidinger et al. 1997; Russell, 1998; Weaver et al. 1997*) a proposé que ces Alphavirus les patrons de dispersion pourrait être plus facile à expliquer si l'origine de ces virus était le Nouveau Monde. Toutefois, afin d'appuyer cet argument, il a été nécessaire de proposer plusieurs traversées océaniques (au moins trois) doit avoir eu lieu, dans les deux directions, vers l'ouest et vers l'est (*Powers et al. 2001*). En outre, il a été estimé que la recombinaison, comme on l'observe avec le WEEV et les virus descendants étroitement liés, est susceptible d'avoir eu lieu entre 1300 et 1900 ans (*Weaver et al. 1997*). Ce virus serait alors à la rencontre d'un virus ancestral VEEE lié au même habitat écologique dans le Nouveau Monde et donc susceptible de produire des infections mixtes chez les rongeurs ou autres espèces animales comme les oiseaux. Enfin, il faut prendre en compte la répartition géographique des différents vecteurs hématophages qui transmettent ces virus et qui, en fonction de leur répartition territoriale, jouent aussi un rôle dans la distribution des Alphavirus (*Calisher et al. 1988a; b*). Les principaux vecteurs des Alphavirus étant les moustiques, cela explique qu'ils soient généralement retrouvés de manière abondante dans les régions tropicales.

## C Organisation du génome des Alphavirus

Le génome des Alphavirus se compose d'un simple brin d'ARN à polarité positive. La longueur totale du génome varie entre 11000 et 12000 nucléotides, et il dispose d'une coiffe à l'extrémité 5' de l'ARN et d'une queue poly (A) à l'extrémité 3'. Il existe deux cadres ouverts de lecture (ORF) dans le génome. Le premier encode les 4 protéines non structurales nécessaires à la transcription et à la réplication de l'ARN viral. La seconde encode quatre protéines de structure: la protéine C de la capside, la glycoprotéine d'enveloppe E1, la glycoprotéine d'enveloppe E2 et la glycoprotéine d'enveloppe E3 (*Simmons et al. 1972; Strauss et al. 1984*) (Fig2). L'expression de ces protéines et la réplication du génome viral se déroulent dans le cytoplasme de la cellule hôte (*Strauss et al. 1986*). C'est à partir du promoteur subgénomique que va être transcrit l'ARN subgénomique. Les protéines traduites à partir de cet ARN constituent les unités structurales des nouveaux virions (*Strauss et al. 1986*).

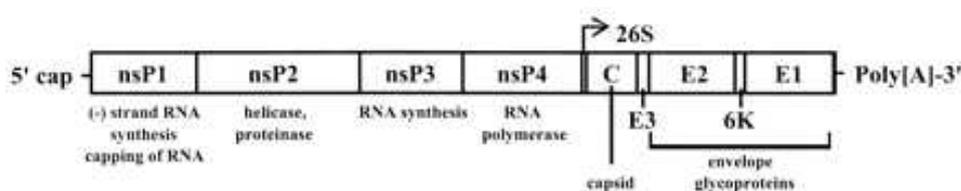


Fig2 schéma génome Alphavirus

### 1 Les régions non traduites du génome (NTR)

Les régions 5'NTR et 3'NTR ont une taille variable dans le genre Alphavirus. Pour le virus Sinbis SINV (*Strauss et al. 1994*), les NTR ils ont une taille de 59 nts et 322 nts respectivement, la 5'NTR et la 3'NTR sont des régions importantes pour la réplication virale (*Ou et al. 1983; Pfeffer et al. 1998*). Par comparaison au SINV, la région 5'NTR du CHIKV est composée de 76 nts et la région 3'NTR de 526 nts (*Khan et al. 2002*). Ces deux régions contiennent des éléments impliqués dans la régulation de la transcription et la réplication du génome.

La région 3' NTR a des éléments répétés (RSEs). Ces RSEs en 3' du génome des Alphavirus constituent des éléments d'ancrage de protéines virales et cellulaires qui diffèrent d'un type cellulaire à l'autre ce qui explique les différents phénotypes observés (*Kuhn et al. 1990; Pardigon et al. 1992; Fayzulin et al. 2004*).

Les éléments de séquences nucléotidiques conservées (CSE) ou « cis-acting » sont été identifiés au niveau de la 5' NTR appelé CSE1 et la CSE2, 3' NTR la CSE3 et de la région jonction la CSE du génome des Alphavirus (Fig.11) (*Ou et al. 1981 ; 1982 ; 1983; Pfeffer et al. 1998*). Quatre de ces régions ont été montrées comme très conservées chez les Alphavirus. Ces régions sont attribuées à des fonctions très importantes dans la réplication virale.

Une séquence de 19 nts CSE3 hautement conservés précède la queue poly(A) en 3' du génome (SINV, SFV et le virus de Middelburg MIDV). Cette séquence constituerait un site de reconnaissance pour l'initiation de la synthèse du brin d'ARN(-), et donc un site d'initiation pour la réplicase virale. Un rôle dans l'encapsidation de l'ARN viral est aussi proposé (*Ou et al. 1981; Kuhn et al. 1990*), (Fig.3).

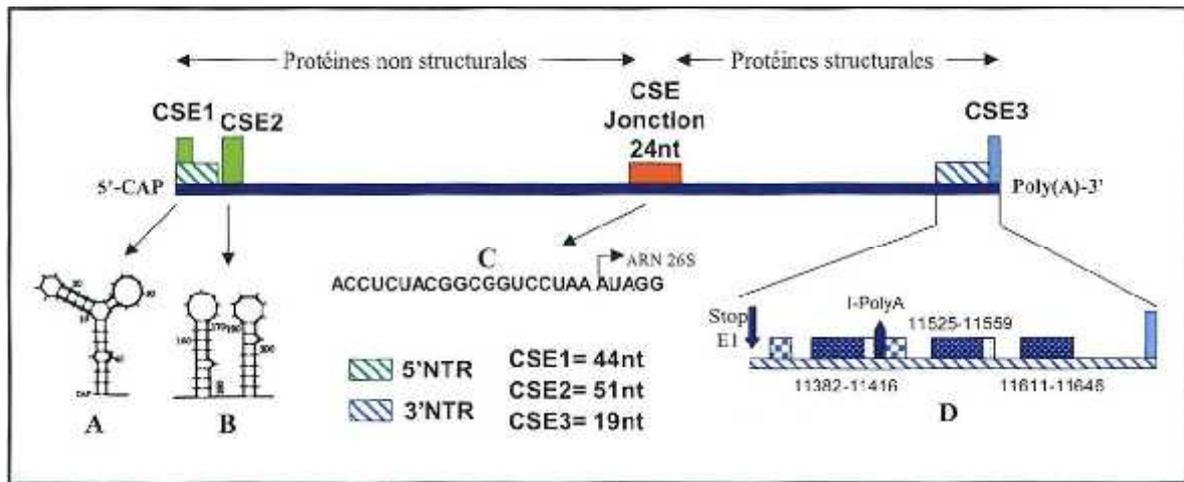


Fig.3 Localisation des séquences CSE et NTR dans le génome des Alphavirus.

A. structure du CSE1, B. structure du CSE2, C séquence nucléotidique de la région « jonction » et D. organisation du 31\ITR du CHIKV ; adapté de George et al. 2000.

La région de jonction la CSE est une séquence de 24 nts, révélée par l'équipe du Dr. Strauss, en 1982, proche de la région de jonction et dans laquelle il a été retrouvé le site d'initiation de l'ARN 26S. Cette séquence qui correspond au promoteur pour la transcription de l'ARN subgénomique, permettrait donc l'initiation de la transcription de l'ARN subgénomique (*Weaver et al. 1988; Levis et al. 1990*).

La CSE2 située en 5' possède une taille de 51 nts. (*Ou et al. 1983*). Elle correspond à une séquence pouvant former deux boucles en épingle à cheveux. Les phénotypes associés aux mutations opérées au niveau de cette séquence indiquent un rôle dans la réplication de l'ARN et notamment au niveau de l'étape de cyclisation (*Niesters et al. 1990b; Frolov et al. 2001*). Par ailleurs, des travaux récents visant à déstabiliser la structure secondaire de l'extrémité 5' du SINV ont permis de préciser la fonction de cette séquence de 51 nts. Son rôle dans la réplication diffère en fonction du type cellulaire (vertébré ou non vertébré). Une grande adaptabilité de réplication découle de ces séquences et des phénotypes qui y sont associés (*George et al. 2000; Fayzulin et al. 2004*).

La dernière région de 44 nts située en 5' du génome du SINV a été identifiée. Au cours de la réplication virale, cette région est capable de former une boucle en épingle à cheveux nécessaire à l'initiation de la synthèse du brin d'ARN(+) à partir du brin d'ARN(-) complémentaire (*Ou et al. 1983*). Les travaux menés par l'équipe du Dr. Strauss sur l'étude de délétions dans la région 5' NTR du SINV confirment l'importance de cette région dans la réplication virale (*Niesters et al. 1990a*).

## 2 Les protéines non structurales

Quatre protéines non structurales (NSP1, 2, 3 et 4), correspondant aux quatre domaines résultant de la maturation de la polyprotéine, sont associées au complexe de réplication du virus. Elles sont synthétisées sous forme d'une polyprotéine courte nsP1234 (ou P123). Différentes activités protéolytiques aboutiront à la formation des divers intermédiaires de clivage, eux-même à l'origine de chacune des nsP (*Kaariainen et al. 1978; Keranen et al. 1983; Strauss et al. 1994*).

### **a). nsP1**

La nsP1 est indispensable à la formation du complexe de réplication des Alphavirus. Elle permet l'ancrage membranaire du complexe de réplication au niveau des vacuoles endosomales et possède une activité méthyltransférase (*Froshauer et al. 1988; Peranen et al. 1995; Kujala et al. 2001; E.A. Gould et al. 2009*). Dans un premier temps, l'attachement aux membranes cellulaires s'effectue par l'intermédiaire d'un segment peptidique amphipathique au centre de la protéine (acides aminés 245 à 264). Cette étape est nécessaire pour l'activation de l'activité enzymatique de la nsP1 (*Spuul et al. 2007*). La deuxième étape consiste en la palmitoylation de la nsP1. Le nombre de sites de palmitoylation va être différent en fonction des Alphavirus. Les palmitoylations vont rendre la nsP1 hydrophobe et donc resserrer l'association aux membranes cellulaires (*Laakkonen et al. 1996*). Une autre fonction est attribuée à la nsP1. C'est sa capacité à moduler l'activité protéinase de la nsP2 lorsqu'elle est présente au sein de la polyprotéine (*de Groot et al. 1990*).

### **b). nsP2**

La région N-terminale du gène de la nsP2 code pour l'hélicase (*Gorbalenya et al. 1988*). Des tests in vitro ont montré que pour le SFV nsP2 a une activité triphosphatase utilisant de l'ATP et le GTP (*Rikkonen et al. 1994*). La nsP2 pourrait donc agir au moins à deux étapes dans la cellule infectée. D'abord, comme la protéine NS3 des flavivirus, la triphosphatase nsP2 nucléotidique peut produire 5 diphosphate ARNm, l'accepteur final attendu de la nsP1 réaction catalysée par la médiation guanylyltransférase nsP1 (*Vasiljeva et al. 2000*). Deuxièmement, l'activité ATPase nsP2 est considérée comme nécessaire pour stimuler l'activité de l'hélicase (*Strauss et al. 1992; Vasiljeva et al. 2001*). L'analyse structurale de la région C-terminale nsP2 dans le VEEV a révélé deux domaines distincts (*Russo et al. 2006*). Le premier a deux résidus catalytiques, une cystine et une histidine, que sont situées dans le sous-domaine N-terminal. Le second domaine est important en particulier pour l'action de la protéase (*Pastorino et al. 2008; Russo et al. 2006*). Les effets cytopathiques observés lors d'infections par certains Alphavirus ont été attribués en partie à la nsP2, ces effets sont à rapprocher de l'inhibition de la transcription/traduction induite par la nsP2 dans les cellules infectées (*Gorchakov et al. 2005; Garmashova et al. 2006; Mayuri et al. 2008*), au moins chez les Alphavirus de l'Ancien Monde (*Garmashova et al. 2007*). De fait, les effets toxiques qui en découlent ainsi que de la réponse antivirale (*Frolova et al. 2002; Breakwell et al. 2007*) expliquent la présence d'une séquence de localisation nucléaire sur cette protéine (*Peranen et al. 1990*) chez des virus dont le cycle est exclusivement cytoplasmique (*Tarnm et al. 2008*). Les symptômes comme la neurovirulence déclenchée chez les patients infectés par le SFV dépendent aussi de cette localisation nucléaire (*Fazakerley et al. 2002*).

### **c). nsP3**

La région N-terminale de nsP3 a été initialement décrite comme un domaine conservé avec une fonction inconnue (X de domaine) dans les grandes protéines de réplication des Alphavirus, des Coronavirus et des Rubivirus (*Gorbalenya et al. 1991*). La nsP3 est une phosphoprotéine constituée de trois domaines distincts. Le domaine Nter de cette protéine présente des séquences conservées retrouvées chez les Coronavirus et les Rubivirus (*Gorbalenya et al. 1991; Koonin et al. 1993; Pehrson et al. 1998*). Le deuxième domaine de la nsP3 est un domaine conservé chez les Alphavirus. La fonction de ces deux premiers domaines reste encore inconnue. Le dernier domaine de la nsP3, situé au niveau Cter de la protéine, présente une séquence hypervariable où ont été identifiés des résidus sérine et thréonine phosphorylables (*Li et al. 1990; Peranen 1991; Vihinen et al. 2000*). La fonction de ces phosphorylations reste encore peu connue mais un rôle potentiel au niveau de l'ARN 26S

du brin d'ARN(-) et du complexe de réplication est proposé du fait de son affinité pour les membranes (Hahn et al. 1989; Lemm et al. 1994; Wang et al. 1994; Vihinen et al. 2001). De plus, un rôle dans la virulence chez le SFV est envisagé (Tuittila et al. 2003; Galbraith et al. 2006).

#### **d). nsP4**

Le nsP4 Alphavirus contient un motif canonique GDD et il est considéré comme l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) (Kamer et Argos, 1984). L'extrémité Nter de la nsP4 dans laquelle se situe le motif GDD présente un rôle au niveau du complexe de réplication et dans la synthèse du brin d'ARN(-) (Fata et al. 2002) en interagissant avec la risP1 (Merits et al. 2001). Très récemment, l'activité RdRp a été démontrée in vitro (Rubach JK. et al. 2009).

Enfin, chez de nombreux Alphavirus, il a été découvert la présence d'un codon opale entre les nsP3 et nsP4 au sein de la polyprotéine P1234 (Shirako et al. 1990). La translecture de ce codon qui est efficace de 5 à 20% aboutit à la formation d'une polyprotéine P1234 cette dernière est synthétisée lorsque le codon stop intervient (de Groot et al. 1990; Shirako et al. 1994). La présence de ce codon régule la quantité de nsP4 traduite lors de l'infection (Myles et al. 2006).

### **3 Les protéines structurales**

Les protéines structurales des Alphavirus sont traduites à partir de l'ARN subgénomique. Après la traduction, des étapes de protéolyse permettent la formation de quatre protéines : pC, 6K, E1, et PE2 qui sera ensuite clivée en E2 et E3 (Melancon et al. 1987; Strauss et al. 1994). Les pC s'associent dans le cytoplasme, et interagissent avec l'ARN viral permettant l'encapsidation (Weiss et al. 1989). Les pC vont alors interagir avec les glycoprotéines d'enveloppe (Skoging et al. 1996) qui, après avoir subi des modifications post traductionnelles (Sefton 1977; Bonatti et al. 1989) au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (Garoff et al. 1978), se retrouvent enchâssées dans la membrane plasmique de la cellule hôte. C'est à ce niveau que les nouveaux virions matures vont pouvoir bourgeonner (Owen et al. 1997).

#### **a). La protéine de capsid**

La première protéine est la pC au sein de la polyprotéine à être clivée. Ce clivage, autoprotéolytique est permis par une activité de type sérine protéase de la pC elle-même (Aliperti et al. 1978). Elle est constituée de deux domaines, Nter, Cter. La taille de la pC varie en fonction des Alphavirus.

Le domaine Nter cette séquence varie au sein des Alphavirus (Rice et al. 1981; Dalgarno et al. 1983) à l'exception de 18 acides aminés (dans l'hélice I) qui facilitent l'oligomérisation des monomères de pC (Perera et al. 2001). En outre, un particulier motif est le M113-X-I115 mis en évidence chez le SFV est impliqué dans l'assemblage des pC. Ce domaine est riche en lysines et en arginines ce qui lui confère une charge positive permettant des interactions électrostatiques avec l'ARN viral. Enfin une séquence spécifique d'encapsidation de l'ARN viral y est retrouvée (Weiss et al. 1989; Weiss et al. 1994). Le domaine Cter de la pC, a l'activité sérine protéase (Hahn et al. 1990; Choi et al. 1991) et possède un motif conservé chez les Alphavirus qui est identifiable, il s'agit du domaine KPCiKRQRLMALKLEAD. Ce domaine permet une interaction avec la grosse sous-unité des ribosomes (Wengler 1984; Wengler et al. 1992), qui jouent alors un rôle au niveau de la décapsidation (Singh et al. 1992). Ce domaine est aussi proposé comme impliqué dans des interactions pC-pC pour former la nucléocapside constituée de 240 monomères de pC (Fuller 1987).

### b). Les glycoprotéines d'enveloppe

Après l'autoprotéolyse de pC, la présence d'un signal spécifique (site d'attachement d'un carbohydrate sur l'asparagine en position 13) va initier la translocation de la polyprotéine PE2-6K-E1 (Bonatti et al. 1984; Garoff et al. 1990). Dans le RE, une signalase catalyse le clivage entre PE2 et 6K libérant ainsi un second signal de translocation qui est suivie du clivage de 6K-E1 (Fig.4) (Melancon et al. 1987; Liljestrom et al. 1991b).

Les hétérotrimères PE2-E1 formés dans le RE (Ziemiieki et al. 1978; Rice et al. 1982) vont migrer dans le Golgi après avoir subi différentes modifications post-traductionnelles telles que des glycosylations (Sefton 1977; Schlesinger 1975) et des palmytoylations (Bonatti et al. 1989). Ce n'est que sous la forme d'hétérodimères PE2-E1, que les glycoprotéines d'enveloppe des Alphavirus vont être exportées jusqu'à la membrane plasmique de la cellule hôte (Strauss et al. 1994).

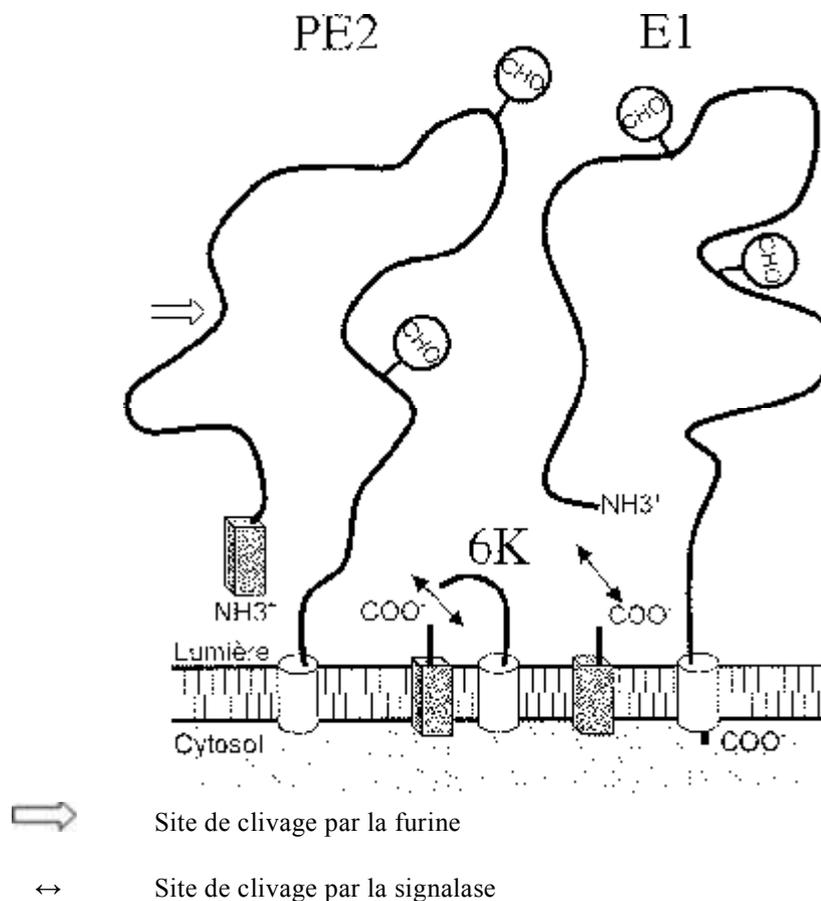


Fig.4 Modèle de production par clivage des protéines PE2 et E1 des Alphavirus. (Strauss et Strauss 1994)

Au niveau de la membrane plasmique, une furine cellulaire va permettre le clivage de PE2 en E2 et E3 (de Curtis et al. 1988). Les hétérodimères E1-E2 enchâssés dans la membrane seront retrouvés sous forme de 80 spicules trimériques (von Bonsdorff et al. 1975; von Bonsdorff et al. 1978) associés ou non avec E3 (Presley et al. 1989; Presley et al. 1991) à la surface des virions.

Le rôle principal des glycoprotéines d'enveloppe est l'attachement au niveau des récepteurs cellulaires de la cellule hôte (*Mukhopadhyay et al. 2006*). Les glycoprotéines d'enveloppe, p62 et E1, suivent la voie sécrétoire au cours de laquelle elles vont se dimériser et être maturées. La protéine p62 est clivée en deux protéines E2 et E3. La protéine E3 n'est retrouvée que dans certaines souches de SFV. Parallèlement, la forte production de protéines de capsid entraîne leur multimérisation et l'association avec les dimères E1E2. Cette interaction se fait par le biais du domaine intracytoplasmique de la protéine E2 et de la poche hydrophobe du domaine protéase de la protéine de capsid. L'assemblage de la particule s'effectue par liaison de la nucléocapsid aux glycoprotéines E2. Ce modèle d'assemblage est confirmé par la persistance d'une production de particules virales lors de l'utilisation d'une protéine de capsid amputée de son domaine de dimérisation (*Forsell K. et al. 1996 ; Nieva et al. 2004*).

Les glycoprotéines d'enveloppe E1-E2, associées à la capsid, sont adressées à la membrane sous forme de complexes de prébourgeonnement. En l'absence de capsid ou lors de l'utilisation d'une protéine de capsid amputée du motif d'interaction avec E2, les glycoprotéines d'enveloppe ne s'accumulent plus à la membrane cellulaire, ce qui indique un rôle d'adressage des glycoprotéines par la protéine de capsid. S'il est classiquement décrit un bourgeonnement des particules virales à la membrane, les résultats de Griffiths mise en évidence une colocalisation de la protéine de capsid et des glycoprotéines d'enveloppe dans un compartiment dérivant des endosomes, les CPVII. Le SFV complète ainsi la liste des virus enveloppés à assemblage intracellulaire (*Basyuk E. et al. 2003*).

Les protéines non structurales jouent un rôle prépondérant au cours de la réplication. La protéine nsP1 est constituée de 537 acides aminés (aa). Elle possède deux activités enzymatiques, une méthyltransférase et une guanylyltransférase, impliquées dans la coiffe des ARN viraux qui peuvent alors être traduits par la machinerie cellulaire. La protéine nsP1 possède deux motifs d'interaction avec les membranes cellulaires. Le premier est un triplet de cystéines (418-420) qui est un motif de palmitoylation. Le second est une séquence de 20 acides aminés hydrophobes (245-264) (*Ahola T. et al. 1999*). L'ancrage membranaire du complexe de réplication est nécessaire à l'activité enzymatique de la protéine nsP1 (*Ahola T. et al. 1999*). La protéine nsP2, 798 aa, est constituée de deux domaines. Le domaine N-terminal possède trois activités : nucléoside phosphatase, ARN hélicase et ARN phosphatase. Le second domaine est caractérisé par son activité protéase à cystéine. L'analyse de cellules infectées montre qu'environ 50 % des protéines nsP2 sont localisées dans le noyau. Cette localisation résulte de la présence d'un signal d'adressage nucléaire (NLS) constitué d'une proline et d'un triplet d'arginines P<sup>647</sup>RRR. La nsP3 est une protéine de 482 aa structurée en trois domaines. Les deux premiers sont conservés chez les alphavirus, le troisième est variable et contient des sites de phosphorylation. La protéine nsP3 augmente la spécificité de la protéase nsP2 pour le clivage nsP3/nsP4. La protéine nsP4, constituée de 614 aa, possède un motif GDD caractéristique des ARN polymérases (*Kamer G et al. 1984*).

### **c). Protéine 6K**

La 6K est une protéine de 6kDa riche en cystéines. Elle est acylée avec des acides gras (*Gaedigk-Nitschko et al. 1990a*). Dans l'interaction avec les protéines d'enveloppe E1 et E2, pendant le clivage protéolytique, il apparaît que la 6K forme des canaux ioniques au niveau de la membrane plasmique (*Melton et al. 2002*), ces canaux sont nécessaires au bourgeonnement et à la maturation virale (*Waite et al. 1970a; b*).

Enfin, le rôle d'une autre petite protéine de 8 kDa identifiée depuis de nombreuses années a récemment été proposé. Cette protéine est issue d'un décalage du cadre de lecture (*Gaedigk-Nitschko et al. 1990a; Ivanova et al. 1995*) qui s'effectue avec une efficacité allant de 5 à 40% en fonction de l'espèce virale (*Firth et al. 2008*). La protéine de 8 kDa incorporée dans les virions serait impliquée dans leur composition structurale et donc dans la morphologie des virions lorsqu'elle est incorporée (*Fig.5*) (*Schlesinger et al. 1993*).

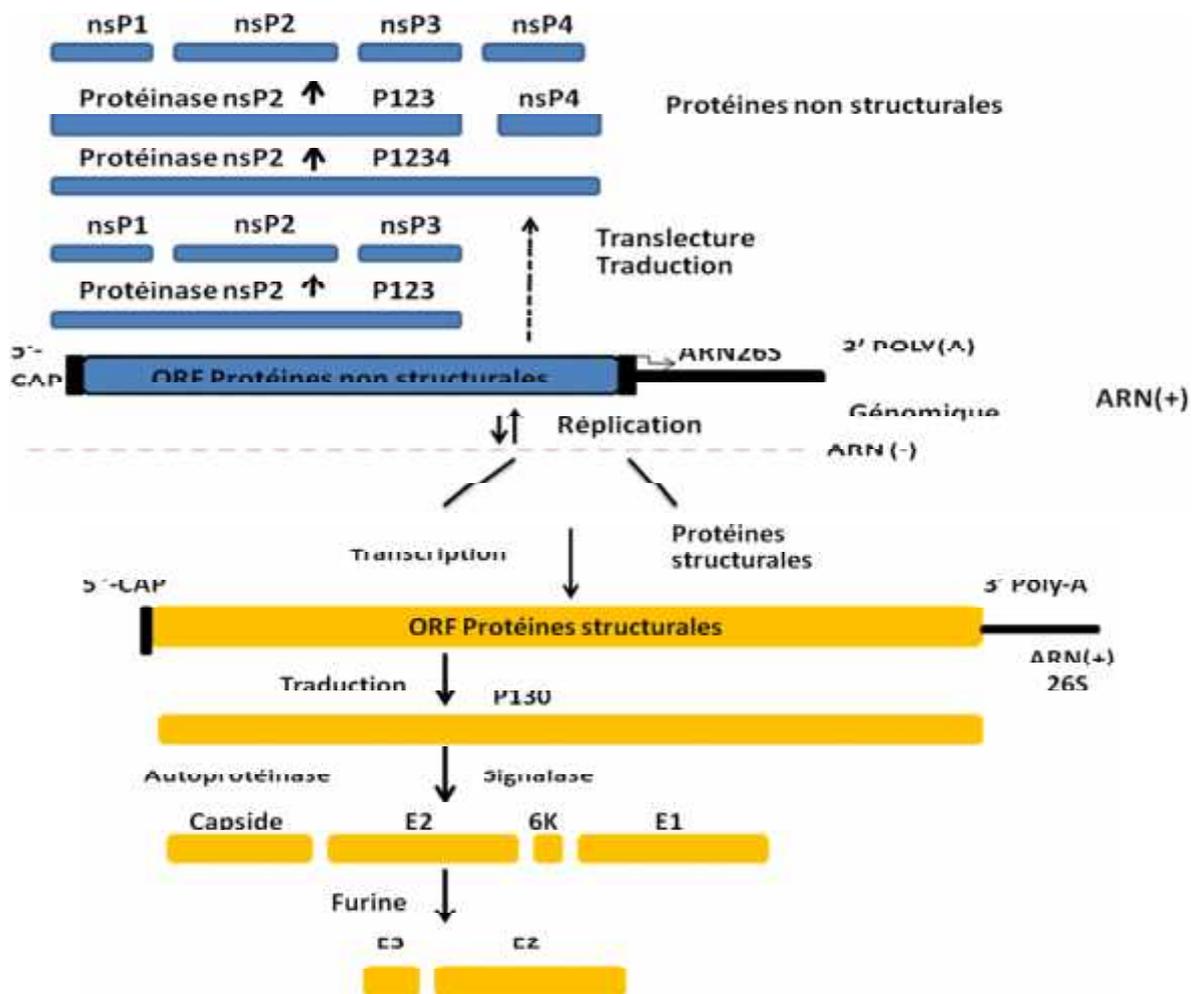


Fig.5 Production des différentes protéines virales des Alphavirus à partir de l'ARN génomique et subgénomique

## D Cycle réplcatif des Alphavirus

Le cycle réplcatif des Alphavirus (Fig.6) est exclusivement intracytoplasmique. Il commence par l'attachement/fusion des particules virales à la membrane de la cellule hôte. A ce jour peu de récepteurs cellulaires pour les Alphavirus (qui possèdent un tropisme large) ont été clairement identifiés. Bien qu'ils aient certains mécanismes d'entrée communs, des différences significatives sont observées en fonction de l'Alphavirus considéré. Suite à l'entrée et à la décapsidation, le génome, directement codant, va être traduit pour former les nsP nécessaires à la réplcation et à la synthèse des sP. L'interaction ARNm viral et pC s'effectue dans le cytoplasme, avant que le complexe ne migre à la membrane où les virions matures vont bourgeonner.

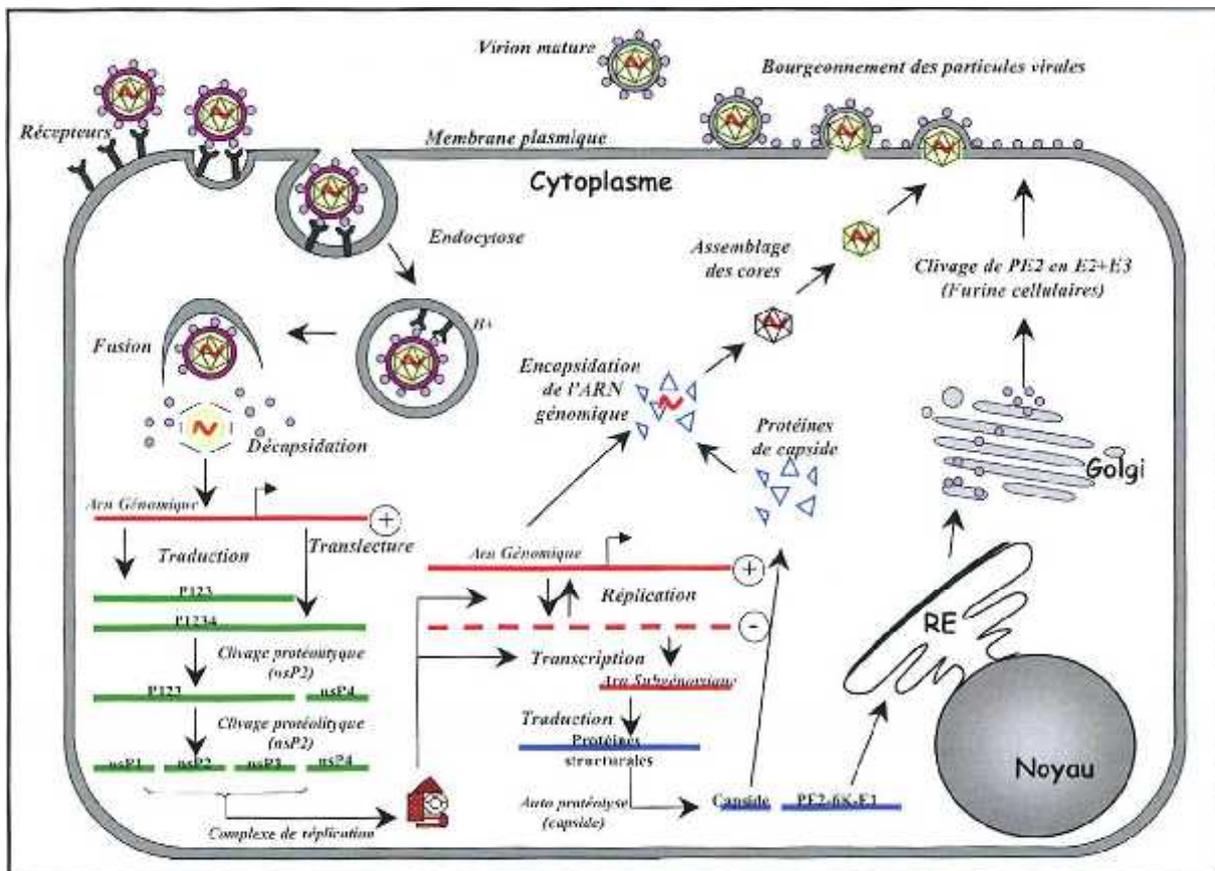


Fig.6 Cycle réplcatif des Alphavirus adapté du Fields 5<sup>ème</sup> édition

### 1 Mécanismes d'entrée dans la cellule hôte

#### a). Récepteurs viraux

Les Alphavirus ont un large tropisme. Plusieurs récepteurs potentiels du SINV sont envisagés. Les récepteurs aux héparanes sulfates sont proposés dans les types cellulaires THP1 et CHO (Jan et al. 1999). Une bonne affinité entre les héparanes sulfates avec les glycoprotéines de

l'enveloppe virale est décrite pour de nombreux virus comme le HIV, le DENV, le Virus Herpès (HSV) ou celui de l'Hépatite C (HCV). De plus, trois mutations adaptatives identifiées sur la glycoprotéine E2 (en position 1, 70 et 114) augmentent de manière indépendante l'affinité aux héparanes sulfates (*Klimstra et al. 1998*). En 1991, deux protéines de cellules de neuroblastome murin ont été proposées comme récepteurs du SINV : une de 110 kDa et l'autre de 74kDa.

Enfin la présence d'une protéine de 63kDa dans les cellules embryonnaires de poulet, (*Wang et al. 1991*) est proposée comme récepteur potentiel. Le récepteur de haute affinité de 67kDa et le récepteur de 32kDa sont clairement identifiés comme récepteurs du SINV dans les cellules de rein de hamster (*Wang et al. 1992; Byrnes et al. 1998*) et du VEEV dans les cellules larvaires C6/36 de moustique (*Ludwig et al. 1996*). Récemment, il s'est avéré que les récepteurs de type lectine (DC-SIGN et L-SIGN) présents notamment sur les cellules dendritiques (DCs) permettraient l'attachement d'Alphavirus (au moins chez le SINV) avec une efficacité plus marquée pour les virus produits dans les cellules de moustiques (*Klimstra et al. 2003*), probablement due aux glycosylations. Ces observations sont à confronter à celles qui sont faites sur le CHIKV qui est montré comme n'infectant pas les DCs (*Sourisseau et al. 2007*). Cependant le CHIKV ni infecte pas le DCS.

### **b). Mécanismes d'attachement**

L'attachement spécifique des Alphavirus à un récepteur donné, n'est pas clairement défini et des différences sont observées en fonction des espèces. Dans le cas du SFV, il est considéré que l'attachement à un récepteur membranaire n'est pas nécessaire pour assurer la fusion à la membrane plasmique, et que dans ce cas, il pénètre dans les cellules uniquement par fusion passive. D'autre part, dans le cas du SVF, il est démontré que l'entrée des particules virales est facilitée par un réarrangement des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2, par réduction des ponts disulfures, mais sans fusion. L'attachement avec la membrane cellulaire, détermine un changement conformationnel dans la structure des glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 s'effectue en laissant disponible de nouveaux épitopes (*Flynn et al. 1990*). L'un d'entre eux est caractérisé. Il s'agit d'une région de la glycoprotéine E2 en position 200-202 de la protéine (*Meyer et al. 1993*). Ce changement conformationnel semble important dans l'efficacité de l'infection. Pendant l'entrée dans la cellule hôte, les particules virales suivent la voie des endosomes. Après ce passage dans les vacuoles intracytoplasmiques que va avoir lieu la fusion qui conduit à la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme. La fusion est dépendante de la glycoprotéine E1, du pH et de la composition des membranes en cholestérol (*Kielian et al. 1984*).

### **c). Fusion**

La glycoprotéine E1 des Alphavirus est une protéine de fusion de classe II. Les alphavirus sont caractérisés par une composition prédominante en feuillet  $\beta$  contenant le peptide de fusion ainsi qu'une seconde protéine permettant la stabilisation du complexe (*Kielian 2006*). L'entrée des Alphavirus commence par un mécanisme de préfusion qui nécessite une exposition des hétérodimères de E1-E2 à un pH faible (*White et al. 1980; Hammar et al. 2003*). Ce pH entraîne : 1 la déstabilisation du complexe, et 2 un changement conformationnel des glycoprotéines d'enveloppe E1 et de E2 aboutissant à l'exposition du peptide de fusion (*Wahlberg et al. 1992b; Ahn et al. 1999a*). Ce peptide possède un domaine conservé situé sur l'extrémité distale de la glycoprotéine E1 en position 83-100 (*Lescar et al. 2001*). Suite à la trimérisation de la glycoprotéine E1, la fusion se poursuit alors (*Klimjack et al. 1994*) de manière dépendante du pH et du cholestérol (*Wahlberg et al. 1992a; Gibbons et al. 2000*).

Différentes études font état de cette dépendance au cholestérol nécessaire à la fusion. Il en ressort que les domaines constitués de sphingolipides (*Moesby et al. 1995; Waarts et al. 2002*) et de stérols du groupe 3P-hydroxyl (*Corver et al. 1995; Stiasny et al. 2003*) sont indispensables à la fusion. Ces structures correspondent aux radeaux lipidiques (*Chazal et al. 2003*).

La formation d'hétérotrimères de la glycoprotéine E1 permet l'insertion du peptide de fusion dans la membrane cible (*Gibbons et al. 2003*). Il s'ensuit la déformation des membranes puis, leur perméabilisation par la formation d'un pore nécessitant des contacts protéine-protéine au sein des trimères (*Gibbons et al. 2004a ; b; Wengler et al. 2004*). Lorsque la fusion est terminée, il y a la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme.

#### **d). Décapsidation**

La nucléocapside des Alphavirus a un diamètre de 45nm. Elle est constituée de 240 pC et protège le génome viral. Après la fusion membranaire, la décapsidation virale (*Helenius et al. 1980*). Mais il est possible qu'une étape d'amorçage de la décapsidation ait lieu avant la libération complète de la nucléocapside dans le cytoplasme.

Différents modèles de décapsidation ont été proposés. Un premier modèle propose que la décapsidation soit réalisée *via* les ribosomes. Plusieurs expériences de saturation des ribosomes avec des pC ou des expériences d'incubation de nucléocapsides avec des lysats cellulaires infectés ou non infectés (*Singh et al. 1992*) ont mis en évidence, *in vitro*, que les pC interagissent avec la sous unité 60S des ribosomes. Les ribosomes entraînent une décapsidation rapide, mais dans des proportions moindres qu'*in vivo* (seulement 20% contre 80% *in vivo*) (*Ulmanen et al. 1976; Ulmanen et al. 1979*). Le composant actif de cette sous-unité 60S est l'ARNr 28S. La région de liaison entre les pC, présumée comme impliquée dans l'association avec la sous-unité 60S des ribosomes, est identifiée. Il s'agit d'une séquence conservée chez les Alphavirus, elle est située entre la lysine en position 94 et la méthionine en position 106 (*Wengler et al. 1992*) chez le SINV et identifiée entre les positions 98 et 112 chez le CHIKV (souche africaine 37997 ; GenBank: AY726732.1).

Le second modèle est basé sur la formation de pores perméables aux ions. Les flux ioniques entraîneraient une modification du pH dans les particules virales aboutissant à l'activation d'un clivage protéolytique dans la séquence de liaison pC-pC. Cette hypothèse suggère que les glycoprotéines d'enveloppe des Alphavirus sont aptes à former des pores perméables aux ions dans les membranes où elles sont enchâssées (*Schlegel et al. 1991*) ou au niveau des endosomes, suite à la fusion, créant un microenvironnement avec un pH faible (*Wengler 2002; Koschinski et al. 2003; Wengler et al. 2003*).

Les études effectuées sur le clivage protéolytique indiquent que 5% des nucléocapsides sont clivés, et que ce clivage est dû à une réactivation de l'activité protéase de la pC de manière dépendante du pH (*Schlegel et al. 1993; Mrkic et al. 1997*).

Le troisième modèle est basé sur la formation de pores perméables aux ions. Dans ce cas, la diminution du pH entraînerait des modifications conformationnelles des pC démasquant alors le site de liaison aux ribosomes (*Lanzrein et al. 1994*). Ces modèles montrent une probable implication des ribosomes dans la décapsidation des Alphavirus *via* la séquence de liaison aux ribosomes et de facteurs cellulaires.

## **2 La réplication**

La réplication commence après la traduction des nsP I, nsP2, nsP3 et nsP4 à partir de l'ARN génomique. L'assemblage a lieu à niveau des membranes endosomales/lysosomales pour former le complexe de réplication, ou réplicase (*Froshauer et al. 1988*).

C'est la disponibilité des nsP et le clivage de la P1234 qui vont réguler la synthèse de trois types d'ARN : l'ARN(+) génomique, l'ARN(-) complémentaire de l'ARN(+) génomique et l'ARN subgénomique (Lemm *et al.* 1993; Lemm *et al.* 1994). Différents intermédiaires de clivages sont présents (Fig.7). La présence de sites préférentiels de clivage permettant d'obtenir ces intermédiaires est directement liée à la régulation de la réplication (de Groot *et al.* 1990).

Des facteurs cellulaires interviennent pendant la réplication, l'extrémité 3' du brin d'ARN (-) est capable de lier des protéines qui interagiraient avec le complexe de réplication et semblent indispensables à la transcription de l'ARN(+) en ARN(-) (Kuhn *et al.* 1990; George *et al.* 2000; Frolov *et al.* 2001 ; Pardigon *et al.* 1992; Pardigon *et al.* 1993).

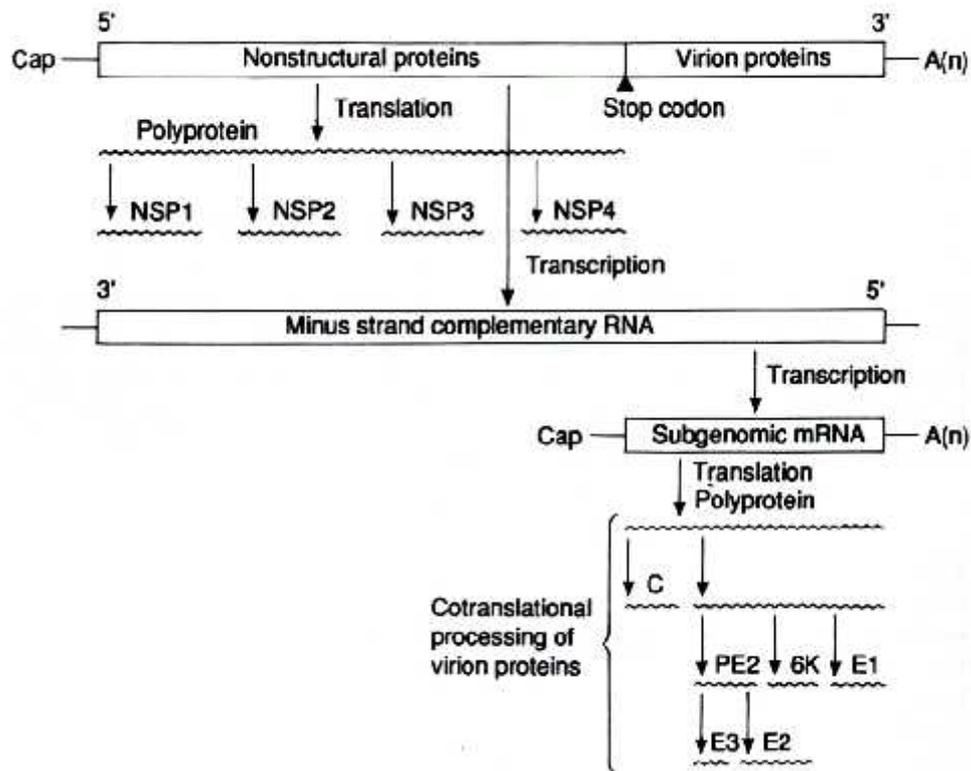


Fig.7 par White and Fenner. *Medical Virology*: Fourth edition, 1994.

### a). La transcription de l'ARN(+)

L'initiation de la synthèse du brin d'ARN, par l'extrémité 3' de l'ARN(+) (George *et al.* 2000), est le début de la réplication. Cependant, la séquence CSE de 51 nts présente en 3' ne semble importante que pour la transcription dans les cellules de moustiques (Fayzulín *et al.* 2004). Les séquences 5'NTR jouent un rôle dans l'initiation de la synthèse du brin d'ARN(-) et du brin d'ARN(+) (Frolov *et al.* 2001).

Le complexe de transcription de l'ARN(+) en ARN(-) qui se fixe sur le 3' CSE est constitué de la polyprotéine P123 associée à la nsP4 (Lemm *et al.* 1993; 1994; Shirako *et al.* 1994). Ces protéines sont majoritairement retrouvées suite à l'infection (Fig.15). L'initiation de la transcription est alors très rapide à la suite de l'infection. La synthèse de l'ARN(-) est régulée et cesse dès 4h post-infection cependant la quantité d'ARN(+) ne cesse d'augmenter (Sawicki *et al.* 1980). La régulation est probablement liée à la présence d'une quantité limitée de partenaires cellulaires impliqués dans le complexe de réplication. Les protéines non structurales qui sont toujours traduites durant la synthèse du brin d'ARN(-) ne semblent donc

pas limitantes (*Sawicki et al. 1986b*). Cependant, la régulation est dépendante du clivage protéolytique de la P123 dont le clivage induit l'arrêt de la synthèse du brin d'ARN(-) (*Hardy et al. 1989; Shirako et al. 1990; Strauss et al. 1992; Shirako et al. 1994*).

A l'inverse, la synthèse d'ARN(+) à partir de l'ARN(-) néo synthétisé est permise par le clivage de la P 123. La synthèse de l'ARN(+) commence au niveau de l'extrémité 3' du brin d'ARN(-) par un complexe de réplication formé des nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4. La protéine nsP4 est indispensable à la synthèse de l'ARN(+) (*Shirako et al. 1994*).

Il semble que deux complexes de transcriptions permettaient la réplication : l'un (P123 + nsP4) pour la synthèse de l'ARN(-), l'autre (nsP1 + nsP2+ nsP3+ nsP4) pour l'ARN(+). Deux hypothèses sont proposées pour tenter d'expliquer la relation entre le clivage de P123 et le passage du complexe de réplication de la synthèse d'ARN(-) à celle du brin d'ARN(+). La première propose que le clivage de P123 entraîne la perte de partenaires cellulaires associés nécessaires à la synthèse du brin d'ARN(-) mais pas ceux nécessaire au brin d'ARN(+). La deuxième décrit le fait que le clivage entraîne un changement conformationnel du complexe de réplication ne permettant plus la synthèse du brin d'ARN(-) (*Sawicki et al. 1986a; Sawicki et al. 1990*).

### **b). Transcription de l'ARN subgénomique**

C'est un promoteur interne compris entre les positions -98 et +14 qui contrôlent la synthèse de l'ARN subgénomique par rapport à la position de départ de la synthèse de cet ARN. Bien que la séquence comprise entre -19 et +5 semble suffisante pour permettre la synthèse de l'ARN subgénomique, la quantité d'ARN synthétisé à partir de cette séquence est inférieure de 6 fois de manière comparative avec la région comprise entre -98 et +14 (*Raju et al. 1991*). Des mutations réalisées au niveau des régions 3'CSE et 5'NTR dans le promoteur subgénomique entraînent des effets différentiels en fonction du type cellulaire (cellules de mammifères ou cellules de moustiques). Ces effets impliquent que des interactions avec des partenaires cellulaires soient possibles au niveau du promoteur de l'ARN subgénomique (*Hertz et al. 1995b; Hertz et al. 1995a; Wielgosz et al. 2001*). Après la réplication virale, l'ARN subgénomique va être traduit en différentes sP du virus. La polyprotéine pC-PE2-(E2+E3)-6K-E1 est maturée par le biais de différents clivages. Les protéines pC sont retrouvées dans le cytoplasme et les glycoprotéines d'enveloppe seront enchâssées dans la membrane plasmique de la cellule. L'ARN génomique se lie de manière spécifique à une ou plusieurs pC grâce à la présence d'un signal d'encapsidation (*Weiss et al. 1989; Weiss et al. 1994*). L'assemblage des particules virales débute par un événement de nucléation avec une pC ou un petit assemblage de pC. A la suite de l'initiation, des pC supplémentaires se lient au complexe probablement par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques non spécifiques dues à la charge fortement positive du Nter des pC (*Wengler 1987*) et d'interactions dues à la charge négative de l'ARN. Ces interactions électrostatiques sont importantes par le fait qu'elles empêcheraient la formation de nucléocapsides vides et donc de particules virales dépourvues de génome. Des interactions latérales spécifiques au niveau du Cter ont lieu et sont à l'origine de la structure de type icosaédrique de la nucléocapside. Ces interactions se font *via* la séquence conservée KPGKRQRLMALKLEAD (*Fuller 1987*). De plus, une séquence de 18 nts située dans le domaine terminal joue aussi un rôle dans ces interactions pC-pC (*Perera et al. 2001*).

Les pC sont toujours retrouvées associées avec de l'ARN, sauf pour le virus Aura (AURAV), l'encapsidation d'ARN subgénomique a été observée, ce qui suggère la présence d'un signal d'encapsidation spécifique présent sur cet ARN (*Rumenapf et al. 1994*). Les particules qui encapsident l'ARN subgénomique sont de taille inférieure et présentent une symétrie d'ordre T=3 (triangulation).

Aussi le motif M-X-I identifié sur la pC intervient dans les interactions pC-pC et semble nécessaire à l'assemblage et au bourgeonnement viral (*Skoging-Nyberg et al. 2001*). Après l'interaction avec l'ARN génomique et l'assemblage/préassemblage des nucléocapsides qui diffusent librement dans le cytoplasme, celles-ci migrent jusqu'à la membrane plasmique de la cellule hôte pour bourgeonner. Pour cela, elles vont devoir interagir avec les glycoprotéines d'enveloppe et plus particulièrement avec le domaine intracytoplasmique de la glycoprotéine E2 et ce, de manière spécifique (*Suomalainen et al. 1992*). Deux modèles sont établis pour définir ces interactions entre les pC et les protéines d'enveloppe. Historiquement, le premier modèle fait état d'un assemblage complet des pC dans le cytoplasme qui migrent alors à la membrane, où le contact avec les glycoprotéines d'enveloppe permet le bourgeonnement (*Garoff et al. 1974*). Ce premier modèle repose sur l'observation de nombreuses structures équivalentes à des nucléocapsides (*Laine et al. 1973*). Plus récemment, le second modèle implique une interaction avec les glycoprotéines d'enveloppe et une nucléocapside qui n'est pas complètement assemblée. Cette interaction permet de finaliser l'assemblage des nucléocapsides avant de bourgeonner. Ce modèle est basé sur l'observation d'une implication directe des glycoprotéines d'enveloppe dans la conformation icosaédrique des nucléocapsides d'Alphavirus (*Forsell et al. 2000*) ainsi que leurs interactions latérales (*von Bonsdorff et al. 1978*). Le point commun entre ces deux modèles est l'interaction entre les pC et les glycoprotéines d'enveloppe et plus précisément avec la glycoprotéine E2.

Le domaine intracytoplasmique de la glycoprotéine E2 des Alphavirus, d'une longueur de 33 acides aminés (chez le RRV), présente 12 résidus conservés dont un domaine Y-X-L, capable d'interagir avec la poche hydrophobe retrouvée en Cter de la pC (*Zhao et al. 1994; Lee et al. 1996*). Trois cystéines sont présentes parmi ces 12 résidus ainsi qu'un tripeptide TPY. Les trois cystéines ont été montrées comme étant palmitoylées (*Ivanova et al. 1993*) chez le SINV et le tripeptide TPY semble être à l'origine des phosphorylations présentes sur la glycoprotéine E2 (*Skoging et al. 1996*). Ces résidus sont impliqués respectivement dans le bourgeonnement et le contact E2-pC.

Comme indiqué précédemment, la protéine 6K est aussi impliquée dans le processus de formation des virions et le bourgeonnement (*Gaedigk-Nitschko et al. 1990b; Liljestrom et al. 1991a*). Si l'on considère que la 6K est apte à former des canaux ioniques (*Melton et al. 2002*) et que les flux ioniques sont importants dans le bourgeonnement du SINV (*Ulug et al. 1989*), pourrait être que la 6K joue un rôle important dans le bourgeonnement des Alphavirus. Enfin, la présence de cholestérol membranaire semble jouer un rôle au niveau du bourgeonnement (*Lu et al. 1999*).

## II Le virus Chikungunya

Les Arbovirus (sont du virus transmis par des arthropodes). Les *Togaviridae* sont une famille de virus à ARN, comprenant les *Alphavirus* et *Rubivirus*. Le virus Chikungunya (CHIKV) qui signifie « qui se recourbe, qui se recroqueville » a été isolé pour la première fois en 1952-1953 lors d'une épidémie de fièvre qui sévissait sur le plateau du Makonde dans la province de Newala au Tanganyika (actuelle Tanzanie) (Pialoux G. 2007).

Des études phylogénétiques portant sur des virus isolés de différents pays ont permis de montrer que les virus se répartissaient dans 3 clusters distincts (Powers et al. 2000). Jusqu'à l'épidémie de 2005, ces clusters étaient corrélés avec la répartition géographique des souches (Fig.7).

Le CHIKV est stable à pH 7-8, et il est inactivée à pH 5, le CHIKV est sensible aux ultraviolets, il est inactivée par des températures supérieures à 58°C, des détergents et solvants organiques, sa durée de demi-vie est de 7 jours à 37°C en milieu liquide (Nakoune et al. 2007).

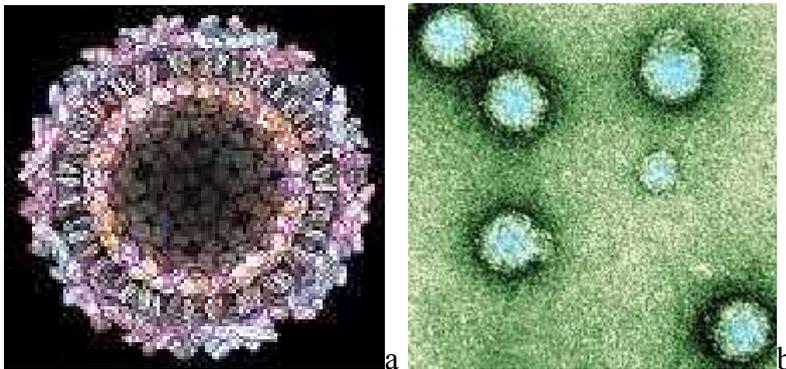


Fig.7 a) Représentation des différentes couches d'un virion de CHIKV (Lancet Infect Dis. 2007 7: 319-327)

b) Photo de microscopie électronique de particules virales de CHIKV (Institut Pasteur et INSERM)

## A Les épidémies de CHIKV

### 1 L'Afrique

Le Chikungunya a été caractérisé pour la première fois en 1952-1953 lors d'une épidémie de fièvre qui sévissait sur le plateau du Makonde dans la province de Newala au Tanganyika (actuelle Tanzanie). Depuis la description initiale en Tanzanie, le virus Chikungunya a été régulièrement à l'origine de petites poussées épidémiques cycliques en milieu rural, principalement en Afrique australe et de l'Est, l'Afrique du Sud et en Afrique Centrale. Dans les années 1964-1970, le virus s'est répandu au Niger (*Moore et al. 1974 ; al. 1975*) puis dans tout l'Ouest de l'Afrique, et plus particulièrement au Sénégal avec plusieurs vagues épidémiques en 1966 (*Roche et al. 1967*), 1982 (*Saluzzo et al. 1983*), 1996 et 1997 (*Diallo et al. 1999; Thonnon et al.1999*) ainsi qu'en République Démocratique Congo en 2000. En Afrique le virus est maintenu au sein d'un cycle forestier faisant intervenir des primates et des moustiques sylvatiques (*Ae. luteocephalus*, *Ae. furcifer* ou *Ae. taylori*). Plus récemment des épidémies ont eu lieu Afrique de l'Est (au Kenya en 2004), en Afrique centrale : Congo en 2004 (*Muyembe-Tamfum et al. 2003*), Cameroun en 2006 (*Peyrefitte et al. 2007*) et au Gabon en 2006-2007 (*Peyrefitte et al. 2008; Pages et al. 2009*) où 5000 cas sont suspectés.

### 3 L'Inde et Asie

Dans les années 1960 et 1970, l'alphavirus du chikungunya a été responsable de nombreuses épidémies en Inde de grande ampleur en milieu urbain. Les principales ont eu lieu en 1963-1965 à Calcutta, en 1964 à Pondichéry et dans le Tamil Nadu (400 000 cas), en 1965 dans l'Andhra Pradesh, le Madhya Pradesh et le Maharashtra, et en 1973 dans le Maharashtra (taux d'attaque de 37,5 %) (*Myers et al. 1965; Thiruvengadam et al. 1965; Carey et al. 1969*). L'agent responsable de ces épisodes était une souche asiatique du virus du chikungunya. Quelques rares cas de complications neurologiques avaient été observés. La surveillance du chikungunya n'a pas été maintenue en Inde, mais il ne semble pas y avoir eu d'autres épidémies importantes au cours des 30 ans qui ont suivi. Lors d'une étude sérologique menée en 1995 à Calcutta, seules 4,37 % des 389 personnes testées présentaient des anticorps dirigés contre le virus du chikungunya, et principalement dans la classe des 51-55 ans (12,5 %). Depuis 2000, des cas sporadiques sont notifiés dans le Maharashtra (*Padbidri et al. 1979*). Dernière épidémie a débuté en décembre 2005 dans l'Etat d'Andhra Pradesh jusqu'à le 2008 en Inde sont signalé des épidémies.

En Asie du Sud, la présence du CHIKV enregistrée dans les années 1960 et touchant la Birmanie (*Ming et al. 1974*), le Vietnam, le Cambodge (*Chastel 1964*) ou le Sri Lanka (*Obeyesekere et al. 1972*), jusqu'aux épidémies de 2009 :

Thaïlande en 2009, une importante épidémie de chikungunya touche les régions du sud, dont certaines zones touristiques en particulier l'île de Phuket. Entre le 2001 et le 2006, plus de 24 000 cas ont été notifiés dans 36 provinces. L'épidémie semble se diffuser rapidement des provinces du sud vers le nord du pays. Des cas confirmés sont maintenant rapportés dans les provinces centrales, du nord et du nord est.

Malaisie entre le 2001 et le 2009, plus de 2 500 ont été reportés en Malaisie. En semaine 20 de 2009, 475 cas ont été identifiés principalement dans la province de Kedah (*Apandi Y. et al.2010*).

Singapour entre le 2001 et le 2009, 275 cas de chikungunya ont été identifiés (28 cas importés et 247 cas de transmission autochtones); En mars 2009, un cas de chikungunya

avait été identifié chez un patient français revenant d'un court séjour à Singapour (Ho K. et al. 2011).

### **3 L'épidémie de 2005-2006**

Après la réémergence du CHIKV sur la côte Est de l'Afrique, l'épidémie de l'Océan Indien a débuté aux Comores avec près de 5000 cas identifiés début 2005 (InVS 2005 ; Paquet et al. 2006; Sergon et al. 2007). La population de l'Océan Indien étant une population non immune pour ce virus (Fontenille et al. 1988; Zeller 1998), l'épidémie s'est alors étendue aux Seychelles, à Mayotte (Sissoko et al. 2010; Sissoko et al. 2008a ; 2008b) et à l'île Maurice avec plusieurs milliers de cas enregistrés (InVS 2006). Après quelques cas importés sur l'île de La Réunion, les premiers cas autochtones ont clairement été identifiés le 9 mai 2005.

Le premier foyer a été déclaré en mai 2005 avec 450 cas par semaine, jusqu'à, en Février 2006 où le pic épidémique est arrivé à 22000 cas. On estime que le 30% de la population totale fut touché. L'extension rapide de l'aire de répartition des souches originaires d'Afrique, ces souches ont ainsi atteint l'Inde où elles ont été responsables de plusieurs épidémies avec 6421 cas dans l'état d'Andhra Pradesh et plus de 75000 cas à Bangalore (Saxena et al. 2006). L'épidémie a atteint avec plus de 151 millions de personnes infectées (DGHS 2007).

De manière concomitante à ces épidémies de nombreux cas importés ont été découverts en 2005/2006 en France métropolitaine, principalement dans le sud de la France en région Provence-Alpes-Côte d'Azur (Cordel et al. 2006; Hochedez et al. 2006).

En 2007 en Italie (Emilia Romagne) sont été enregistré 277 cas autochtones du CHIKV importé par un touriste infecté au cours d'un voyage en Inde, la présence connue de son vecteur *Ae. albopictus* sur le territoire peuvent avoir contribué à la diffusion du virus (Charrel RN et al. 2008 ; Angelini P. et al. 2007a; Angelini P. et al. 2007b; Rezza et al. 2007).

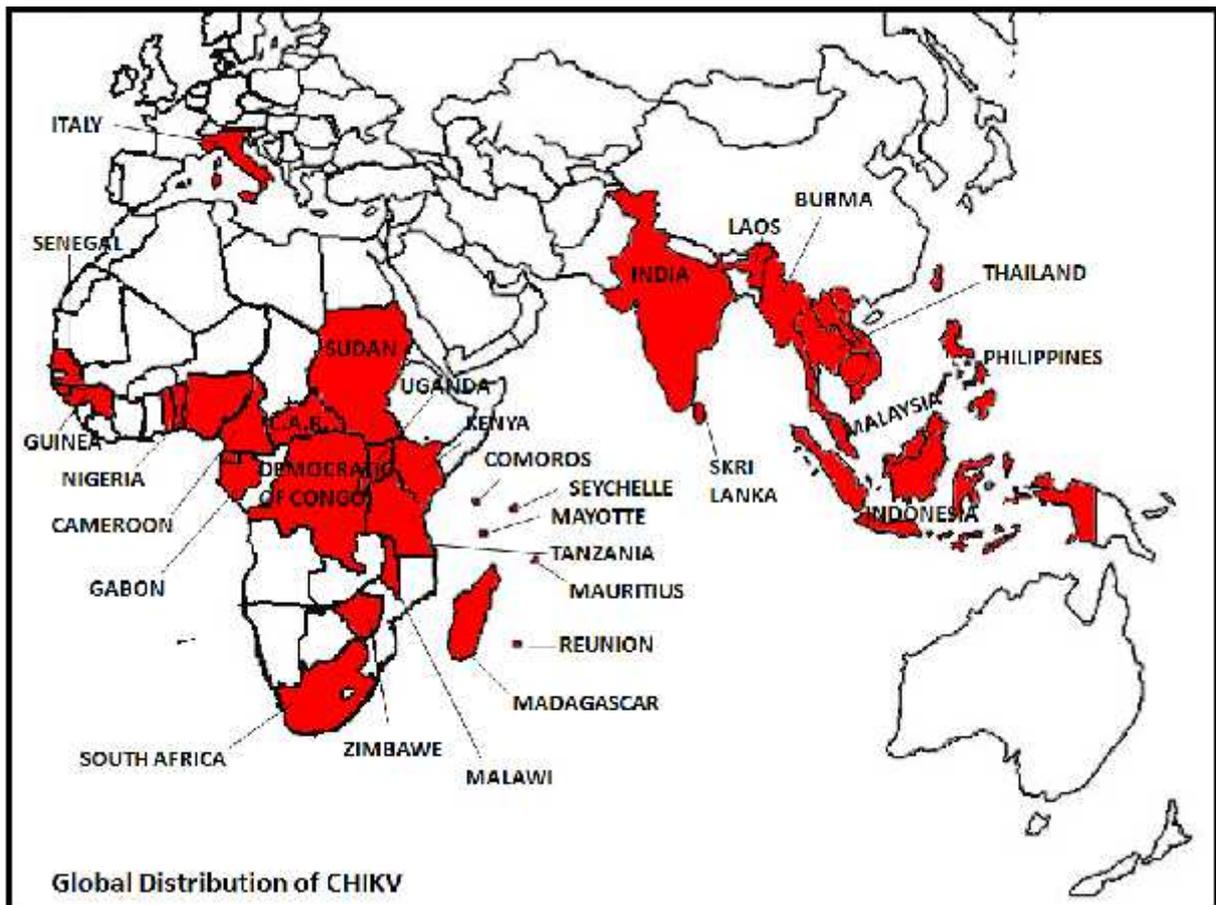


Fig.8 Répartition mondiale du CHIKV

#### 4 Phylogénie du CHIKV

La phylogénétique des souches de Chikungunya permet d'identifier des *clades* différents pour les souches d'Afrique de l'Est, de l'Ouest ou d'Asie, et l'analyse phylogénétique est très proche du O'Nyong-Nyong (*Powers et al. 2000*), (Fig.9).

Le séquençage de différents isolats de l'épidémie de 2005, a permis de mettre en évidence chez certains d'entre eux une mutation dans la glycoprotéine de l'enveloppe plus précisément dans la protéine d'enveloppe E1, (*Schuffenecker et al. 2006*). Cette mutation entraîne la substitution d'une arginine en position 226 au lieu d'une valine (A226V). Cette mutation est décrite comme une adaptation du virus au nouveau vecteur l'*Ae. albopictus* (*Tsetsarkin et al. 2007*). Cette mutation a ensuite été retrouvée en Inde en 2007. (*Arankalle et al. 2007; Kumar et al. 2008; Santhosh et al. 2008*).

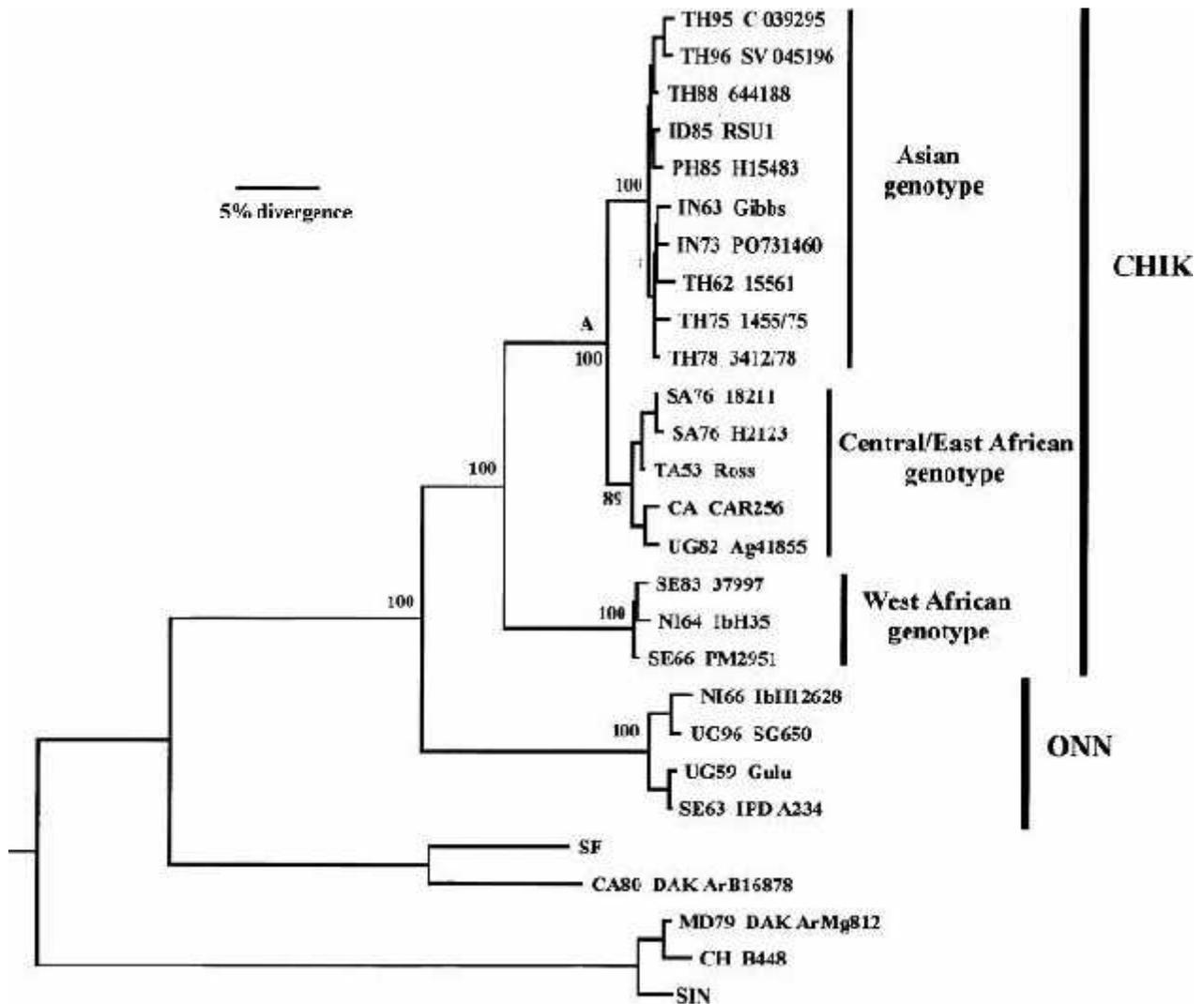


Fig.9 Représentation de 3 clades du CHIKV

## B. Les insectes vecteurs du virus Chikungunya

Le CHIKV est vectorisé par des moustiques du genre *Aedes* ; à ce jour, 2 espèces, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* ont été à ce jour identifiées comme vecteurs épidémiques, à cause de leur adaptation aux zones d'habitat humain. Ces mêmes espèces sont également impliquées dans la transmission d'autres arbovirus: dengue, fièvre dengue hémorragique (DHF), fièvre jaune, etc.

D'autres espèces de moustiques du genre *Aedes* peuvent être infectées par le CHIKV ; certaines de ces espèces seraient impliquées dans la circulation du virus par de cycle sylvatique. Les vecteurs sont un élément essentiel dans le cycle de transmission des Alphavirus. Ce sont eux qui font le lien entre le cycle forestier, où l'on retrouve les virus chez leur hôte réservoir, et le cycle urbain, où le vecteur va transmettre le virus à l'homme. Il est important de considérer ces vecteurs, car ce sont leur répartition géographique et leur capacité à transmettre les virus qui, de manière directe ou indirecte, sont à l'origine de l'émergence ou de la réémergence de nombreuses arboviroses.

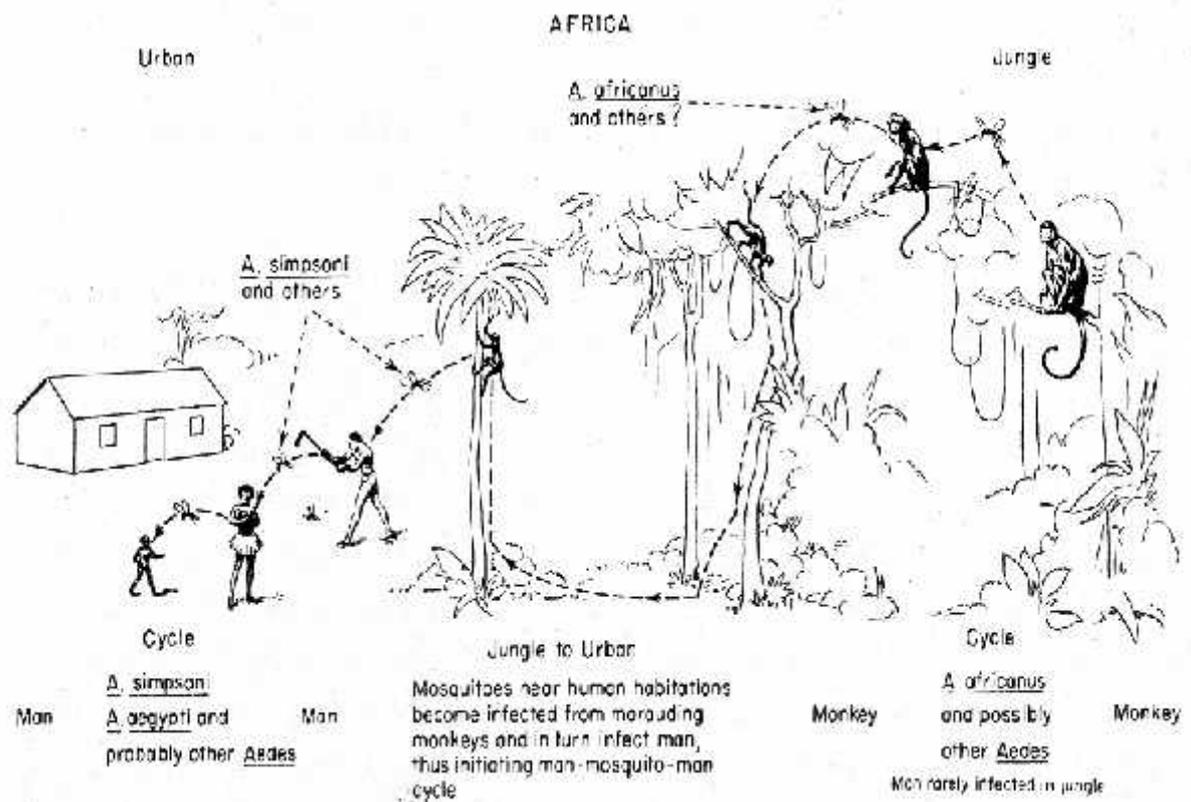


Fig.6 Schéma du cycle général de transmission urbain et selvatique du CHIKV en Afrique de l'Ouest.

## 1 Vecteurs et cycles de transmission du CHIKV

En Afrique, le cycle de transmission du virus est du type sylvatique. Les principaux vecteurs identifiés sont les *Aedes furcifer*, *Aedes luteocephalus* et *Aedes Taylori* (Diallo et al. 1999). La seule espèce de moustiques retrouvée associée au CHIKV dans les habitations concerne *Aedes aegypti* (Fontenille et al. 1997) qui serait donc à l'origine du cycle urbain (de manière sporadique). *Aedes aegypti* est impliqué dans plusieurs épidémies et notamment au Niger (Moore et al. 1974). Deux cycles de transmission sont envisageables en Afrique de l'Ouest le cycle sylvatique et le cycle urbain.

Le cycle sylvatique serait entretenu par les moustiques simioanthropophiles et les singes. Après l'immunisation les singes, à cause des déplacements pourraient permettre la transmission à d'autres espèces immunologiquement naïves, ceci peut aussi expliquer la périodicité de la recrudescence des cas de 3 à 4 ans. Le cycle urbain serait entretenu par les rongeurs et les oiseaux chez qui des anticorps spécifiques contre le CHIKV ont été retrouvés. Ce cycle a permis le maintien du virus dans des régions endémiques où les singes sont immunisés (Diallo et al. 1999).

En Asie, le cycle de maintien du CHIKV est urbain et les vecteurs fréquemment rencontrés et infectés par le CHIKV sont *Aedes Aegypti* et *Aedes Albopictus*, des moustiques péri-domestiques (Tesh et al. 1976; Turell et al. 1992). Aucun réservoir vertébré, ni cycle sylvatique n'a été observé en Asie. Ceci est probablement dû au fait que le CHIKV, originaire d'Afrique, a été exporté en Asie (Powers et al. 2001).

Pendant l'épidémie de CHIKV qui a sévi en 2005 et 2006, dans l'Océan Indien, le principal vecteur identifié est le moustique *Aedes albopictus* (Enserink 2006; Schuffenecker et al. 2006). Du fait d'une compétence vectorielle moindre par rapport à *Aedes aegypti*, un autre moustique impliqué lors d'arboviroses sur le territoire de l'île de la Réunion, *Aedes albopictus* était considéré comme un vecteur secondaire (Tsetsarkin et al. 2007). Cependant des essais de compétence vectorielle réalisés en laboratoire, la micro-épidémie localisée en Italie en 2007 a confirmé et mis en évidence d'un cycle entre *Aedes albopictus* et l'homme (Seyler et al. 2008).

### a) Les réservoirs du CHIKV

Les réservoirs du CHIKV sont principalement les singes comme le *Macaca* identifié en Malaisie (Marchette et al. 1978) et aux Philippines (Inoue et al. 2003) mais aussi le *Cercopithecus aethiops pygerythrus* en Afrique du Sud et le *Bornean* à Bornéo (Wolfe et al. 2001). Autres réservoirs ont été proposés comme le cheval (Olaleye et al. 1989) et les oiseaux migrateurs comme le montrent les expériences de transmissions du virus à la souris par des parasites nidicoles (Sixl et al. 1988). En 1974 une étude sérologique indique que de nombreuses espèces d'oiseaux migrateurs sont séropositives pour le CHIKV (Sidenko et al. 1982). En 1978 une deuxième étude au Sénégal, a confirmé l'importance des oiseaux migrateurs comme réservoir potentiel du CHIKV (Renaudet et al. 1978).

### b) L'infection virale chez le moustique

Le temps mis par EEE depuis l'ingestion sous forme de repas sanguin jusqu'à la dissémination dans les glandes salivaires du moustique est rapide et ne dépasse jamais 7 jours (Scott et al. 1984a). Au début de l'infection, le virus provoque une phase de virémie chez son hôte vertébré. Le premier site d'infection chez le moustique est au niveau des cellules épithéliales (au niveau des microvillosités), dans la partie postérieure du mésantéron (Scott et al. 1984b; Weaver et al. 1990) (Fig.7). L'épithélium du mésantéron représente une barrière critique dans l'infection du virus. C'est à cette étape du cycle viral qu'il y a interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe des Alphavirus avec leurs récepteurs

spécifiques de manière à infecter les cellules épithéliales de l'intestin (Houk et al. 1990; Myles et al. 2003). Deux protéines de 60 kDa et de 38 kDa ont été identifiées comme potentiels récepteurs pour le CHIKV pour l'infection des cellules épithéliales de *Aedes aegypti* (Mourya et al. 1998).

Il est important de dire que chez les moustiques, les stérols ne sont obtenus que par apport de sang lors des repas sanguins. Ainsi l'indépendance des virus au cholestérol pour leur mécanisme d'entrée permettrait une meilleure infection/réplication. Par exemple c'est le cas par SFV dont les mutants indépendants du cholestérol se répliquent mieux dans *Aedes albopictus* que les virus de type sauvage (Ahn et al. 1999b).

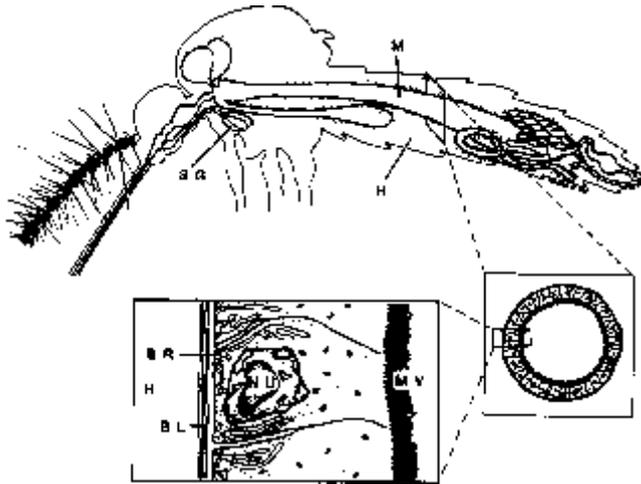


Fig.7 Anatomie interne du moustique et les principaux sites de réplication du CHIKV; M=microvillosités, BL=Lame basale, H=Hémocèle, SG= Glandes salivaires, BR=Labyrinthe basal, NU=Noyau.

Les virus se répliquent avant de se disséminer dans les espaces intercellulaires du moustique entre la lame basale et la couche épithéliale. Le virus se dissémine alors, via l'hémolymphe, dans les organes du moustique, où il se réplique avant de rejoindre les glandes salivaires. Dans les glandes salivaires, une phase intense de réplication est réalisée. Le virus, accumulé dans les canaux salivaires, sera transmis à l'hôte par la salive du vecteur lors d'un repas de sang (Scott et al. 1984a; Scott et al. 1984b; Scott et al. 1989). Le temps nécessaire au virus pour se répliquer et se disséminer dans les glandes salivaires de moustique dépend de la température ambiante (Turell 1993). Durant les saisons sèches ou inappropriées au développement des moustiques, une transmission verticale, transovarienne ou après fertilisation des œufs est possible dans certains cas (Lindsay et al. 1993; Dhileepan et al. 1996). Pour cela, le virus doit infecter les oocytes au début de leur développement (Weaver et al. 1981; Bowers et al. 1995). Une possibilité verticale est envisagée dans le cas de l'épidémie de CHIKV sur l'île de La Réunion (Delatte et al. 2008).

### c) Pathogenèse chez le moustique

Après l'infection chez le moustique il y a une réponse immunitaire humorale et cellulaire, activées par une série de réactions de cascades protéolytiques induisant la coagulation et la mélanisation du sang avec production de peptides antimicrobiens (Tzou et al. 2002). Il est possible de citer la voie de Toll, les voies du déficit immunitaire (Imd) (De Gregorio et al. 2002) enfin la voie des JAK/STAT (Agaisse et al. 2004). Un autre mécanisme de défense est la synthèse d'ARNi (Campbell et al. 2008). Est le principal mécanisme de

défense qui va moduler l'infection par les Alphavirus. Par exemple l'infection par ONNV étudié dans des expériences par la répression de l'expression de gènes qui participent à la d'ARNi chez *Anopheles gambiae* indiquent une augmentation de la réplication virale (Keene et al. 2004). Les virus ont développé des techniques pour contourner le système immunitaire, par exemple après l'infection de cellules *Aedes albopictus* par le SFV, l'expression des gènes cellulaires est considérablement diminuée, ce qui entraîne l'absence d'une réponse efficace de l'hôte (Fragkoudis et al. 2008). Si les mécanismes immunitaires n'étant pas efficaces, le moustique resterait infecté toute sa vie. Après la phase aiguë la quantité de virus diminue rapidement, mais de grandes quantités de virus persistent toute la vie du moustique dans son tissu adipeux et dans les glandes salivaires (Scott et al. 1984b). Les conséquences de l'infection chez le moustique sont différentes : diminution de la longévité des moustiques, ainsi que leur capacité à se reproduire (Mahmood et al. 2004; Scott et al. 1998).

## 2 Caractéristiques et distribution géographique du vecteur

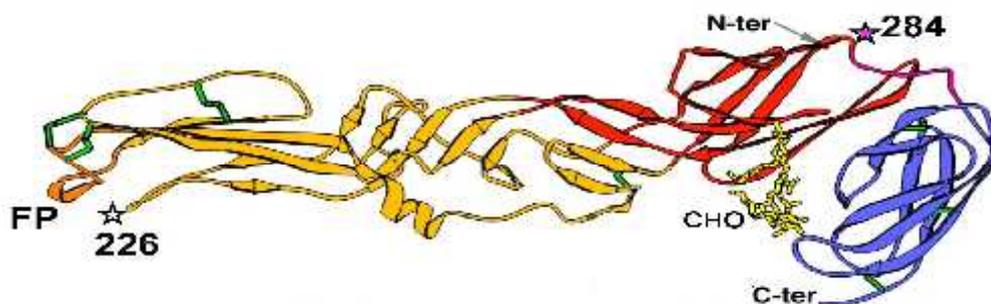
*Aedes albopictus* a été décrit pour la première fois par Skuse, un entomologiste d'origine australien/anglais, qui lui a donné le nom de moustique tigré d'Asie (*albopictus*) dû à l'aspect rayé de ses pattes et à son corps tacheté de blanc. Originaire d'Asie du Sud il n'a cessé de coloniser tous les continents depuis les années 1970. Il a été observé pour la première fois en France métropolitaine en 1999 (Guillet et al. 1999), il fait partie de la famille des Culicidae, de la sous-famille des Culicinae alors que le genre fait aujourd'hui débat, à savoir : *Aedes* (Savage 2005) ou *Stegomyia* (Reinert et al. 2004), historiquement il s'agit du genre *Aedes* et de l'espèce *albopictus*. *Aedes albopictus* est un moustique d'une taille de 2 à 10 mm de long (Huang 1968). On le trouve aussi bien en zone rurale qu'en zone urbaine ou périurbaine (Salvan et al. 1994). Sur l'île de La Réunion, 80% des gîtes larvaires retrouvés sont des gîtes péridomestiques alors qu'il peut être retrouvé jusqu'à 1200 mètres dans les zones non habitées. Les larves se développent dans des lieux d'origine naturelle (tiges de bambou, trous d'arbre, creux de rocher...) ou anthropiques (boîtes de conserve, vases, pneus, fûts,...), mais toujours avec une eau douce peu chargée en matière organique et peu agitée (Pialoux et al. 2006). Les œufs sont résistants à la dessiccation ce qui permet de passer les saisons sèches, avant d'éclore quand débute la saison des pluies. C'est un moustique diurne, dont le pic d'activité est maximal en fin d'après-midi. Seule la femelle prend des repas de sang qui lui sont nécessaires pour les œufs. Elle est donc seule capable de la transmission des virus. Zoophile et anthropophile, *Aedes albopictus* est décrit comme un moustique agressif, toujours à la recherche d'un hôte qui peut être un mammifère ou un oiseau (Hawley 1988).

Outre l'épidémie de CHIKV, *Aedes albopictus* est responsable des épidémies de DENV qui ont sévi en 1977, 1978 et 2004 sur l'île de La Réunion (Zeller 1998).

*Aedes albopictus* est en expansion depuis plusieurs décennies, originaire de l'Asie du Sud, il a d'abord envahi les États-Unis (Texas) (Hawley, 1988), avec le développement du transport aérien il s'est rapidement propagé dans les îles de l'océan Indien, tandis qu'en Europe, on le trouve dans le sud, l'Albanie en 1979, l'Italie (Ravenne en Emilie-Romagne) en 1990 (Adhami et al 1998; Romi et al. 1999), la France (Sud) (Scaffner 2000) 1999 (Vazeille et al. 2007 ; Guillet P. et al. 1999). Aujourd'hui *Ae. albopictus* est largement distribué dans le monde (Fig. 9). Lors de l'épidémie de l'île de la Réunion le moustique responsable de l'épidémie a été *Aedes Albopictus* et non *Aedes aegypti* abondant dans l'Océan Indien et théoriquement plus compétent dans la transmission d'arboviroses, comme le Chikungunya.

*Ae. aegypti* reste dominant dans les zones urbaines (Hobbs et al. 1991), *Ae. albopictus* est abondant dans les zones suburbaines et les zones rurales (Hornby et al. 1994; O'Meara et al. 1995). Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène: il a été observé une concurrence entre les larves de différentes densités et une inhibition de la fermeture des

oeufs *Ae. aegypti* par *Ae. albopictus* (Edgerly et al. 1999). La seconde hypothèse parle des gîtes larvaires restreints, les larves d'*Ae. albopictus* seraient de meilleurs compétiteurs vis à vis des ressources en comparaison avec des larves de *Ae. aegypti* (Juliano 1998). Enfin, il a été observé que la reproduction interspécifique entre mâles et femelles d'*Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* le résultat donne descendants stériles, ce qui pourrait contribuer au déclin des populations d'*Ae. aegypti* (Nasci et al. 1989). Considérant l'ensemble de ces résultats, il est possible de penser que des phénomènes d'exclusion compétitive aient aussi eu lieu sur l'île de La Réunion entre ces deux espèces de moustiques. *Ae. albopictus* a une capacité vectorielle supérieure pour le génotype africain du CHIKV par rapport à *Ae. aegypti*. Pendant l'épidémie à l'île de La Réunion il a été découvert une souche du CHIKV possédant une mutation sur l'acide 226 (A226V) de la glycoprotéine E1, souche isolée par l'Istitut Pasteur, LR-OPYI isolée par le Pr. de Lamballerie, en opposition à la souche identifiée en début d'épidémie, la souche africaine de référence 37997 (Schuffenecker et al. 2006). Une différence de susceptibilité à l'infection du CHIKV d'*Ae. albopictus* selon qu'ils proviennent de Mayotte ou de l'île de La Réunion. Puis, de manière intéressante, la réplication et la dissémination du CHIKV dans *Ae. albopictus* a été montrée comme significativement plus efficace lorsqu'il s'agit de la souche réunionnase *Ae. albopictus*. Cependant les glandes salivaires des *Ae. albopictus* infectés par l'une ou l'autre des deux souches présentaient une infection quantitativement équivalente. Ceci implique donc une différence dans la capacité du virus à franchir la barrière intestinale (Vazeille et al. 2007). Une étude menée par l'équipe du Dr. Higgs a confirmé des résultats similaires démontrant une augmentation significative de la valeur sélective de la souche possédant la mutation A226V pour *Ae. albopictus*. De plus, l'acide aminé en position 226 de la glycoprotéine E1 est responsable de la dépendance au cholestérol pour l'entrée du virus dans la cellule hôte (Vashishtha et al. 1998). L'augmentation de la valeur sélective est liée à la dépendance au cholestérol membranaire dans les cellules de moustiques (Tsetsarkin et al. 2007). Entre 2004 et 2006, des souches de CHIKV portant la mutation A226V ont été retrouvées dans les îles de l'Océan Indien, ainsi qu'Afrique (Gabon-Cameroun), avec un point commun, la présence dans ce territoire d'*Ae. albopictus* seul ou avec *Ae. aegypti*, cette épidémie a été mis en cause dans la transmission du CHIKV en Afrique centrale, au Gabon par l'*Ae. albopictus* (Leroy et al. 2007). La souche virale impliquée possède la mutation sur l'acide aminé 226 (Pages et al. 2009). Il semble donc qu'une convergence évolutive rapide ait eu lieu naturellement (de Lamballerie et al. 2008b). Ces données nous font réaliser l'importance de la distribution géographique, la compétence vectorielle et les phénomènes d'exclusion compétitive dans la dissémination des Alphavirus.



Légende : Modélisation tridimensionnelle de la protéine d'enveloppe E1 du virus Chikungunya. La mutation en position 226, indiquée par l'étoile blanche, pourrait expliquer une adaptation particulière au moustique vecteur *Aedes albopictus* (Schuffenecker et al. 2006).

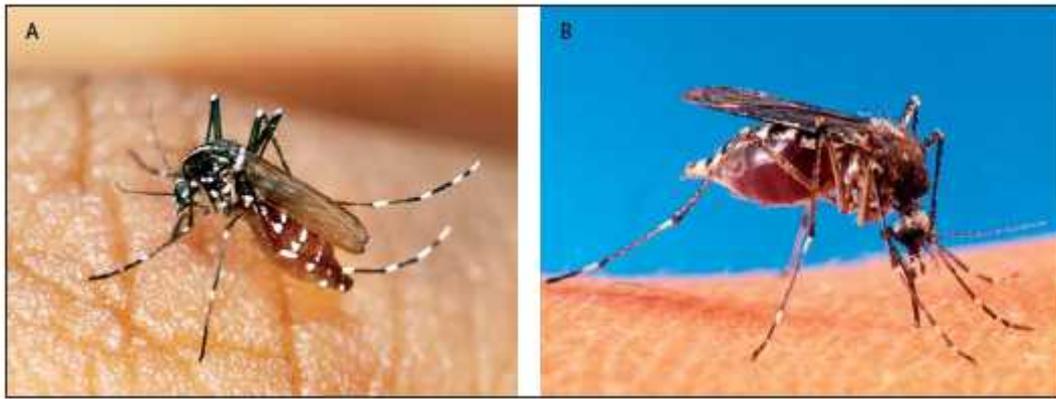


Fig.8: Vecteurs du CHIKV

(A) : *Ae. albopictus* est le principal vecteur du CHIKV dans l'Océan Indien. (B) : *Ae. aegypti* est le principal vecteur du CHIKV en Asie.



Fig.9 Carte du virus Chikungunya : données cartographiques@2008 Europa Technologies

## C Aspects cliniques de l'infection

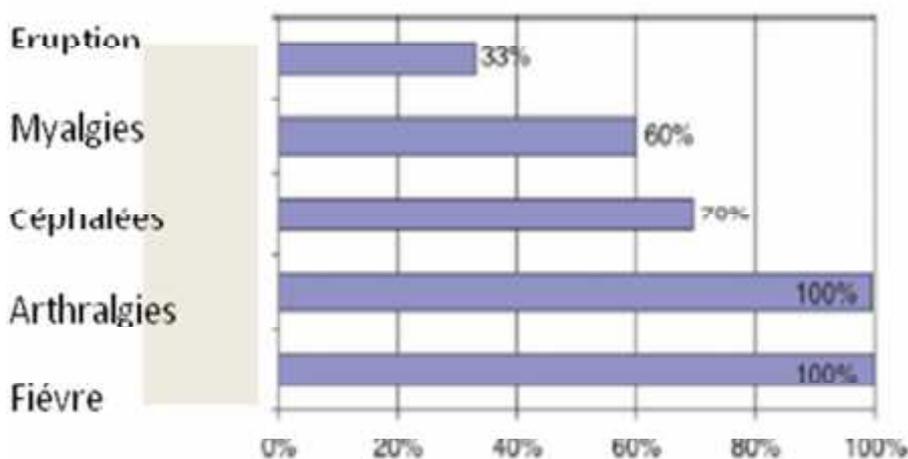
### 1 Les formes classiques

#### a) Forme asymptomatique

Cette forme de chikungunya est celle où il n'y a pas de symptômes visibles, mais la présence de l'infection peut être identifiées par des tests sérologiques (*Porte 2004*). Un exemple sont les cas récents en Italie et à l'île de la Réunion avec 15% des cas asymptomatiques (*Brouard et al. 2008*). Cette forme est déterminée par la présence d'ARN viral dans le sang de personnes infectés et qui peut potentiellement être transmis lors de transfusions sanguines (*Bianco 2008; Brouard et al. 2008; Liunbruno et al. 2008*).

#### b) Forme aiguë typique

Les symptômes aigus surviennent après une période d'incubation silencieuse, qui varie entre quatre et sept jours à la suite de la pique d'un moustique infestant (*Robinson 1955; Kennedy et al. 1980*). Le tableau clinique classique débute souvent par l'apparition brutale d'une forte fièvre (40°C) pendant 3 / 10 jours accompagnée de frissons intermittents (*Deller et al. 1967*). La fièvre est, dans certains cas, bi-phasique, c'est-à-dire qu'elle diminue durant un ou deux jours, avant de remonter brutalement. Elle est généralement suivie d'érythèmes, de courbatures douloureuses ou myalgies et douleurs musculaires (*Ozden et al. 2007*) en particulier celles impliquant la douleur au niveau des extrémités (poignés, phalanges et chevilles) (*Robinson 1955; Jadhav et al. 1965; Thiruvengadam et al. 1965*), de migraine, éruptions cutanées maculo-papuleuses parfois prurigineuses. L'éruption touchant le thorax, le visage, les mains et les pieds, chez les enfants ont été observées des éruptions de type bulleux accompagné par un détachement cutané (*Talarmin et al. 2007*). L'évolution de la maladie régresse progressivement.



Tab.4. Signes cliniques du CHIKV Pialoux et al. 2007

### 2 Effets secondaires

Chez certains patients, les arthralgies peuvent être récurrentes ou persistantes pendant plusieurs mois ou années (*Brighton et al. 1983; Paquet et al. 2006; Volpe et al. 2006; Carmona et al. 2008; Lokireddy et al. 2008*). Ces formes chroniques sont particulièrement retrouvées chez les personnes âgées et rarement observée chez les enfants (*Fourie et al. 1979; Brighton et al. 1983*).

Le patrimoine génétique peut aussi être un facteur facilitant la survenue de formes chroniques. Des études ont été faites pendant l'épidémie en Afrique du Sud ont montré que l'haplo type

HLA B27, associé aux spondylarthrites ankylosantes ou à d'autres arthrites, est majoritairement présent chez les patients souffrant d'arthralgies chroniques. Ces symptômes semblent être corrélés par une augmentation des anticorps spécifiques contre le CHIKV. Ces arthralgies peuvent persister pendant 4 mois dans 33% des cas (*Kennedy et al. 1980*), plus d'un an dans le 15% des cas (*Fourie et al. 1979*) et de 3 à 5 ans pour 10% des patients (*Brighton et al. 1983*).

### **3 Formes atypiques**

Des formes atypiques graves ont été observées lors de l'épidémie à l'île de la Réunion (*Schuffenecker et al. 2006*). Sur un total de 878 cas atypiques ont été déclarés au cours de cette épidémie dont 247 (30%) cas graves ayant donné lieu à 68 décès. Ces formes représentaient 3,6 pour mille des cas de Chikungunya dans la population.

Les manifestations cliniques des cas atypiques les plus fréquentes étaient : les manifestations digestives (39%), avec des douleurs abdominales, des vomissements, des diarrhées et les manifestations neurologiques (34%).

Quelques cas d'hépatites graves, de méningo-encéphalites, de myocardites et d'insuffisances rénales aiguës ont également été rapportés. Les cas atypiques survenaient principalement chez des sujets vulnérables (jeunes enfants, personnes âgées, patients présentant des antécédents médicaux). La survenue de cas chez des nouveau-nés par transmission mère-enfant (materna-néonatale) a également été observée à La Réunion. Ce type de transmission n'avait pas été rapporté jusqu'à présent dans la littérature médicale internationale (*D.R.A.S.S. de La Réunion 2008*).

### **4 Forme létale**

Bien qu'aucun cas mortel n'ait été relevé dans la littérature, une surmortalité temporaire a été observée à La Réunion (février et mars 2006, avril dans une moindre mesure), contemporaine du passage de l'épidémie. Les analyses épidémiologiques ont permis, pour la première fois, d'estimer «grossièrement» la létalité à 1/1000. Plusieurs certificats de décès ont mentionné le Chikungunya en 2006. Dans la plupart des cas, la mention de Chikungunya a été portée en diagnostic associé et la cause première du décès. L'analyse des certificats et l'investigation auprès des médecins ayant pris en charge ces personnes ont montré qu'il s'agissait essentiellement de sujets âgés, fragilisés par d'autres pathologies chroniques. Toutefois, quelques décès ont été rapportés chez des personnes plus jeunes contaminées par le virus du Chikungunya, sans pouvoir les rattacher à une autre cause ou à une maladie sous-jacente. La létalité est estimée à 1 cas pour 1000 (*Josseran et al. 2006*).

## **D Physiopathologie de l'infection par le CHIKV**

Comprendre les mécanismes de mise en place de la maladie (pathogénèse) est particulièrement difficile chez l'Homme. D'une part parce qu'il est impossible d'obtenir des échantillons biologiques pertinents, comme les tissus profonds (foie, rate...) dans lesquels le virus se réplique et, d'autre part, du fait de la multiplicité des antécédents médicaux et des maladies chroniques des patients. En effet, les cas les plus sévères de Chikungunya sont plus fréquents chez des patients âgés et fragilisés par d'autres pathologies préexistantes (cardiaques, rénales et hépatiques...). Pour trouver le virus dans l'organisme et caractériser ses interactions avec les cellules de l'hôte dans leur contexte on doit utiliser les modèles, qui font appel à des animaux soit nouveaux nés, soit adultes mais dépourvus de défenses naturelles du fait de modifications génétiques, ne sont que très partiellement représentatifs de ce qui se passe chez l'Homme. Des études récentes ont montré un modèle de la maladie chez des macaques cynomolgus adultes ayant un système immunitaire fonctionnel et une physiologie

très similaires à celui de l'homme ont montré que ces animaux, infectés par le virus du Chikungunya isolé chez les patients au cours de l'épidémie de l'Île de la Réunion, présentent toutes les caractéristiques virologiques et cliniques observées chez l'Homme. Elles ont mis en évidence certaines caractéristiques propres de la pathologie comme des atteintes du foie en phase aiguë. Mais la découverte la plus marquante est le fait que ce virus infecte, notamment, des cellules impliquées dans les premières étapes des mécanismes de défense de l'organisme : les macrophages et les cellules dendritiques. Ces cellules peuvent héberger le virus pendant plusieurs mois et possèdent également la propriété d'infiltrer des tissus comme les articulations, les muscles, les organes lymphoïdes et le foie. Ceci peut expliquer les symptômes typiques de cette maladie, comme les douleurs musculaires et articulaires très invalidantes observées à long terme chez les patients. Les macrophages infectés, représentent donc une cible potentielle pour le développement de nouvelles thérapies pour les atteintes chroniques. Ces résultats, qui permettent de mieux comprendre les mécanismes conduisant à la maladie, constituent une étape importante dans le processus de l'innovation en thérapeutique (Labadie et al. 2010).

## **1 Tropisme**

Les études sur le CHIKV pendant les années 60-70 ont permis d'établir que ce virus possède la capacité de se répliquer dans des lignées cellulaires différentes (Glasgow 1966; Rinaldo et al. 1975). Aujourd'hui nous savons se répliquait dans les macrophages (cellules phagocytaires d'origine sanguine et localisées dans les tissus). Ces cellules pourraient donc être impliquées dans l'infection des tissus touchés par la maladie, comme les muscles et les articulations. Le virus infecte des cellules dites "adhérentes": cellules endothéliales, cellules épithéliales, fibroblastes... Les chercheurs souhaitent aujourd'hui identifier les voies d'entrées du virus dans ces types cellulaires, et aussi mieux comprendre les interactions du virus avec le système immunitaire. Leur travail pourrait d'ores et déjà permettre de tester des médicaments en culture cellulaire, en vue de sélectionner ceux qui inhibent l'infection des cellules cibles (Sourisseau M. et al. 2007).

Une autre étude a montré que dans certains cas les cellules infectées présentes dans le tissu musculaire sont des cibles du virus Chikungunya. Ils ont trouvé dans une biopsie prélevée en phase aiguë de la maladie chez un patient, et dans une autre prélevée à un stade plus tardif chez une autre patiente, que les cellules précurseur des cellules musculaires - les cellules satellites - étaient infectées par le virus. De plus, ces cellules s'avèrent, en culture cellulaire, très permissives au virus. Les auteurs cherchent aujourd'hui à savoir si ces cellules ne joueraient pas un rôle de "réservoir" du virus, ce qui expliquerait les récurrences des douleurs musculaires observées chez certains patients (Ozden S. et al. 2007).

## **2 Sites de la réplication virale**

La contamination chez l'homme par le CHIKV se fait *via* la salive du moustique vecteur. Les cellules satellites des muscles striés participent à la réplication virale (Ozden et al. 2007). Après la réplication virale dans le site d'inoculation le virus est disséminé vers les différents organes à travers la circulation sanguine. Les cellules de Langherans et dendritiques avec l'antigène et les macrophages étroitement liés aux cellules des muscles squelettiques (Chazaud et al. 2007) doivent initier la propagation du virus avant de rejoindre la circulation sanguine périphérique. Afin de mieux comprendre comment le virus du Chikungunya affecte l'organisme, un modèle murin de l'infection a été mis au point. Ce modèle est porteur d'une délétion d'un gène codant l'une des protéines clés de la réponse immunitaire antivirale aiguë. Lorsqu'une seule des deux copies du gène est mutée, les souris miment la maladie sous sa forme bénigne. Avec deux versions modifiées, et donc incapables de produire la protéine, elles constituent un modèle des formes sévères de l'infection. Ce modèle animal du Chikungunya a permis d'identifier les cibles tissulaires et cellulaires du virus. On a démontré

qu'après une phase initiale touchant le foie, l'infection s'étendait aux articulations, aux muscles, à la peau, le système nerveux central. Ces travaux révèlent également que la cible cellulaire principale du virus est le fibroblaste. La maladie était plus sévère chez les souriceaux nouveau-nés, et grâce à ce modèle, on a pu étudier la transmission du virus de la mère à l'enfant, une complication qui a été décrite pour la première fois lors de l'épidémie réunionnaise (Couderc et al. 2008).

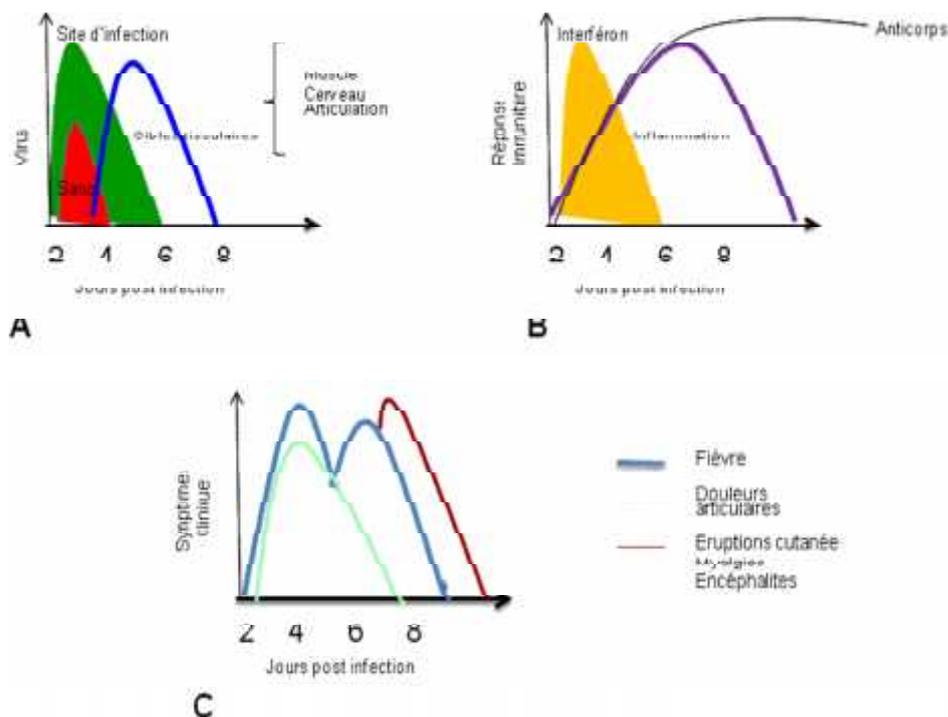
### 3 Réponses immunitaires

#### a). Réponse innée

La réponse à la présence d'ARN étranger dans l'organisme, suite à une infection virale, dans un Alphavirus a été observée par des modèles animaux testés réagissent rapidement par une réponse Interféron (INF) de type I  $\alpha/\beta$  (Gifford et al. 1964; Trgovcich et al. 1999). In vivo cette réponse (INF) est rapide et ne requiert pas la réplication virale, est proportionnelle au titre du virus chez les animaux tests la concentration INF peut varier en fonction de certains facteurs, elle diminue si les souris sont infectées par plus d'un virus en même temps (Schilte et al. 2010).

Les premières expériences sur des cellules embryonnaires de poulet pour l'étude de l'induction d'INF de type I par le CHIKV (Friedman 1964; Wagner 1964), ils ont montré comment tous les Alphavirus, pendant l'infection l'INF $\gamma$  de type I ou II inhibent la réplication virale. L'étude du modèle murin (Couderc et al. 2008) a montré que des souris déficientes dans la voie d'induction de l'INF présentent une infection et des symptômes plus sévères que des souris sauvages. La sévérité est de plus dépendante de l'âge.

Fig.4 Schéma de la pathogenèse classiquement associée aux Alphavirus;(Field 5<sup>ème</sup> édition)



## b). Réponse adaptative

La réponse immunitaire humorale après l'infection par le CHIKV est quantifiable par analyse sérologique, avec la production d'immunoglobuline (Ig) de type M à partir de quatre à sept jours après l'apparition des premiers signes cliniques, et production d'IgG après quinze jours. Les IgM ont une durée de vie moyenne de quelques semaines jusqu'à trois mois, tandis que les IgG produits après la phase aiguë et pendant le période de la convalescence peuvent persister pendant des années (Pialoux et al. 2006). Le CHIKV induit une immunité protectrice de très longue durée (Greiser-Wilke et al. 1989; Blackburn et al. 1995).

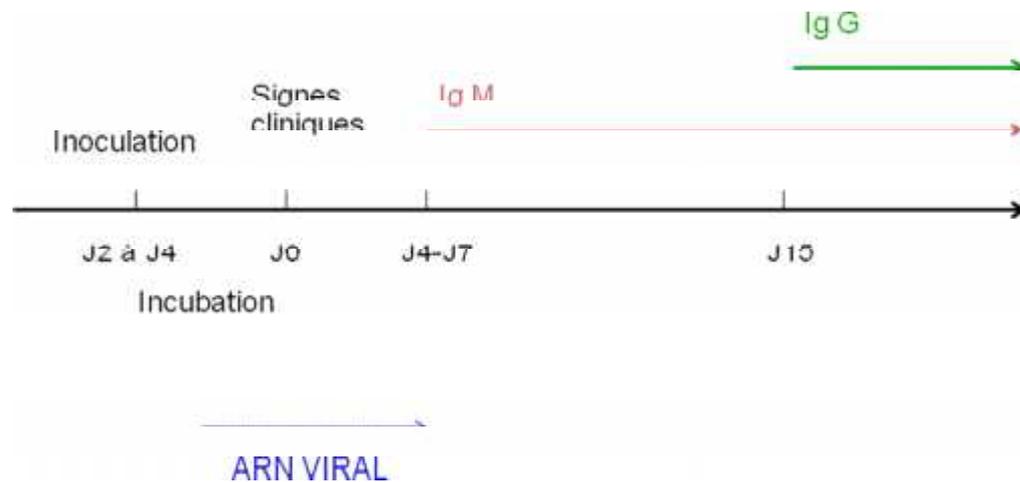


Fig.5 Schéma de la cinétique de production des IgM et IgG après infection par CHIKV

## E Diagnostic

### a) Tests sérologiques

L'immunofluorescence, inhibition d'hémagglutination et la fixation du complément (Calisher et al. 1986), mais avec ces techniques de diagnostic indirect n'avons pas la quantification réelle du titre d'anticorps, et si on utilise un virus similaire on peut avoir des faux positifs (Blackburn et al. 1995).

Un autre test utilisé est le dosage par technique immun-enzymologique (ELISA) (Thein et al. 1992). Depuis l'épidémie de l'île de La Réunion, le développement de tests ELISA et la production de protéines recombinantes ont permis d'élaborer des tests fiables, mais qui ne sont pas toujours commercialisés (Cho et al. 2008a; Cho et al. 2008b). Limites à cause du risque de « croisement ».

### b) RT-PCR

Suite à l'épidémie de CHIKV sur l'île de La Réunion depuis 2002 (Pfeffer et al. 2002), la technique a été rapidement mise au point (sans étape d'extraction d'ARN). Cette technique a utilisé des sondes destinées à amplifier spécifiquement un fragment de la glycoprotéine d'enveloppe E1 (Pastorino et al. 2004; Pastorino et al. 2005). L'usage de la RT-PCR pour le diagnostic est utile seulement pendant la phase virémique qui correspond aux sept premiers jours d'infection. D'autres techniques de RT-PCR ont été développées (Edwards et al. 2007; Santhosh et al. 2007). Tous les tests ont été validés et leur faisabilité a été évaluée au cours de différentes études (Panning et al. 2009a; Panning et al. 2009b). Aussi, un kit de détection du CHIKV fondé sur la technologie d'amplification de séquence nucléotidique (méthode NASBA) a récemment été développé pour le diagnostic clinique. Les tests réalisés indiquent que ce kit est rapide, très sensible et spécifique (Telles et al. 2009).

## F Les traitements

### 1 Les vaccins

Différents vaccins ont été réalisés ou sont en cours de développement. Les premiers prototypes de vaccin ont été développés dans les années '70, ont été réalisés à partir de virus inactivés par extraction à l'éther (*Eckels et al. 1970*) ou par traitement à la formaline (*Harrison et al. 1971*), mais ils n'ont pas donné de résultats satisfaisants.

Récemment, un vaccin développé par l'armée américaine à partir de virus (souche thaïlandaise 15561) atténués a été utilisé chez l'homme. Testé d'abord par Levitt en 1986 en phase I et sur 16 volontaires (*Levitt et al. 1986*), le vaccin, nommé TSI-GSD-218, l'a ensuite été en phase II, en double aveugle, sur 73 volontaires âgés de 18 à 40 ans. Ce vaccin de phase II a montré des résultats satisfaisants, car, dans les jours après l'inoculation du vaccin le taux de séroconversion était de 98% et 85% après 1-2 mois. Seuls 8% des patients ayant reçu le vaccin présentaient des arthralgies (*McClain et al. 1998 ; Edelman et al. 2000*). Cependant les essais concernant ce vaccin ont été abandonnés en 2003.

Récemment, des virus naturellement atténués du VEEV, EEEV ou SINV et du CHIKV de la souche réunionnaise LR-OPY1 ont été utilisés afin de développer un vaccin dirigé contre le CHIKV. Les résultats préliminaires chez la souris indiquent une quantité satisfaisante d'anticorps neutralisants synthétisés et une significative diminution de la réplication virale dans différents organes (*Wang et al. 2008*). Enfin, un vaccin préparé à partir de virus du clade ECSA atténués par la formaline a été testé sur un modèle murin. Ce vaccin induit la production de forts titres d'anticorps neutralisants chez les souris, et qui persistent jusqu'à huit semaines (*Tiwari et al. 2009*).

### 2 Les molécules antivirales

Il n'y a aucun traitement antiviral efficace contre le CHIKV. Le traitement est donc essentiellement symptomatique et composé d'antalgiques non salicylés, de paracétamol et d'anti-inflammatoires non stéroïdiens. Du fait des complications iatrogènes (hépatites aggravées, insuffisance rénale, hémorragies) liées à ces traitements, l'utilisation d'ibuprofène ou d'acétaminophène est préférée (*Tesh 1982*).

Dans les cas d'arthralgies chroniques liées au CHIKV, l'utilisation de Chloroquine en substitution aux anti-inflammatoires non stéroïdiens a été testée sur les patients. Une amélioration s'est avérée significative (*Brighton 1984*). Au contraire, en 2006, une étude réalisée en Afrique du Sud a révélé l'inefficacité de l'utilisation de la Chloroquine dans le traitement des arthralgies (*Savarino et al. 2006*). Ces résultats sont confirmés par l'essai réalisé en double aveugle sur 58 personnes traitées avec de la Chloroquine en 2008 (*De Lamballerie et al. 2008a*).

*In vitro*, la combinaison de l'IFN  $\alpha$ , de la ribavirine, de la 6-azauridine, et de la glycyrrhizine semble avoir un effet antiviral synergique efficace (*Briolant et al. 2004 ; 2007*). Ces quatre composés ont déjà été montrés comme efficaces dans le traitement de certaines fièvres hémorragiques (*Andrei et al. 1993*) ou d'encéphalites dues à des Alphavirus (*Grieder et al. 1999*).

Enfin, d'autres essais ont été réalisés et notamment l'utilisation du decanoyl-RVCR-chloromethyl ketone, un inhibiteur d'une furine cellulaire (protéase nécessaire au clivage protéolytique du précurseur des glycoprotéines d'enveloppe E2-E3) capable d'endiguer l'expansion virale dans les cellules (*Ozden et al. 2008*). Il apparaît que l'utilisation d'ARN interférant (ARNi) spécifiquement dirigé contre des fragments de séquences nucléotidiques codantes pour la nsP3 ou la glycoprotéine E1 du CHIKV est capable d'inhiber efficacement sa réplication au sein de cultures cellulaires (*Dash et al. 2008*).

# III : Valorisation du travail bibliographique

Antiviral Research 87 (2010) 111–124



Contents lists available at ScienceDirect

Antiviral Research

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/antiviral



## Review

### Understanding the alphaviruses: Recent research on important emerging pathogens and progress towards their control

E.A. Gould<sup>a,\*,</sup>, B. Coutard<sup>b</sup>, H. Malet<sup>b</sup>, B. Morin<sup>b</sup>, S. Jamal<sup>b</sup>, S. Weaver<sup>c</sup>, A. Gorbalenya<sup>d</sup>, G. Moureau<sup>a</sup>, C. Baronti<sup>a</sup>, I. Delogu<sup>a</sup>, N. Forrester<sup>c</sup>, M. Khasnatinov<sup>g</sup>, T. Gritsun<sup>f</sup>, X. de Lamballerie<sup>a</sup>, B. Canard<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institut de Recherche pour le Développement UMR190 Unité des Virus Emergents, Université de la Méditerranée, Marseille, France

<sup>b</sup> Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, CNRS and Université d'Aix-Marseille I et II, UMR 6098, EDR, Case 925, 13288 Marseille, France

<sup>c</sup> Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, United States

<sup>d</sup> Department of Medical Microbiology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

<sup>e</sup> Centre for Ecology and Hydrology, Mansfield Road, Oxford OX1 3SR, UK

<sup>f</sup> School of Biological Sciences (AMSS Building), University of Reading, Berks RG6 6AJ, UK

<sup>g</sup> Laboratory of Transmissible Infections, Institute of Epidemiology and Microbiology, 664025, Irkutsk, Karl Marks Str., 3, Russia

## article info

### Article history:

Received 17 May 2009

Received in revised form 7 July 2009

Accepted 11 July 2009

### Keywords:

Alphavirus

Genomics

Reproductive enzymes

Antivirals

Evolution

Classification

Emerging virus

VIzIER

## abstract

The alphaviruses were amongst the first arboviruses to be isolated, characterized and assigned a taxonomic status. They are globally very widespread, infecting a large variety of terrestrial animals, insects and even fish, and circulate both in the sylvatic and urban/peri-urban environment, causing considerable human morbidity and mortality. These viruses, despite their ubiquitous importance as pathogens, there are currently no effective antiviral drugs with which to treat humans or animals infected by any of these viruses. The EU-supported project—VIzIER (Comparative Structural Genomics of Viral Enzymes Involved in Replication, FP6 Project: 2004-511960) was instigated with an ultimate view of contributing to the development of antiviral therapies for RNA viruses, including the alphaviruses (Coutard, R., Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J., Leontovich, A.M., Poupon, A., De Lamballerie, X., Charrel, R., Gould, E.A., Gunther, S., Norder, H., Klempa, B., Bourhy, H., Rohayem, J., L'hermite, E., Nordlund, P., Stuart, D.I., Owens, R.J., Grimes, J.M., Tuckerm, P.A., Bolognesi, M., Mattevi, A., Coll, M., Jones, T.A., Åqvist, J., Unger, T., Hilgenfeld, R., Bricogne, G., Neyts, J., La Colla, P., Puerstinger, G., Gonzalez, J.P., Leroy, E., Cambillau, C., Romette, J.L., Canard, B., 2009. The VIzIER project: preparedness against pathogenic new viruses. *Antiviral Res.* 78, 37–46). This review highlights some of the major features of alphaviruses that have been investigated during recent years. After describing their classification, epidemiology and evolutionary history and the expanding geographic distribution of Chikungunya virus, we review progress in understanding the structure and function of alphavirus replicative enzymes obtained under the VIzIER programme and the development of new disease control strategies.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Contents

1. Introduction	112
1.1. Phased clinical cases	113
1.2. Structure, genome strategy and replication	112
2. The alphaviruses as human pathogens	113
3. Molecular epidemiology and biogeography	114
3.1. Evolutionary origins of the alphaviruses	114
3.2. Alphavirus emergence in the New World	114
3.3. Recent emergence of Chikungunya virus	115
4. Studies on the active domains of alphavirus replicative enzymes	116
4.1. Alphavirus nsP1 protein	117
4.2. Alphavirus nsP2 protein	117

\* Corresponding author at: Centre for Ecology and Hydrology, Mansfield Road, Oxford OX1 3SR, UK.

E-mail address: eagle@ceh.ac.uk (E.A. Gould).

4.3.	Alphavirus nsP3 protein	118
4.4.	Alphavirus nsP4 protein	118
5.	Therapeutic strategy and prevention	118
5.1.	Search for antiviral drugs	118
5.1.1.	Chloroquine	118
5.1.2.	Quinine	119
5.1.3.	Ribavirin	119
5.1.4.	Interferon and ribavirin	119
5.1.5.	Inhibitors of alphavirus entry and maturation	119
5.1.6.	Carbodiene	119
5.1.7.	Small RNA molecules	119
5.1.8.	Other compounds	120
5.1.9.	nsP1 active domains as a target for inhibition	120
5.1.10.	nsP2 active domains as a target for inhibition	120
5.1.11.	nsP3 active domains as a target for inhibition	120
5.1.12.	nsP4 active domains as a target for inhibition	120
5.2.	Antiviral vaccines	120
6.	Conclusion	121
	Acknowledgements	121
	References	121

## 1. Introduction

### 1.1. Classification

The VIIIth edition of the International Committee for the Taxonomy of Viruses (ICTV) currently lists 29 species in the genus Alphavirus that together with the genus Rubivirus forms the family Togaviridae (Weaver et al., 2005). The alphaviruses are arthropod-borne (arboviruses), whereas the rubiviruses are transmitted via the respiratory tract. All arthropod-borne alphaviruses are antigenically related but most can be distinguished in cross-reactivity tests (Chanas et al., 1976; Clarke and Casals, 1958; Karabatsos, 1976; DeBorja, 1987) with which they have been divided into 8 antigenic complexes: Eastern, Western, and Venezuelan equine encephalitis, Trocara (complex assigned based only on genetic divergence), Middeburg, Ndumu, Semliki Forest and Barmah Forest. In addition, there are two non-arthropod-borne species, Salmon pancreatic disease virus and Southern elephant seal virus. Based on comparative sequence analysis, the arthropod-borne alphaviruses share a minimum of about 40% amino acid identity in the more divergent structural proteins and 60% in the non-structural proteins.

### 1.2. Structure, genome strategy and replication

Alphavirus virions are approximately 70 nm in diameter. They are spherical with a lipid bilayer containing heterodimeric protein spikes composed of two envelope glycoproteins E1 and E2. Many alphaviruses also contain a third envelope protein E3. The heterodimers are organized in a T=4 icosahedral lattice consisting of 80 trimers of E1–E2 complex. The enclosed nucleocapsid core consists of 240 copies of capsid protein and a single copy of the genomic RNA, although Aura virus is reported also to enclose the 26S subgenomic RNA (Rumenapf et al., 1995). The one-to-one relationship between glycoprotein heterodimers and nucleocapsid proteins is important in virus assembly. E1 is the fusion protein for virus entry into the acidic cytoplasmic endosomes. The structure of the E1 glycoprotein of Semliki Forest virus has been determined by crystallography (Lescar et al., 2001), revealing a fold closely related to the Rubivirus envelope protein. The E2 glycoprotein extends outwards from the envelope and forms the petals of the spike that cover the underlying E1 protein fusion peptide at neutral pH (Mukhopadhyay et al., 2006).

The four non-structural proteins are defined as nsP1, nsP2, nsP3 and nsP4. The genomic RNA is positive-stranded and serves as the mRNA for translation of the polyprotein precursor that is autocatalytically processed to the four non-structural viral proteins by the virus encoded protease in nsP3 (Fig. 1). The non-structural proteins form the transcription/replication complex that mediates the synthesis of diverse viral RNAs of both polarities. The nsP1 protein was implicated in capping of viral RNAs (Ahola and Kääriäinen, 1992; Schardel et al., 1996) and in initiation of negative-strand RNA synthesis (Sawicki and Sawicki, 1994). It is bound to the cytoplasmic membrane via a central amphipathic alpha helix located in the middle of the protein (Lampio et al., 2000). The nsP2 gene encodes a putative helix-loop domain at the 5' end and a protease domain at the 3' end, which presents a unique fold distantly related to that of known cysteine proteases (Russo et al., 2006). This protease domain is linked to the downstream domain of the *G*-methyltransferase fold, that may be approximately active only in non-arthropod-borne alphaviruses (Feder et al., 2003). In its free form, the nsP2 protein induces cytotoxicity and is responsible for transcriptional shut-off, which is dependent on the integrity of the polyubiquitin peptide located downstream of its helix-loop and protease domains. The nsP3 protein is required for RNA replication. It carries three domains: the N-terminal sequence reveals a macro domain, the crystal structures of which have recently been determined for Venezuelan equine encephalitic virus (VEEV) and Chikungunya virus (CHIKV) (Malet et al., 2009). It is followed by a serine/threonine-rich sequence that may be phosphorylated. The C-terminal region is poorly conserved in both size and sequence (Sraes and Sraes, 1994). The nsP4 protein carries the viral RNA polymerase motif (Kamer and Argos, 1984). During RNA replication, a negative-stranded copy is produced and used as a template for the synthesis of genome-sized positive-strand RNA and subgenomic 26S mRNA corresponding to the 3' third of the viral genome and encoding the viral structural proteins (Garmashova et al., 2006; Hahn et al., 1988; Lemm et al., 1994; Mukhopadhyay et al., 2006; Weaver, 2005).

The non-structural proteins function in the cytoplasm of infected cells in association with membrane surfaces, and attachment appears to be mediated by nsP1 palmitoylation (Ahola et al., 2000). For reasons not yet explained, the nsP2 protein migrates to the infected cell nuclei and this has also recently been shown to be the case for the nsP3 protein (Gorchakov et al., 2008). The capsid protein is cotranslationally cleaved from the structural polyprotein by its own protease activity and assembles with the viral genomic

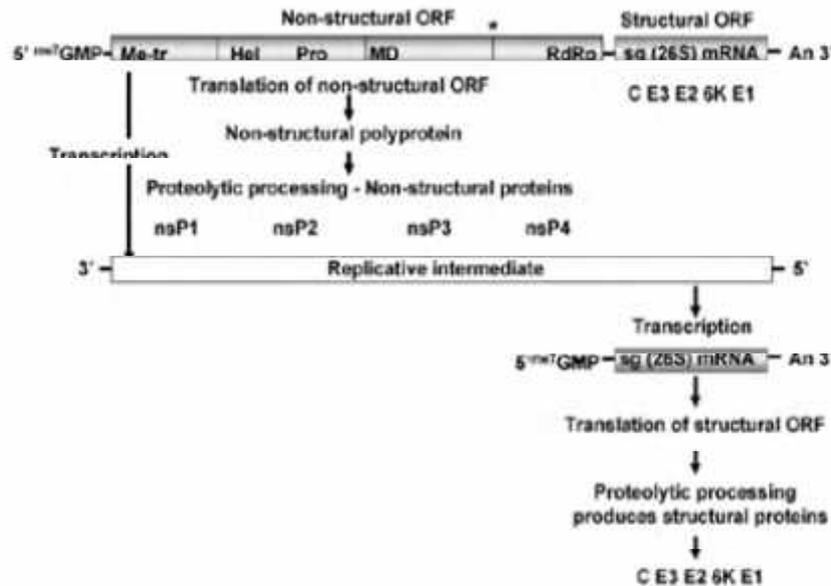


Fig. 1. Alphavirus genome coding strategy (adapted and updated from Strauss and Strauss, 1994). Open-reading frame (ORF) represented as open box, and untranslated regions as solid black lines: sg (subgenomic), asterisk between nsP3 and nsP4 identifies the position of the stop codon that is present in some alphaviruses and is read through to produce the precursor nsP1,2,3,4 polyprotein, Me-tr (methyltransferase), Hel (helicase), Pro (protease), MD (macro domain—exhibits adenosine di-phosphoribose 1-phosphate phosphatase activity), RdRp (RNA-dependent RNA polymerase), C (capsid), E (envelope).

RNA to form the viral nucleocapsid in the cytosol. Glycoproteins are translocated, via the Golgi apparatus, to the plasma membrane and assembled nucleocapsids bud through these membranes, thus acquiring a lipid envelope containing the integral membrane glycoproteins, E1 and E2.

In this review, we analyse (a) progress in genomics, towards understanding alphavirus evolution, taxonomy, and vector–host relationships in the context of their epidemiology and pathogenesis, and (b) the structures of active domains in alphavirus replicative enzymes with the ultimate objective of identifying suitable targets for molecules that can inhibit their function and thereby serve as antivirals.

## 2. The alphaviruses as human pathogens

Ten of the arthropod-borne alphaviruses are considered to be of significant importance in terms of public health. Indeed with the recent emergence of chikungunya fever (see later) as a major human disease in Asia and potentially globally, the alphavirus profile has been significantly raised. Alphaviruses that circulate in the Old World most commonly cause febrile illnesses and painful arthralgias or polyarthralgias, particularly in the small joints. A characteristic macular-papular rash often appears 3–5 days after illness onset. In severe cases the joints are swollen and tender, and rheumatic signs and symptoms may persist for weeks or months following the acute illness. In general, infections with Old World alphaviruses such as CHIKV, or O'nyong nyong virus (ONNV) in Africa/Asia, Sindbis virus (SINV) and closely related viruses (Ockelbo, Whataroo) which are widespread throughout the Old World, or Ross River (RRV), and Barmah Forest virus (BFV), which are confined to Australia, are rarely fatal and only infrequently result in encephalitic disease (Lewthwaite et al., 2009).

In contrast to these Old World diseases the New World alphaviruses VEEV, Eastern equine encephalitis virus (EEEV), and Western equine encephalitis virus (WEEV) present a different epidemiological and clinical picture. VEEV is one species in the VEE

antigenic complex, which is divided into six distinct antigenic subtypes (Walton and Grayson, 1988; Young, 1972; Young and Johnson, 1969). Subtypes IAB and IC are associated with major epidemics and equine epizootics during which equine mortality due to encephalitic encephalitis rose from 1936 to 1985, a major outbreak in Venezuela and Colombia, was associated with the VEEV subtype IC. This epidemic resulted in roughly 100,000 human cases, with more than 300 fatal encephalitis cases (Diaz et al., 1997). Other epidemics indicate that VEEV still represents a serious public health problem (Weaver et al., 1996). In humans, whilst the overall mortality rate is low (<1%), neurological disease, including disorientation, ataxia, mental depression, and convulsions, can be detected in up to 14% of infected individuals especially children (Johnson and Martin, 1972). Neurological sequelae in humans are also common (Leon, 1975). However, most human infections present as a non-specific febrile illness or aseptic meningitis. In rare cases, the fever and headache may progress through nausea and vomiting to coma and/or delirium and coma with seizures, impaired sensorium, and paralysis being commonly observed. The severity of neurologic involvement and sequelae is greater with decreasing age.

Horses are more susceptible than humans to neurological disease caused by these VEEV subtypes IAB and IC, but are considered to be dead-end hosts for EEEV and WEEV. Moreover, veterinary vaccines are available to reduce the risk of clinical disease. EEEV and WEEV are widespread throughout the eastern and western regions of North America, including Canada, and both are also found in South America and Cuba. In North America, they are transmitted to horses by infected ornithophilic (bird-biting) mosquitoes that thrive in wetland habitats. Highlands J virus (HJV), a close relative of WEEV, is not known to be pathogenic for humans but appears to be an important pathogen of several domestic bird species. VEEV also causes encephalitic disease in horses and, occasionally, humans bitten by mosquitoes normally associated with the horses (Weaver, 2005; Weaver and Barrett, 2004; Weaver et al., 1997). The natural life cycle of VEEV involves small mammals, particularly rodents in forest environments more frequently found in South America.

Other closely related alphaviruses are recognised in the Americas but in most cases they are not known to cause disease in humans or animals.

### 3. Molecular epidemiology and biogeography

#### 3.1. Evolutionary origins of the alphaviruses

In 1988, nucleotide sequence comparisons of several alphaviruses revealed that VEEV was a recombinant virus that had apparently arisen through mixed infection of cells by ancestral EEEV-related and SINV-related viruses (Hahn et al., 1988). Subsequent phylogenetic analyses confirmed this interpretation (Gustafson et al., 1990) and it was estimated that recombination had occurred prior to the divergence of EEEV to produce the extant South American lineages (Weaver et al., 1993). These observations were important milestones in our understanding of alphavirus diversity and related an interesting issue that remains to be satisfactorily resolved, viz., the geographic origin of the arthropod-borne viruses in the genus *Alphavirus*.

Phylogenetic trees based on alphavirus sequences that include the envelope (E1, E2) genes are incongruent with those based solely on non-structural gene sequence. All trees based on E1 gene sequence show that SINV, an Old World virus, diverges with the WEEV-complex viruses, i.e. New World viruses (Fig. 2a), whereas the other New World equine encephalitis viruses, i.e. EEEV and VEEV diverge independently of the WEEV/SINV complex and also independently of the indigenous Old World viruses that include Semliki Forest virus (SFV), Ross River virus (RRV) and CHIKV. However, trees based on non-structural, or/and capsid genes, show that both SINV and the antigenically closely related New World virus, Aura virus (AURAV) diverge from the New World viruses and are included in a clade of Old World alphaviruses that contain Bebaru virus (BBRV), Getah virus (GETV), ONNV, ONNV and other related viruses (Fig. 2b). In other words, in trees based on non-structural genes, SINV and AURAV diverge independently from the WEEV-complex viruses which are now seen to have diverged with EEEV and VEEV.

Another important observation is that trees based on either E1 or non-structural genes show that the New World alphaviruses, Mayaro virus (MAYV) and Una virus (UNV), always cluster with the Old World alphaviruses, RRV, SFV, GETV in the SFV antigenic complex, confirming that transoceanic alphavirus introductions must have occurred, as previously proposed (Powers et al., 2001; Weaver et al., 1997). In the case of MAYV the supposition of transoceanic introductions is also supported by the evidence that this New World virus causes arthritic diseases in humans, as is characteristic of the Old World alphaviruses, rather than encephalitic disease as typified by New World viruses such as EEEV and VEEV (Poidinger et al., 1997; Russell, 1998). Weaver et al. (1997) proposed that these alphavirus dispersal patterns could be most readily explained if the origin of these viruses was the New World. However, in order to support this argument, it was necessary to propose that several transoceanic crossings (i.e. at least three) must have taken place, in both directions, i.e. westwards and eastwards (Powers et al., 2001). Moreover, it was estimated that recombination, as seen in WEEV and closely related descendant viruses, is likely to have occurred between 1300 and 1900 years ago (Weaver et al., 1997).

Assuming this to be a reasonable estimate for the time of the recombination event, and assuming a New World origin for the alphaviruses, it would have been necessary for an ancestral SINV-related virus to be present in the New World, either by evolutionary origination or by introduction from the Old World. This virus would then have to encounter an ancestral EEEV-related virus in the same ecological habitat in the New World and then produce mixed infections in rodents, or other animal species such as birds. More-

over, before or after this recombination event, it must also be assumed that one or more of these ancestral alphaviruses (not the recombinant virus) was then dispersed to the Old World, for the alphaviruses to establish in the new environments and to continue their global dispersal. Whilst this scenario may be theoretically possible, it is hard to imagine that these transoceanic movements would occur very frequently more than 1000 years ago, since trade if any commercial movement of ships took place during the first millennium AD.

If one argues that birds could have moved the viruses across the oceans more than 1000 years ago, then one is immediately obliged to ask why is this not a common occurrence today? On the other hand, during the past 500–600 years, transoceanic crossings by ships for commercial and/or immigration and slave-trading purposes have been the major factor for the introduction into the Old World of many different Old World mosquito species, including *Aedes aegypti*, the *Culex pipiens* complex, *Aedes albopictus* (Calder and Laird, 1994) and African arboviruses including Yellow fever virus, Dengue virus, St. Louis encephalitis virus, West Nile virus and Chikungunya virus (reviewed in Bloom, 1993; de Lamballerie et al., 2008b; Gould et al., 2003; Lounibos, 2002; Strobe, 1951; Tabachnick, 1991; Tatem et al., 2006). Whilst in the modern era, introductions do occur in the reverse direction (New World to Old World), they are usually importations of recognised arboviruses by viraemic individuals returning to their country of origin, following a business or leisure trip in the Americas. In temperate regions of the Old World, these individual introductions from the New World rarely if ever result in the establishment of endemic/epidemic arboviruses. There is a detailed record of YFV being introduced into South Wales (United Kingdom) from Cuba; the virus caused a small localised outbreak of yellow fever, but rapidly disappeared from circulation (Smith and Gibson, 1986) presumably, because the habitat lacked a suitable vector for YFV to become established.

The alternative possibility, i.e. that the alphaviruses originated in the Old World, is also recognised (Leveridge et al., 2004; Powers et al., 2001; Weaver et al., 1997). In Africa, a wide range of alphaviruses such as SFV, SINV, CHIKV, ONNV and others circulate in geographically overlapping environments, where they have relatively similar ecological requirements. Thus, the possibility of ancestral alphaviruses in Africa causing mixed infections of vertebrates and recombining to produce an ancestral lineage of a virus such as WEEV, is at least plausible. Secondly, during the centuries of intensive commercial trading between Africa and the Americas, some or many of these alphaviruses could have been carried to the Americas, in the way that many flaviviruses and mosquitoes were transported to the New World (Bloom, 1993; Bryant et al., 2007; Gould et al., 2003, 2001; Lounibos, 2002; Takashik, 1991). Under this scenario, transoceanic alphavirus dispersal would not need to occur in both directions. Moreover, the extremely low probability of a mixed infection occurring between an enzootic New World virus and an Old World virus introduced to the Americas more than 1000 years ago, no longer needs to be explained. In addition, the geographically wide distribution of the alphaviruses in natural cycles in the Old World is entirely consistent with Old World anthropological distribution and commerce and bird migratory patterns. Clearly more alphaviruses need to be isolated and studied in detail to fill the gaps in our knowledge and to resolve the question of how these viruses have evolved and dispersed during the past few millennia. However, the ideas related above appear to favour an Old World origin for the alphaviruses that are currently circulating.

#### 3.2. Alphavirus emergence in the New World

In the New World, prior to late 2004 or early 2005, alphaviruses were known to cause spasmodic human outbreaks in different geographic regions of the world. For example, in equatorial South

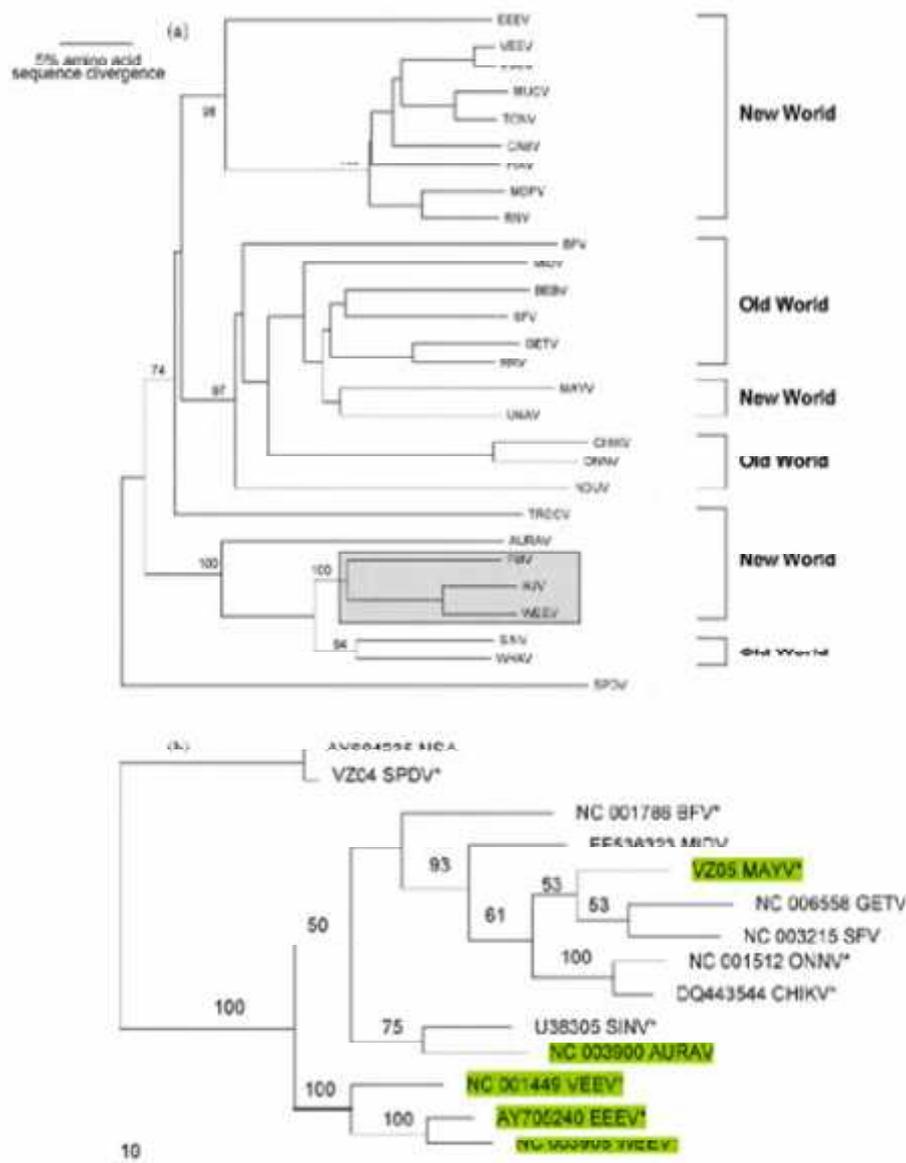


Fig. 2. Phylogenetic analyses of selected alphaviruses. (a) Midpoint rooted tree generated using partial E1 envelope glycoprotein amino acid sequences and the neighbour joining program implemented in PAUP 4.0 (Swofford, 1998). Numbers indicate bootstrap values generated using 1000 resamplings. Scale indicates 5% amino acid sequence divergence. Gray box shows recombinant alphaviruses that were derived from ancestors of SAUV and CHIKV. Shaded backgrounds indicates recombinant viruses. (b) Most parsimonious alphavirus NSP4 tree, rooted with NSV/SPDV outgroup. Bootstrap percentage numbers on nodes with 50% or more support from 1000 resamplings, are indicated. Asterisk (\*) indicates studies in VIZIER; shaded background indicates New World viruses.

and Central America. VEEV exists in two epidemiological forms: (i) enzootic viruses that are transmitted continuously in sylvatic habitats between mosquitoes and rodent reservoir hosts and (ii) epidemic/epizootic viruses (Weaver and Barrett, 2004; Weaver et al., 2004), that emerge periodically to cause outbreaks involving large numbers of humans and horses (Weaver et al., 1996). A Mexican equine epizootic, involving a proven epizootic vector *Ochlerotatus* (formerly *Aedes*) *taeniorhynchus*, serves as an excellent example. When compared with closely related enzootic strains, VEEV isolates from infected horses exhibited significantly greater infectivity for the vector that was associated with horses, suggesting that adaptation to the appropriate vector contributed to disease

emergence. It was subsequently demonstrated that a Ser-Asn substitution in the E2 gene was the sole determinant of the increased vector infectivity (Brault et al., 2004). Similar patterns of enzootic and epizootic behaviour have also been observed with EEEV and WEEV although these viruses are not known to show increased patterns of virulence during these outbreaks.

### 3.3. Recent emergence of Chikungunya virus

In the Old World, spasmodic febrile/arthritis outbreaks are associated with infections due to SINV, CHIKV, ONNV, RRV, or BFV in Africa, and/or Europe, Asia, South East Asia/Australasia. Prior

Table 1  
Number of non-structural alphavirus protein targets sequenced expressed and under further analysis in the VIZIER project.

	nsP1	nsP2	nsP3	nsP4	Crystallized proteins	Crystal structures
Aura virus				1		
Banmah Forest virus	2	16	4	4		
Chikungunya virus (2 strains)	6	10	9	11	2	3
-----	4	--	-	-	-	-
Mayaro virus	0	14	4	3	1	
Oryong-nyong virus	2	16	5	15		
Salmon pancreatic disease virus	0	3	0	1		
Semliki Forest virus	1	4	3	1	1	
-----	4	--	-	-	-	-
Venezuelan equine encephalitis virus	2	15	4	4	1	2
Western equine encephalitis virus	2	14	4	2	1	
Total (227)	13	127	41	46	7	6

to 2005, these alphaviruses were considered to be of relatively minor importance by most government health departments, largely because they were associated with localized outbreaks involving relatively few individuals and in general they were considered to be insignificant agents of encephalitic disease or fatal infections. Moreover, clinical misdiagnosis of many of these alphavirus infections in the dengue endemic locations where they circulate is probably another reason that they have been underappreciated as causes of febrile illness. However, this attitude changed, from 2005, onwards when CHIKV unexpectedly arose as a major epidemic human pathogenic arbovirus throughout, central and southern Africa, the islands of the southern Indian Ocean, India, Indonesia and Malaysia. As the result of these spreading epidemics, CHIKV is now frequently being introduced into other regions of Asia, Europe, Australia and the Americas by travellers returning from CHIKV epidemic areas of Asia. Indeed in Northern Italy the introduced virus became established in *A. albopictus* and caused localised outbreaks of chikungunya fever (Rezza et al., 2007). Although case fatality rates resulting from CHIKV infection are considered to be low, the very large numbers of clinical cases in Asia (now unofficially estimated to be millions) have almost certainly resulted in significantly more mortality than is currently recognised, particularly in countries where health services and recording procedures are poorly developed. Moreover, it has now become apparent that thousands of excess deaths, with many involving neurological disease, have accompanied recent CHIKV outbreaks (Jisseran et al., 2006; Mavalankar et al. 2008; Rubin et al. 2008). Additionally recent studies on children in India, reported that at least 14% of CHIKV infections may result in neurological complications (Lewthwaite et al., 2009).

Until 2005 CHIKV was usually described as a virus that circulated in a natural cycle amongst forest-associated simians and sylvatic mosquito species (*Aedes furdifer*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes taylori*), in the central and west African jungles, spasmodically causing outbreaks of varying size and intensity amongst the local populations living near the jungles. Human outbreaks were associated with domestic mosquito species such as *A. aegypti* and it has always been assumed that the virus is transmitted down the chain of sylvatic/domestic mosquito species via humans and simians that come into contact with the virus at the edges of the jungles and in the nearby local villages/towns (Gould and Higgs, 2009). CHIKV was also known to cause spasmodic outbreaks in many parts of Asia, although a forest reservoir cycle has never been identified in Asia (Powers and Logue, 2007). However, as indicated above, this spasmodic pattern of outbreaks changed dramatically from 2005 onwards, when a major CHIKV fever epidemic was first identified on La Réunion island in the southern Indian Ocean (Charrel et al., 2007; de Lamballerie et al., 2008b; Schuffenecker et al., 2006). Epidemics were also reported on many neighbouring islands and the virus dispersed rapidly to India, and south-east Asia (de Lamballerie

et al., 2008b). This virus is continuing to cause major epidemics throughout Asia involving millions of humans.

It is now considered possible that CHIKV could spread even more widely, reaching and becoming firmly established in Europe, and tropical America. This potential global emergence of CHIKV appears to be at least partly attributable to its adaptation to the Asian tiger mosquito *A. albopictus* (Calder and Laird, 1994; de Lamballerie et al., 2008b; Schuffenecker et al., 2006; Tsetsarkin et al., 2007), which has dispersed widely in the past two decades. These conclusions were derived from a combination of genomic, phylogenetic, and vector transmission studies, from which it was conclusively demonstrated that the adaptation of CHIKV to high vector competence in *A. albopictus* resulted directly from the substitution of the amino acid alanine by valine at position 226 (A226V) in the envelope gene (E1) of the virus (Schuffenecker et al., 2006; Tsetsarkin et al., 2007). Even more surprisingly, based on phylogenetic evidence and local knowledge of CHIKV epidemiology, it is clear that this selective adaptation for the tiger mosquito has occurred on several independent occasions (de Lamballerie et al., 2008b).

The global invasion by *A. albopictus*, mainly facilitated by tyre shipments, is regarded as the "third wave" of human aided dispersal of mosquito vectors of human disease, following the previous cosmopolitan spread of *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus* (Benedict et al., 2007; Calder and Laird, 1994). *A. albopictus* is now established in virtually all tropical, sub-tropical and southern temperate regions (Lounibos, 2002). Moreover, local species of *A. albopictus* in Florida, USA have now been shown to be susceptible to infection by CHIKV and competent to transmit this virus (Reiskind et al., 2008). Thus, it is almost certainly only a matter of time before CHIKV invades the Americas, being introduced by infected humans returning from endemic areas of Africa or Asia, possibly causing greater problems in the tropical regions due to the behavioural advantages of *A. aegypti*. Clearly, there is a pressing need for effective antivirals and vaccines with which to develop CHIKV disease control strategies.

#### 4. Studies on the active domains of alphavirus replicative enzymes

Although crystallization of alphavirus proteins provided early data concerned with the mechanism of virus entry into susceptible cells (Lescar et al., 2001) progress has been much slower in the case of non-structural proteins. The major difficulty to overcome has been the problem of expressing suitable recombinant target proteins. This is reflected by the fact that the literature reports the structures of only two non-structural protein domains, viz., the amphipathic helix of nsP1, a 20 amino acid peptide (Lampio et al., 2000) and the protease-methyltransferase subdomain of nsP2 (Russo et al., 2006). Therefore, alphavirus nsP enzyme domains were identified as potentially important targets for structural studies in VIZIER, and Table 1 summarises the current numbers and

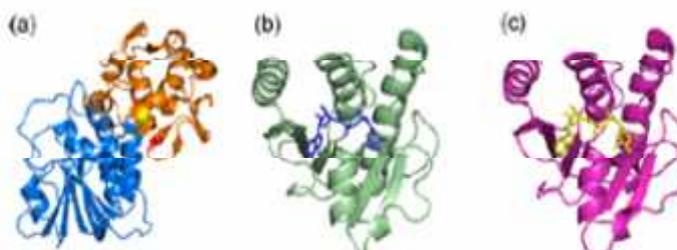


Fig. 3. Known structures of alphavirus nsP2 (protease) and nsP3 (macro domain). (a) Cartoon representation of the VEEV protease (C-terminal part of nsP2) (Russo et al., 2006). The domain coloured in orange corresponds to the catalytic domain where the catalytic cysteine and histidine are highlighted respectively in yellow and red. (b) Cartoon representation of the CHIKV macro domain (in green) complex with ADP-ribose (in blue). (c) Cartoon representation of the VEEV macro domain (in pink) complex with ADP-ribose (in yellow) (Malet et al., 2009).

status (in terms of protein solubility and crystal formation) of expressed alphavirus nsP targets. The decision to produce and study at the structural level, non-structural protein domains active in viral replication has proved to be highly beneficial since genomics progressed at a rapid rate, and most of the predicted (identified) structural folds appear to be original (Fig. 3).

Four non-structural proteins (nsP1, 2, 3 and 4), corresponding to the four domains resulting from maturation (post-translational processing by protease enzymatic function of nsP2) of the polyprotein (Fig. 1), are associated with the virus replication complex. They are synthesized as a short polyprotein nsP123, the translation termination of which is terminated at a UGA stop codon, found in most alphavirus genomes, and located near the junction between nsP3 and nsP4 (Fig. 1). Alternatively, the ribosome can “read-through” this codon, using a rare suppressor tRNA to produce the complete nsP1234 polyprotein (Li and Rice, 1989) which is subsequently processed to the mature products in regulated sequential order (Vasiljeva et al., 2003). The current state of our knowledge concerning the structural and enzymatic properties of these four processed non-structural alphavirus proteins is summarised in Table 2.

#### 4.1. Alphavirus nsP1 protein

The indication that the nsP1 gene carries RNA methyltransferase activity was derived using a SINV nsP1 mutant engineered to allow replication in insect cells depleted of methionine (Mi et al., 1989). This finding was extended in studies in which *in vitro* methyltransferase activity of the SINV nsP1 (Mi and Scollar, 1991) and the SFV nsP1 (Laakkonen et al., 1994) was demonstrated. The active site residues of MT were identified by comparative sequence analysis which demonstrated that this enzyme is conserved in many virus families forming an alpha-like supergroup (Rozanov et al., 1992). The substrate of the reaction is GTP, which becomes methylated at its N7 position ( $m^7$ GTP). The product  $m^7$ GTP is then covalently bound to nsP1 to generate a covalent  $m^7$ GMP-nsP1 adduct and

inorganic pyrophosphate (Ahoia and Kääriäinen, 1995). However, quantal transfer of the  $m^7$ GMP onto RNA remains to be demonstrated. nsP1 activity is dependent on membrane association (Ahoia et al., 1999). This interaction is mediated by an amphipathic helix located in the middle of the nsP1 sequence (Spuul et al., 2007). This helix contains hydrophobic amino acids that can interact with acyl groups of the membrane and a cluster of positively charged residues that contact the phospholipid polar heads (Lampio et al., 2000). It remains unclear if palmitoylation of several cysteines contributes to membrane binding (Ahoia et al., 2000), but this post-translational modification plays a role in the cellular localization of the replication complex (Laakkonen et al., 1996).

#### 4.2. Alphavirus nsP2 protein

The N-terminal region of the nsP2 gene was predicted to encode a helicase domain (Gorbalenya et al., 1988; Hodgman, 1988) that was later classified as the helicase Superfamily 1 (Gorbalenya and Koonin, 1993; Singleton et al., 2007). Using *in vitro* tests, the nsP2 gene of SFV exhibits nucleoside triphosphatase activity utilizing GTP and ATP (Räikkönen et al., 1994) and stimulated by RNA. This activity is stimulated in the presence of RNA. nsP2 could thus act at least at two stages in the infected cell. Firstly, as with the NS3 protein of flaviviruses, the nsP2 nucleotide triphosphatase may produce 5 diphosphate mRNA, the expected final acceptor of the nsP1-mediated quantal transfer reaction catalysed by nsP1 (Vasiljeva et al., 2000). Secondly, the nsP2 ATPase activity is believed to be necessary to fuel RNA helicase activity. The dsRNA unwinding is magnesium-dependent in SFV (Gomez de Codrón et al., 1999). The C-terminal region of nsP2 is a cysteine protease which is responsible for viral polyprotein processing (Strauss et al., 1992; Vasiljeva et al., 2001).

Structural analysis of the VEEV nsP2 C-terminal region revealed two distinct domains (Russo et al., 2006). The first, adopting an original  $\alpha/\beta$ -fold very distantly related to that of papain-like proteases, whose two principal catalytic residues, a cysteine and a histidine, are

Table 2  
Summary of current enzymatic and structural data of the alphavirus proteins nsP1, nsP2, nsP3 and nsP4.

	nsP1	nsP2	nsP3	nsP4
Structural data	Yes (partly) (Spuul et al., 2007)	No	Yes (Russo et al., 2006)	Yes (Malet et al., 2009)
Enzymatic data	Yes (partly) (Ahoia and Lampio, 1999)	Yes/yes (Räikkönen et al., 1994)	Yes (Vasiljeva et al., 2000)	No
Inhibition data	Yes (Lampio et al., 1999)	No	Yes (Pastorino et al., 2008)	No

uniquely located in the N-terminal subdomain. The second domain has a classical methyltransferase fold although it does not exhibit methyltransferase activity. Structural and biochemical data on the proteases of VEEV and CHIKV nsP2 support the hypothesis that this second domain contributes to substrate presentation to the protease active site (Pastorino et al., 2008; Russo et al., 2006). This structural arrangement may also regulate protease activity through possible RNA binding.

#### 4.3. Alphavirus nsP3 protein

The N-terminal region of nsP3 was initially described as a conserved domain with an unknown function (X domain) in large replicative proteins of alphaviruses, coronaviruses and rubriviruses (Corkley et al., 1991). This 199 amino acid domain belongs to a large protein family including more than 1000 domains from all kingdoms of life, dubbed the macro domain family after a unique domain in the human macroH2A1 histone (Perhson and Fuji, 1998). This histone association was found only in a small fraction of domains in the family. Several members of this family were shown to possess a diphosphate-ribose 1'-phosphate activity and can bind ADP-ribose (Kumaran et al., 2005; Stull et al., 2005). For some others, as exemplified by the infectious Brucella abortus protein X domain, ADP-ribose binding was not revealed in vitro (Plotrowski et al., 2009). The macro domains of VEEV and CHIKV are very similar. Their structures were found to resemble the homologous *Escherichia coli* domain more closely than the eucaryotic macro domains (Malet et al., 2009).

Both VEEV and CHIKV macro domains have a specific affinity for ADP-ribose, via a conserved aspartic acid and they also display diphosphate-ribose 1'-phosphate activity. A positively charged amino acid patch also enables the binding of oligonucleotides such as poly-ADP-ribose (PAR) or RNA, but the common determinant of substrate binding is a conserved adenosine 5'-monophosphate binding site. It has now been shown that mutation of amino acids 10 and 24 from asparagine to alanine in the ADP-ribose binding region of the SINV macro domain impairs replication and viral RNA synthesis particularly in mouse neurones without any alteration in poly(ADP-ribose) binding (Suh and Chiba, 2008). Moreover, mutation at position 10 had the greatest effect and caused nsP3 instability in neurones, decreased SINV-induced death of mature, but not immature neurones, and attenuated virulence in 2 weeks old, but not 5-day-old mice. Thus, the nsP3 macro domain appears to be significantly involved in both SINV replication and age-dependent susceptibility to encephalomyelitis. As a part of the structural genomics section in VIZIER, we have also determined the repeat structure of the EEEV macro domain. The level of amino acid conservation of the entire nsP3 when compared with VEEV and EEEV is 43% identity. However, the structural model for EEEV is still under refinement, and was therefore not included in our most recent publication (Malet et al., 2009). Sequence analysis of the C-terminal region of the nsP3 protein does not suggest any putative enzymatic activity. This region encodes a cluster of up to 16 serines and threonines that can be phosphorylated (LaStarza et al., 1994; Li et al., 1990) although it is not catalysed by nsP3 (Vihinen et al., 2001). Its decreased phosphorylation in SINV produces less minus strand RNA compared to wild type (Dé et al., 2003). Moreover, variants of SFV that are poorly phosphorylated or have deletions in this non-variable domain exhibit a low viral pathogenicity profile in mice and show reduced viral RNA synthesis in cell culture (Galbraith et al., 2005; Vihinen et al., 2001). The absence of the nsP3 C-terminus also alters SFV neurovirulence (Tuittila et al., 2000). The C-terminal region of nsP3 has specific sequence features of natively unfolded proteins, suggesting that this domain is involved in transcription regulation as proposed previously (Wang et al., 1994).

#### 4.4. Alphavirus nsP4 protein

The alphavirus nsP4 contains a conserved GPP motif and is considered to be the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (Kamer and Argos, 1984). It is believed that this protein synthesizes both negative- and positive-strand RNAs. In SINV, the switch between the production of antisense RNA to genomic and subgenomic RNA is mediated by processing of the nsP123 region of the polyprotein (Lemm et al., 1998, 1994; Shirako and Strauss, 1994). In vitro, this activity has been reported to be sequence-specific (Lemm et al., 2009). A peptide sequence containing two key arginines involved in promoter sequence recognition to initiate the synthesis of subgenomic RNA (Li et al., 2004). The N-terminal region of nsP4 is poorly conserved and natively unfolded. It could be involved in the recruitment of RNA or protein partners. Also, nsP4 does not replicate DNA. An N-terminally truncated version of SINV nsP4 carries out terminal adenylyltransferase (TATase) activity that might be involved in maintenance of the 3' poly A tail (Tomar et al., 2006). Very recently, RdRp activity was demonstrated in vitro using a purified full-length SINV nsP4 protein (Rubak et al., 2009).

### 5. Progress towards therapy and prevention

Chikungunya fever commonly presents as a painful febrile illness that is quite often accompanied by relapsing and incapacitating polyarthralgia that may persist for several months. During the past 4–5 years, CHIKV has dispersed widely throughout Africa and Asia causing morbidity amongst millions of infected patients. However, this may be only the tip of the iceberg because the two most important vectors of this virus, *A. aegypti* and *A. albopictus*, are continually expanding their geographic distribution and density amongst domestic and peridomestic human populations. Thus it is the strongly held belief that CHIKV will spread even more widely, and quite possibly into the Americas, during the next few years. There are currently no recognised antiviral therapies or human vaccines with which to control infections due to CHIKV.

#### 5.1. Search for antiviral drugs

Failure to develop approved antiviral therapeutic agents or vaccines has been particularly exposed during the recent outbreaks of CHIKV in the Indian Ocean. Thus patient treatment has been based on non-salicylate analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs (Paloux et al., 2007). However, the elaboration of mouse (Couderc et al., 2008; Ziegler et al., 2008) and non-human primate models (Roussel et al., 2007) together with antivirals currently undergoing clinical trials, and new approaches involving natural products of plants (Li et al., 2007) provide the stimulus for improving development of antiviral candidates.

##### 5.1.1. Chloroquine

Chloroquine was first reported to inhibit SINV and SFV infectivity in vitro more than 35 years ago (Cassell et al., 1984; Coombs et al., 1981; Malanovic et al., 1982; Indict, 1980; Shimizu et al., 1977) but studies in mice suggested that the drug might enhance viral replication and aggravate the disease (Maheshwari et al., 1991). Recent research on the efficacy of Chloroquine has focused on the dosage used to treat acute CHIKV infections (de Lamballerie et al., 2008a; Savarino et al., 2007). Chloroquine phosphate has also been used to treat chronic chikungunya arthritis (Brighton, 1984) by utilising the anti-inflammatory properties of the molecule, rather than possible antiviral effects. Based on experiments in cell culture, results comparable with those obtained using CHIKV, were also observed with the SARS coronavirus. Chloroquine was therefore proposed as a potential antiviral molecule for the treatment of humans infected

with the SARS coronavirus (Keyaerts et al., 2004; Leyssen et al., 2006).

To advance the studies with Chloroquine and CHIKV, a double blind placebo-controlled randomized trial (see <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00391313>) (de Lamballerie et al., 2008a; Leyssen et al., 2006) was conducted on Réunion Island (Indian Ocean). No statistical difference was observed between the Chloroquine and placebo groups, either in mean duration of febrile arthralgia or rate of decrease of viraemia (between day 1 and day 3). At day 200 post-infection Chloroquine-treated patients declared more frequently ( $p < 0.01$ ) that they still suffered from arthralgia than patients who had received the placebo. However, the number of patients included in the study was too small to draw definitive conclusions regarding the efficacy of the Chloroquine treatment. Recent experiments in mice (Mason *et al.*, 2011) also failed to identify a statistically antiviral effect of Chloroquine following experimental infections and similar doses of Chloroquine (Le Grand et al., manuscript in preparation). Thus, the use of Chloroquine to treat CHIKV-infected patients does not appear to be justified.

#### 5.1.2. Quinine

The antimalarial drug, Quinine, inhibits replication of CHIKV *in vitro*. Quinine appears to be a more likely candidate for antiviral therapy against CHIKV because the 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) value is much lower than that of Chloroquine (0.1 g/ml for Quinine versus 1.1 g/ml for Chloroquine, using Vero cells and 4–162 cell culture infectious doses ( $CCID_{50}$ )). Also, in contrast with Chloroquine, resistant mutants were obtained by growing CHIKV in increasing concentrations of Quinine. The mutations were detected in the nsP1 protein, suggesting impairment of function of the viral guanylyltransferase enzyme (Yokoi, personal observation). This region of nsP1 has also been indirectly related to methyltransferase activity in SINV isolates (Laakkonen et al., 1994; Mi et al., 1989; Mi and Stoiljar, 1991; Wang et al., 1996) which has been shown to be an essential component of CHIKV pathogenicity *in vivo* (Zhou et al., 2009). Thus, the alphavirus nsP1 might prove to be a good target for antiviral therapy.

#### 5.1.3. Ribavirin

Ribavirin shows wide *in vitro* inhibitory activity against RNA viruses with different modes of action depending on the virus (Leyssen et al., 2006). In some cases it inhibits IMP dehydrogenase depleting cellular GTP pools. In others it is used as a non-canonical substrate for RNA synthesis introducing numerous mutations whose accumulation may lead to virus inactivation due to error catastrophe (Crotty et al., 2001; Severson et al., 2003). In the case of some arenaviruses ribavirin 5-tri-phosphate interacts with the viral polymerase (Sun et al., 2007). It was also tested as an aerosol for the treatment of paediatric Respiratory Syncytial Virus infections but was not approved and this method has now been discontinued. Ribavirin is used in combination with alpha-interferon for the treatment of hepatitis C virus (HCV) infection but the mechanism of action is multifactorial. The predominant direct mechanism by which ribavirin exerts its antiviral activity *in vitro* against flaviviruses and paramyxoviruses is mediated by inhibition of IMP dehydrogenase (Leyssen et al., 2005), because viral RNA synthesis requires a high GTP concentration, and also because resistance mutations can be isolated that map on the NS5b polymerase (Young et al., 2003). An indirect mechanism via decreasing the GTP pools may also be important (Zhou et al., 2003).

In the case of alphaviruses, resistance to ribavirin was first reported following studies with SINV (Scheidel et al., 1987). Resistant mutants were mapped to the nsP1 protein (Scheidel and Stoiljar, 1991). It was proposed that the mutant encoded an altered RNA guanylyltransferase enzyme with increased affinity for GTP, enabling it to replicate in cells with reduced levels of GTP. This is

consistent with the hypothesis that ribavirin acts mainly as an IMP dehydrogenase inhibitor against alphaviruses.

#### 5.1.4. Interferon and ribavirin

A combination of interferon-alpha and ribavirin shows a synergistic effect on the *in vitro* inhibition of CHIKV (Briolant et al., 2004). However, for clinical application it is expensive and requires parenteral injection, making it unsuitable for large-scale use during epidemics. Human infection with CHIKV appears to induce immunological dysfunction. However, interferon usually boosts the immune response. Therefore caution in its usage is recommended until more extensive non-human primate models have been studied. Pegylated alpha-interferon appears to be an effective treatment against infection with VEEV and has profound effects on the host immune response to infection (Lukaszewski and Brooks, 2000). Thus, it might be justified to test pegylated alpha interferon on CHIKV and other pathogenic alphaviruses.

#### 5.1.5. Inhibitors of alphavirus entry and maturation

Molecules that inhibit alphavirus entry into susceptible cells have also been investigated with promising results. A study recently reported the possible inhibition of the replication of VEEV using polyclonal antibodies to laminin-binding protein (Bondarenko et al., 2004). CHIKV infection of cultured human cells was also shown to be inhibited by impairing the maturation of the CHIKV E2 surface glycoprotein using furin inhibitors (Ozden et al., 2008). A similar observation was previously reported using the flavivirus Tick-borne encephalitis virus (Stadler et al., 1997).

#### 5.1.6. Carbodine

Recent studies on the carbocyclic analogue of cytidine (cyclopentylcytosine or carbodine) suggest that it has potential as an antiviral agent against VEEV (Jilander et al., 2008). Carbodine was shown to inhibit cellular cytidine triphosphate (CTP) synthetase, which converts UTP to CTP, resulting in indirect inhibition of virus replication through reduction of CTP pools (de Clercq et al., 1990). In cell culture, carbodine is a broad-spectrum antiviral, with activity against several unrelated viruses (Andrej and De Clercq, 1990; Neyts et al., 1996) although cytotoxicity has been demonstrated. The addition of exogenous cytidine (cyd) or uridine results in reversal of antiviral activity of carbodine in various cell lines (Andrej and De Clercq, 1990). The natural nucleosides are dextrorotatory (d), but both d- and laevorotatory (l)-analogues can inhibit metabolic enzymes (Gumina et al., 2002) and the d-enantiomer may show reduced cytotoxicity. Accordingly, the d-enantiomer was recently used to test the inhibitory qualities of carbodine against VEEV-challenged mice (Jilander et al., 2008). Increased survival rates, increased average time to death and reduced brain virus titres were observed when carbodine treatment was followed by challenge of the mice with the attenuated vaccine strain (TC83) of VEEV. Evidence of inhibitory effects was also detected if the carbodine was administered up to 4 days post-infection.

#### 5.1.7. Small RNA molecules

In common with many other RNA viruses, inhibition of alphavirus replication in cell culture has been demonstrated using interfering RNAs and antisense oligonucleotides. Inhibition of VEEV was observed using a mixture of four short interfering RNAs (O'Brien, 2007), and antisense morpholino oligomers were successfully used for the inhibition of SINV infection, in cell culture and in mice (Paessler et al., 2008) strongly suggesting that similar approaches should be applied to other alphaviruses such as CHIKV. Methods to overcome the difficulties encountered in delivering these antiviral molecules are currently the subject of major research.

### 5.1.8. Plant compounds

Compounds extracted from plants have also shown very encouraging antiviral effects against certain RNA viruses. The seco-pregnane steroid glaucogenin C and its monosugar-glycoside cynatratoside A extracted from *Strobilanthes cusia*, together with three new pentasugar-glycosides of glaucogenin C from *Cynanchum pennatum*, can suppress a range of positive-strand RNA viruses including Tobacco mosaic virus (TMV), and the alphaviruses, SINV, EEEV, and Getah virus in cell culture. Moreover, mice were protected from lethal SINV infections with no adverse effects of the compounds on the infected animals (Li et al., 2007).

### 5.1.9. nsP1 active domains as a target for inhibition

In addition to the research activities described above, recent efforts have focused on the identification of specific inhibitors of viral enzymes involved in replication. Enzyme production processes, activity assays, and structural data are all available, and could therefore provide a basis for inhibitor screening, since nsP1 is the main enzyme involved in RNA capping, an essential step in promoting viral RNA translation, nsP1 is an excellent target candidate for antiviral therapy. SINV and SFV nsP1s can be produced to high levels in *E. coli* or insect cells, and both methyltransferase activity on GTP and guanylyltransferase activity have been tested *in vitro*. Following this strategy, several GTP analogues have been reported to inhibit the two activities with  $K_i$  values below 100 nM (Lampio et al., 2007).

### 5.1.10. nsP2 active domains as a target for inhibition

It has also been demonstrated that helicases are good antiviral targets in flaviviruses (Goodell et al., 2006), picornaviruses (De Palma et al., 2008) and hepaciviruses (Borowski et al., 2002). The helicase region of SFV nsP2 can be expressed in *E. coli* but the protein is unstable after purification, requiring a high salt concentration (Gomez de Cedron et al., 1999). Nevertheless, the protein is active and production yields could be compatible with existing helicase HTP assays using non-radioactive readouts (Boguszewska-Chachulska et al., 2004; Tani et al., 2009). Currently, the protease domain of nsP2 is the most promising target for rational inhibitor screening. This protease is responsible for non-structural polyprotein processing, an essential function for virus replication (Balistreri et al., 2007; de Groot et al., 1990; Mayuri et al., 2008). Inhibitors can be selected through a structure-based method, using the VEEV protease structural data as a template (Russo et al., 2006). This strategy could be combined with enzymatic assays already described for several alphavirus proteases (Zhang et al., 2007), interestingly, leupeptin, a broad-spectrum cysteine protease inhibitor, has no effect on the protease activity of CHIKV nsP2 (Pastorino et al., 2006), suggesting that this protease has structural and functional specificities that could be specifically targeted.

### 5.1.11. nsP3 active domains as a target for inhibition

Structural data and enzymatic properties of macro domains of nsP3 in two alphaviruses have recently been reported (Malet et al., 2009). On the basis of very recently published results (Park and Griffin, 2009), the nsP3 macro domain appears to be significantly involved in both SINV replication and age-dependent susceptibility to encephalomyelitis and therefore may become an appropriate target for the development of antivirals.

### 5.1.12. nsP4 active domains as a target for inhibition

The RdRp is the crucial enzyme in RNA virus replication. Because viral RdRps have no close homologues amongst cellular replicative enzymes, they have been targeted since the earliest times in

the search for antivirals. The first demonstration of antiviral activity provided by a nucleoside analogue (reviewed in Leysen et al., 2000) has contributed significantly to the consideration of replicative enzymes as highly promising targets in the field of antiviral drug discovery and design.

Prior to the commencement of the VIZIER project (Coutard et al., 2009), the alphaviruses had not attracted too much attention in the context of drug discovery. However, as discussed earlier, this situation began to change from 2005 onwards, following the surprisingly large-scale outbreaks of chikungunya fever on many of the inhabited islands of the southern Indian Ocean. Consequently, the recent first demonstration that alphavirus RdRp activity is encoded in the nsP4 gene (Rubak et al., 2009) provides a strong incentive for vigorous studies to identify effective inhibitors of alphavirus RdRps. In alphaviruses, assembly of the multimeric replication complex is required for demonstration of RdRp activity. Thus, *in vitro* assays require at least nsP123 and nsP4 in the reaction mixture, and the assays are only effective if recombinant nsP1 is expressed with the N-terminal fragment (Rubak et al., 2009; Shirako et al., 2003). Whilst experimental conditions for the generation of authentic nsP4 have been defined, recombinant nsP123 is still expressed exclusively in mammalian cells (Rubak et al., 2009), which would prove to be a limitation in the context of HT inhibitor screening. Clearly many problems remain to be resolved.

## 5.2. Antiviral vaccines

An alternative approach to virus disease control involves the use of vaccines. Whilst some are available to immunise horses against VEEV, WEEV and EEEV, and both live and inactivated vaccines have been used to immunise laboratory workers at risk of exposure to encephalitic alphaviruses, there are no licensed human vaccines against alphaviruses. A live-attenuated vaccine against VEEV was first developed in 1961 (Berge et al., 1961) and has been administered to more than 8000 individuals (Alevizatos et al., 1967; Burke et al., 1977; Pittman et al., 1996). As the result of adverse effects in a significant proportion of these vaccinated individuals, an inactivated vaccine was developed (Pittman et al., 1966) and a more promising highly attenuated vaccine (V3526) based on an infectious cDNA clone of VEEV was also developed (Davis et al., 1995; Hart et al., 2000) but concerns over the possibility of reversion to virulence have not been totally allayed. Hence, alternative approaches such as the development of chimaeric viruses with the replicative machinery from SINV, and the structural genes from VEEV are still being pursued (Berge et al., 1961; Paessler et al., 2006). The first attempts to develop inactivated vaccines against CHIKV were reported in 1970 (Eckels et al., 1970). However, these early immunogens have not been developed as licensed vaccines.

Later, a live-attenuated vaccine strain was developed by serial plaque-to-plaque passages of CHIKV (Edelman et al., 2000). This vaccine proved highly immunogenic but some phase II volunteers developed transient arthralgia. At least three different methods are currently under development to produce safe, effective vaccines against CHIKV. One method involves the preparation of purified inactivated virus using methods similar to those that have proved successful for the development of an inactivated vaccine against Tink-borne encephalitis virus (Pavlov et al., 2003). A second method involves the use of cDNA fragments representing the important immunogenic regions of the CHIKV genome (Muthumani et al., 2008). Finally, chimaeric alphaviruses containing the genetic backbone of SINV, TC-83 or a naturally attenuated EEEV strain, and the structural proteins of wild-type CHIKV, have produced promising results in murine efficacy studies (Wang et al., 2008).

## 6. Conclusion

At the commencement of the VIZIER project, alphaviruses were given a relatively low profile because other, apparently more worrisome RNA viruses, in terms of their potential virulence such as SARS coronavirus, avian influenza virus, Nipah virus, rabies virus and West Nile virus were attracting much more attention globally. However, in 2005, the relative level of importance of alphaviruses as a significant public health problem was raised when CHIKV unexpectedly emerged as a major human pathogen in Africa, the Indian Ocean, India and Malaysia. The continuing epidemics of chikungunya fever, which has now lasted for 4 years and shows little sign of abating, has the potential to reach the Americas, where if past history of other invading RNA viruses is predictive, could lead to high levels of human morbidity. Coupled with this prospect and the possibility that as the result of human impact on habitat and global/local distribution of vectors and hosts, other alphaviruses such as ONNV might also emerge to produce much more extensive epidemics than they have done in the past, the search for antivirals to combat these viruses clearly needs to be intensified.

## Acknowledgements

The work reported in this review was supported under the project entitled VIZIER (Comparative Structural Genomics of Viral Enzymes Involved in Replication)—Contract number (2004–511960). Professor Scott Weaver's alphavirus research was supported by National Institute of Health grants U54-AI057156, R01-AI071192 and R01-AI069145.

## References

Ahola, T., Kääriäinen, L., 1995. Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 507–511.

Ahola, T., Kujala, P., Tuittila, M., Broni, T., Laakkonen, P., Hinkkanen, A., Auvinen, P., 2000. Effects of palmitoylation of replicase protein nsP1 on alphavirus infection. *J. Virol.* 74, 6725–6733.

Ahola, T., Lampio, A., Auvinen, P., Kääriäinen, L., 1999. Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. *EMBO J.* 18, 3164–3172.

Alexizatos, A.C., McKenney, R.W., Feigin, R.D., 1967. Live, attenuated Venezuelan equine encephalomyelitis virus vaccine. I. Clinical effects in man. *Am. J. Trop. Med.* 16, 762–768.

Arbovirus replication in vitro. *Antiviral Res.* 14, 287–299.

Balistreri, G., Caldentey, J., Kääriäinen, L., Ahola, T., 2007. Enzymatic defects of the nsP2 proteins of Semliki Forest virus temperature-sensitive mutants. *J. Virol.* 81, 2849–2860.

Beard, M., Levine, D., Mueller, W., Lounibos, L., 1987. Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7, 78–85.

Berge, T.O., Banks, I.S., Tigertt, W.D., 1961. Attenuation of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by in vitro cultivation in guinea pig heart cells. *Am. J. Hygiene* 73, 209–218.

Broom, K.J., 1993. The Mississippi Valley's great yellow fever epidemic of 1878. Louisiana State University Press, Baton Rouge, Louisiana.

Boguszewska-Chachuliska, A.M., Krawczyk, M., Szankiewicz, A., Gozdek, A., Haenni, A.-L., Stokovskaya, L., 2004. Direct fluorometric measurement of hepatitis C virus helicase activity. *FEBS Lett.* 567, 253–258.

Replication by polydonal antibodies to laminin-binding protein. *Voprosi Virusologii* 49, 32–37.

Borowski, P., Schalinaki, S., Schmitz, H., 2002. Nucleotide triphosphatase/helicase of hepatitis C virus as a target for antiviral therapy. *Antiviral Res.* 55, 397–412.

Chen, S.C., 2004. Venezuelan equine encephalitis emergence: enhanced vector infection from a single amino acid substitution in the envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 11344–11349.

Brighton, S.W., 1984. Chloroquine phosphate treatment of chronic chikungunya arthritis. *S. Afr. Med. J.* 66, 243–248.

Briolant, S., Garin, D., Scaramuzza, N., Juan, A., Orange, J.M., 2004. In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon- $\alpha$  and ribavirin combination. *Antiviral Res.* 61, 111–117.

Bryant, J.E., Holmes, E.C., Barrett, A.D.T., 2007. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathog.* 3, e275.

Burke, D.S., Ramsburg, H.H., Edelman, R.J., 1977. Persistence in humans of antibody to subtypes of Venezuelan equine encephalomyelitis (VEE) virus after immunization with attenuated (TC-83) VEE virus vaccine. *J. Infect. Dis.* 136, 354–359.

Caldor, L., Laird, M., 1994. Mosquito travelers, arbovirus vectors and the used tire trade. *Trav. Med.* 10, 12, 3–12.

Caselli, S., Edwards, J., Brown, D.T., 1984. Effects of lysosomotropic weak bases on infection of BHK-21 cells by Sindbis virus. *J. Virol.* 52, 857–864.

Chanak, A.C., Johnson, B.K., Simpson, D.H., 1976. Antigenic relationships of alphaviruses by a simple micro-culture cross-neutralization method. *J. Gen. Virol.* 39, 299–303.

Charrel, R.N., de Lamballerie, X., Raoult, D., 2007. Chikungunya outbreaks—the globalization of vectorborne diseases. *N. Engl. J. Med.* 356, 769–771.

Clark, D.H., Casals, J., 1958. Techniques for haemagglutination and haemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 9, 464–479.

Coombs, K., Mann, E., Edwards, J., Brown, D.T., 1981. Effects of chloroquine and cyclohexan B on the infection of cells by Sindbis virus and vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 37, 1060–1065.

Couderc, T., Chretien, F., Schitte, C., Dissen, O., Brigitte, M., Guivai-Benhassine, F., Tourat, Y., Barau, G., Cayet, N., Schuffenecker, J., Desprès, P., Arentzani-Sardedeia, F., Michault, A., Albert, M.L., Lecuit, M., 2008. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathog.* 4 (2), e29.

Coutard, B., Gorbalenya, A.E., Brujder, E.J., Leonovich, A.M., Poupon, A., De Lamballerie, X., Charrel, R., Gould, E.A., Gunther, S., Norder, H., Klompag, B., Bourhy, H., 2007. A common, but distinct, RNA capping mechanism for all members of the Rubenviridae superfamily. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 100–104.

Tuckerm, P.A., Bolognesi, M., Mattevi, A., Coli, M., Zine, T.A., Aqvist, J., Unger, T., Hilgenfeld, R., Bricogne, G., Neyts, J., La Colla, P., Puerstinger, G., Gonzalez, J.P., Leroy, E., Cambillau, C., Romette, J.L., Canard, B., 2008. The VIZIER project: preparedness against pathogenic RNA viruses. *Antiviral Res.* 78, 37–46.

Coutard, B., de Lamballerie, X., Charrel, R., Norder, H., Klompag, B., Bourhy, H., 2007. A common, but distinct, RNA capping mechanism for all members of the Rubenviridae superfamily. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 100–104.

Davis, N.L., Brown, K.W., Greenwald, G.F., Zajac, A.J., Zaczyn, V.L., Smith, J.F., Johnson, R.E., 1995. Attenuated mutants of Venezuelan equine encephalitis virus containing lethal mutations in the PE2 cleavage signal combined with a second-site suppressor mutation in E1. *Virology* 212, 103–110.

de Clercq, E., Bernaerts, R., Shealy, Y.F., Montgomery, J.A., 1990. Broad-spectrum antiviral activity of carbodine, the carbocyclic analogue of cytidine. *Biochem. Pharmacol.* 39, 319–325.

de Groot, R.J., Hardy, W.R., Shirako, Y., Strauss, J.H., 1990. Cleavage-site preferences of Sindbis virus polyproteins containing the non-structural proteinase. Evidence for temporal regulation of polyprotein processing in vivo. *EMBO J.* 9, 2829–2838.

Dé, I., Fata-Hartley, C., Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., 2003. Functional analysis of nsP3 phosphoprotein mutants of Sindbis virus. *J. Virol.* 77, 13106–13116.

de Lamballerie, X., Boisson, V., Reynier, J.C., Enaut, S., Charrel, R.N., Rahault, A., Rogues, P., Le Grand, R., 2008a. On Chikungunya acute infection and chikungunya fever. *PLoS Pathog.* 4, e275.

de Lamballerie, X., Leroy, E., Charrel, R.N., Tsai, T.K., Higgs, S., Gould, E.A., 2008b. Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *Virology* 475, 33.

De Palma, A.M., Vliegenhart, I., De Clercq, E., Neyts, J., 2008. Selective inhibitors of picornavirus replication. *Med. Res. Rev.* 28, 879–894.

Diaz, I.A., Cardenas, V.M., Daza, E., Bruzon, L., Alcalá, A., De la Hoz, O., Caceres, F.M.G., Aristizabal, G., Martinez, J.W., Reveio, D.F., De la Hoz, F., Boshell, J., Camacho, T., Calderon, L., Olano, Y.A., Villarreal, L.I., Rosell, D., Alvarez, G., Ludwig, G., Tsai, T., 1997. Epidemic Venezuelan equine encephalitis in La Guajira, Colombia, 1995. *J. Infect. Dis.* 175, 828–832.

Eckels, K., Harrison, V.R., Petrick, F.M., 1970. Chikungunya virus vaccine prepared by Tween-Ether extraction. *Appl. Microbiol.* 19, 321–325.

Edelman, R., Tacket, C.O., Wasserman, S.S., Bodison, S.A., Perry, J.G., Mangiavico, J.A., 2000. Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TS-080-218. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 681–685.

Enoch, D., 2007. The evolution of the RNA capping mechanism in the Rubenviridae superfamily of ribose 2'-O-methyltransferases. *Gene*, 382.

Galbraith, S.E., Sheehan, B.J., Atkins, G.J., 2005. Deletions in the hypervariable domain of the nsP3 gene attenuate Semliki Forest virus virulence. *J. Gen. Virol.* 87, 937–947.

Garcia, J.A., Kääriäinen, L., 1999. The RNA capping mechanism in the Rubenviridae superfamily of ribose 2'-O-methyltransferases. *Gene*, 382.

Gomez de Cedron, M., Ehsani, N., Mikkola, M.L., Garcia, J.A., Kääriäinen, L., 1999. RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein nsP2. *FEBS Lett.* 448, 18–22.

Goodell, J.R., Ruiz-Basagotti, F., Forshey, B.M., Shi, P.-Y., Ferguson, D.M., 2006. Identification of compounds with anti-West Nile virus activity. *J. Med. Chem.* 49, 2127–2137.

Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., 1993. Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 419–429.

Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Lomonosov, A.V., Binov, V.M.P.L.A., 1998. A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Lett.* 235, 16–24.

- Gorbatenya, A.E., Koonin, E.V., Lai, M.M., 1991. Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and definition of a conserved region associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses. *FEBS Lett.* 288, 201–205.
- Gorchakov, R., Bena Frolova, E., Sawicki, S., Atshava, S., Sawicki, D., Ilya Frolov, I., 2008. A new role for ns polyprotein cleavage in Sindbis virus replication. *J Virol.* 82, 6216–6231.
- Gould, E.A., de Lamballerie, X., Zanotto, P.M., Holmes, E.C., 2005. Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus *Flavivirus*. *Adv. Virus Res.* 59, 277–314.
- Gould, E.A., de Lamballerie, X., Zanotto, P.M.A., Holmes, E.C., 2001. Evolution, epidemiology and dispersal of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Adv. Virus Res.* 57, 71–103.
- Gould, E.A., Higgs, S., 2009. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 109–121.
- Gumina, G., Chong, Y., Choo, H., Song, G.Y., Chu, C.K., 2002. L-Nucleosides: antiviral activity and molecular mechanism. *Curr. Top. Med. Chem.* 2, 1056–1086.
- Hart, M.K., Wang, J., Bhat, S., Bhat, S., 1999. Venezuelan equine encephalitis virus is a recombinant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 5997–6001.
- Hart, M.K., Case, S., Stephan, K., Bakker, R., Tammarillo, R., Pratt, W., Davis, N., Johnston, R.E., Smith, J.K.S., 2000. Improved mucosal protection against Venezuelan equine encephalitis virus is induced by the molecularly defined, live-attenuated vaccine. *Vaccine* 18, 2027–2037.
- Helenius, A., Marsh, M., White, J., 1982. Inhibition of Semliki Forest virus penetration by lysosomotropic weak bases. *J. Gen. Virol.* 58, 47–61.
- Hodgman, T.G., 1988. A new superfamily of replicative proteins. *Nature* 333, 22–23.
- Inglot, A.D., 1969. Comparison of the antiviral activity in vitro of some non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pharm. Med.* 4, 343–344.
- Johnson, K.M., Martin, D.M., 1974. Venezuelan equine encephalitis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 18, 79–116.
- Jzerman, L., Paquet, C., Zehngoun, A., Caillere, N., Le Tertre, A., Solet, J.L., Ledrans, M., 2006. Chikungunya disease outbreak, Reunion Island. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1994–1995.
- Jitendra, J.G., Bower, R.A., Rao, J.R., Daya, C., Shafiq, K., Smea, D.P., Morreya, J.D., Chuc, C.K., 2008. Treatment of Venezuelan equine encephalitis virus infection with (-)-carboline. *Antiviral Res.* 80, 309–315.
- Kamer, G., Argos, P., 1984. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res.* 12, 7269–7282.
- Karabatsos, N., 1975. Antigenic relationships of group A arboviruses by plaque reduction neutralization testing. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24, 527–532.
- Keyaerts, E., Vigen, L., Maes, P., Neyts, J., Van Ranst, M., 2004. In vitro inhibition of severe acute respiratory coronavirus by chloroquine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 479–480.
- Kumaran, D., Sivarajah, S., Gudier, F.W., Swaminathan, S., 2005. Structure and mechanism of ADP-ribose-1-phosphatase (Appr-1-ase), a ubiquitous cellular processing enzyme. *Protein Sci.* 14, 719–726.
- Laakkonen, P., Ahola, T., Kääriäinen, L., 1996. The effects of palmitoylation on membrane association of Semliki Forest virus. *J. Biol. Chem.* 271, 28567–28571.
- Laakkonen, P., Hyvönen, M., Peränen, J., Kääriäinen, L., 1994. Expression of Semliki Forest virus nsP1-specific methyltransferase in insect cells and in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 68, 7418–7425.
- Laakkonen, P., Kääriäinen, L., 1999. Guanosine nucleotide analogs as inhibitors of alphavirus mRNA capping enzyme. *Antiviral Res.* 42, 35–46.
- Lampio, A., Kipelläinen, I., Pesonen, S., Kähti, K., Auvina, P., Somerharju, P., Kääriäinen, L., 2000. Membrane-binding of Semliki Forest virus mRNA capping enzyme: analysis of the binding site and interaction with liposomes. *J. Biol. Chem.* 275, 37853–37859.
- LaScola, M.W., Grakou, A., Rice, C.M., 1994. Deletion and duplication mutations in the C-terminal non-conserved region of Sindbis virus nsP3: effects on phosphorylation and on virus replication in vertebrate and invertebrate cells. *Virology* 202, 224–232.
- Lavigne, A., de Thoisy, B., Lacoste, V., Pascalis, H., Poulignon, J.-F., Mercier, V., Tilot, H., Durast, P., Morvan, J., Tsiarmin, A., Kazanj, M., 2006. Mayaro virus: complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. *Virus Res.* 117, 283–290.
- Lamm, J.A., Bergqvist, A., Reed, C.M., Rice, C.M., 1998. Template-dependent initiation of alphavirus virus RNA replication in vitro. *J. Virol.* 72, 2095–2104.
- Lamm, J.A., Rönkä, T., Strauss, E.G., Strauss, J.H., Rice, C.M., 1994. Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. *EMBO J.* 13, 2925–2934.
- Leung, S.C., 1970. Disposition of Venezuelan equine encephalitis virus in man: a case follow-up. *Int. J. Epidemiol.* 4, 131–140.
- Lescar, J., Rousset, A., Wien, M.W., Navaza, J., Fuller, S.D., Wengler, G., Rey, F.A., 2001. The fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Oxf. J. Cell Biol.* 105, 111–122.
- Levinson, R.S., Strauss, J.H., Strauss, E.G., 1990. Complete sequence of the genomic RNA of chikungunya virus and its use in the construction of alphavirus phylogenetic trees. *Virology* 174, 110–123.
- Levithaite, P., Vasanthapuram, R., Osborne, J.C., Begum, A., Rank, J.L.M., Shankar, M.V., Hewson, R., Desai, A., Beeding, N.J., Ravikumar, R., Solomon, T., 2009. Chikungunya virus and central nervous system infections in children, India. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 329–331.
- Levy, D., 1999. The mechanism by which ribavirin exerts its antiviral activity in vitro against flaviviruses and paramyxoviruses is mediated by inhibition of IMP dehydrogenase. *J. Virol.* 73, 1943–1947.
- Leyssen, P., De Clercq, E., Neyts, J., 2006. The anti-yellow fever virus activity of ribavirin is independent of error-prone replication. *Mol. Pharmacol.* 69, 1461–1467.
- Leyssen, P., De Clercq, E., Neyts, J., 2008. Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. *Antiviral Res.* 78, 9–25.
- U. G.P., LaScola, M.W., Hardy, W.R., Strauss, J.H., Rice, C.M., 1990. Phosphorylation of Sindbis virus nsP3 in vivo and in vitro. *Virology* 179, 418–427.
- U. G.P., Rice, C.M., 1989. Mutagenesis of the in-frame opal termination codon preceding nsP3 of Sindbis virus: studies of translational readthrough and its effect on virus replication. *J. Virol.* 63, 1326–1337.
- U. M.L., Lin, Y.H., Simmonds, H.A., Stollar, V., 2004. A mutant of Sindbis virus which is able to replicate in cells with reduced CTP makes a replicase/transcriptase with a decreased Km for CTP. *J. Virol.* 78, 9645–9651.
- U. M.L., Lin, Y.H., Simmonds, H.A., Stollar, V., 2005. The effect of a mutant of Sindbis virus which is able to replicate in cells with reduced CTP on the subgenomic RNA of alphavirus-like RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 8083–8088.
- Lounibos, L.P., 2002. Invasions by insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 233–266.
- Lounibos, L.P., 2003. The effect of a mutant of Venezuelan equine encephalitis virus on the host immune response to infection. *J. Virol.* 74, 5006–5015.
- Maheshwari, R.K., Srikantan, V., Bhartiya, D., 1991. Chloroquine enhances replication of Semliki Forest virus and encephalomyocarditis virus in mice. *J. Virol.* 65, 205–206.
- Malet, H., Jamal, S., Coutard, B., Dutarte, H., Papageorgiou, N., Heinonen, M., Ahola, T., Forrester, N., Gould, E.A., Lafitte, D., Ferron, F., Lescar, J., de Lamballerie, X., Canard, B., 2009. The crystal structures of Chikungunya and Venezuelan equine encephalitis virus nsP3 macro domains define a conserved adenosine binding pocket. *J. Virol.* 83, 6534–6545.
- Mavalankar, D., Shashi, P., Bandyopadhyay, T., Pamar, J., Ramani, K.V., 2008. Increased mortality rate associated with chikungunya epidemic, Ahmedabad, India. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 412–415.
- Mayuri, T., Todd, W.G., Smith, J.L., Kuhn, R.J., 2006. Role for conserved residues of Sindbis virus nonstructural protein 2 methyltransferase-like domain in regulation of minus-strand synthesis and cytopathic infection. *J. Virol.* 82, 7284–7297.
- Mi, S., Durbin, R., Huang, H.V., Rice, C.M., Stollar, V., 1989. Association of the Sindbis virus RNA methyltransferase activity with the nonstructural protein nsP1. *Virology* 170, 385–391.
- Mi, S., Durbin, R., 1991. Expression of alpha virus methyltransferase activity in *Escherichia coli*. *Virology* 164, 423–427.
- Mukhopadhyay, S., Zhang, W., Gabler, S., Chipman, P.R., Strauss, E.G., Strauss, J.H., Baker, T.S., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., 2006. Mapping the structure and function of the E1 and E2 glycoproteins in alphaviruses. *Structure* 14, 63–73.
- M. Wu, L. Khan, A., Sardesai, N., Kim, J.J., Vijayachari, P., Weiner, D.B., 2008. Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against Chikungunya virus. *Vaccine* 26, 5128.
- Neyts, J., Meerbach, A., McKenna, P., De Clercq, E., 1996. Use of the yellow fever virus virus infections. *Antiviral Res.* 30, 125–132.
- O'Brien, L., 2007. Inhibition of multiple strains of Venezuelan equine encephalitis by a pool of four short interfering RNAs. *Antiviral Res.* 75, 20–29.
- Ozden, S., Lucas-Hourani, M., Ceccaldi, P.E., Basak, A., Valentine, M., Benjannet, S., Harsanyi, J., Smith, Y., Manichand, K., Muthu, V., Desai, P., Gassan, A., Butler, B., Browne, G., Chretien, M., Tang, F., Vidalan, P.O., Sidan, N.G., 2008. Inhibition of Chikungunya virus infection in cultured human muscle cells by furin inhibitors: impairment of the maturation of the E2 surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 283, 21899–21908.
- Passler, S., Ni, H., Petrakova, O., Fayzulin, R.Z., Yun, N., Anishchenko, M., Wawer, S.C., Frolov, I., 2006. Replication and clearance of Venezuelan equine encephalitis virus from the brains of animals vaccinated with chimeric SIN/VEE viruses. *J. Virol.* 80, 2784–2796.
- Passler, S., Rijnbrand, R., Stein, D.A., Ni, H., Yun, N.E., Dzuba, N., Borisevich, V., Serigin, A., Ma, Y., Bouch, R., Iversen, P.L., Zacks, M.A., 2008. Inhibition of alphavirus infection in one culture and in mice with an enhanced immunoprecipitation. *Virology* 376, 357–370.
- Park, E., Griffin, D.E., 2009. The nsP3 macro domain is important for Sindbis virus replication in neurons and neuroinvasion in mice. *Virology (April)* (Epub ahead of print).
- Passler, S., Rijnbrand, R., Stein, D.A., Ni, H., Yun, N.E., Dzuba, N., Borisevich, V., Serigin, A., Ma, Y., Bouch, R., Iversen, P.L., Zacks, M.A., 2008. Expression and biochemical characterization of nsP2 cysteine protease of Chikungunya virus. *Virus Res.* 131, 293–298.
- Pavlova, B.G., Loew-Beselli, A., Pritsch, S., Pfeifferbauer, E.-M., Vartiainen, N., Rinke, J., Ehrlich, H.J., 2003. Tolerability of modified tick-borne encephalitis vaccine FSME-IMOVAX. *Vaccine* 21, 742–745.
- Perhonen, J.H., Fuji, R.N., 1998. Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Res.* 26, 2837–2842.
- Pisiaux, G., Galzère, B.A., Juréguiberry, S., Ströbel, M., 2007. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect. Dis.* 7, 633.

- Petrovski, Y., Hansen, G., Boonmaars-van der Zanden, A.L., Shijder, E.J., Gorbalenya, A.E., Hilgenfeld, R., 2009. Crystal structures of the X-domains of a Group-1 and a Group-2 RNA-dependent RNA polymerase. *Structure* 17, 101–111.
- Pittman, P.R., Makuch, R.S., Mangiavico, J.A., Cannon, T.L., Gibbs, P.H.C.J., Peters, C.J., 1996. Long-term duration of detectable neutralizing antibodies after administration of live-attenuated VEE vaccine and following booster vaccination with inactivated VEE vaccine. *Vaccine* 14, 337–343.
- Poidinger, M., Roy, S., Hall, R.A., Turley, P.J., Scherret, J.H., Lindsay, M.D., Broom, A.K., Mackenzie, J.S., 1997. Genetic stability among temporally and geographically diverse isolates of Barmah Forest virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57, 230–234.
- Porterfield, J.S., 1961. Cross-neutralization studies with group A arthropod-borne viruses. *Bull. World Health Org.* 24, 735–741.
- Powers, A.M., Smith, A.C., Shirako, Y., Strauss, E.G., Kang, W., Strauss, J.H., Weaver, S.C., 2001. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *J. Virol.* 75, 10118–10131.
- Powers, A.M., Logue, C.H., 2007. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J. Gen. Virol.* 88, 2363–2377.
- Reinherz, H., Koenig, M., Reinherz, H., Koenig, M., 2007. Mosquitoes to Chikungunya virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 422–425.
- Rezza, G., Nicoletti, L., Angelini, R., Romi, R., Finelli, A.C., Pannini, M., Cordioli, P., Fortuna, C., Boros, S., Magurano, F., Sili, G., Anselmi, P., Dottoni, M., Gufoloni, M.G., Majori, G.C., Cassone, A., 2007. Infection with Chikungunya virus in Italy: an emerging zoonotic disease. *Lancet* 369, 1173–1176.
- Rikonen, M., Peränen, J., Kääriäinen, L., 1994. ATPase and GTPase activities associated with Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *J. Virol.* 68, 5804–5810.
- Robin, S., Ramful, D., Le Seach, F., Jaffer-Bandjee, M.C., Rigou, G., Alessandri, J.L., 2008. Neurologic manifestations of pediatric Chikungunya infection. *J. Child Neurol.* 23, 1075–1078.
- Rodriguez, J., Dubois, C., Mouton, R., Dubois, C., 2007. J. Mannioui, A. Martinon, F. Lebon, P. Verrier, B. Lalleau, V. de Lamballerie, X. Cherel, Y. Larcher, T. Aumont, G. Le Grand, R., 2007. Chikungunya et autres arbovirus émergents en milieu tropical. Reunion Island [http://www.invs.sante.fr/agenda/colloque\\_chikungunya/](http://www.invs.sante.fr/agenda/colloque_chikungunya/).
- Rubino, M.N., Koenig, E.V., Gorbalenya, A.E., 1993. Conservation of the catalytic methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 73, 2129–2134.
- Rubak, J.K., Week, B.R., Rupp, J.C., Kahn, R.J., Hardy, R.W., Smith, J.L., 2009. Characterization of purified Sindbis virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase activity in vitro. *Virology* 384, 201–208.
- Rumyantsev, T., Strauss, E.G., Strauss, J.H., 1995. Aura virus is a New World Representative of Sindbis-like viruses. *Virology* 208, 621–633.
- Russell, R.C., 1998. Vectors vs. humans in Australia—who is on top down under? An update on vector-borne disease and research on vectors in Australia. *J. Vector Ecol.* 23, 1–46.
- Russo, M.L., Trono, M., Mayor, J., et al., 2005. The crystal structure of the Venezuelan equine encephalitis alphavirus nsP2 protease. *Structure* 14, 1449–1458.
- Savarino, A., Casda, R., Cassone, A., 2007. On the use of chloroquine for Chikungunya. *Lancet Infect. Dis.* 7, 633.
- Sawicki, D.L., Sawicki, S.G., 1994. Alphavirus positive and negative strand RNA synthesis. *Arch. Virol.* 9 (Suppl.), 393–405.
- Scheidel, L.M., Durbin, R., Sallar, V., 1987. Sindbis virus mutants resistant to mycophenolic acid and ribavirin. *Virology* 158, 1–7.
- Scheidel, L.M., Durbin, R., Sallar, V., 1989. SLM21, a Sindbis virus mutant resistant to mycophenolic acid. *Virology* 161, 408–414.
- Scheidel, L.M., Sodar, V., 1991. Mutations that confer resistance to mycophenolic acid and ribavirin on Sindbis virus map to the nonstructural protein nsP1. *Virology* 181, 490–499.
- Schuffenecker, J., Ramirez, J., Michault, A., Murri, S., Francaud, I., Vanay, M.C., Laveine, R., Pardigon, N., Reynes, J.M., Pettinelli, F., Biscornet, L., Diancourt, L., Michel, B., Duquerroy, S., Guigon, G., Fenkiet, M.P., Brehin, A.C., Cubilla, N., Despres, P., Kunst, F., Rey, F.A., Zeller, H., Brisse, S., 2006. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian ocean outbreak. *PLoS Med.* 3, e263.
- Sevenson, W.E., Schmaljohn, C.S., Javadian, A., Jansson, C.B., 2003. Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication. *J. Virol.* 77, 481–488.
- Shimizu, Y., Yamamoto, S., Honma, Ishida, M., 1972. Effect of chloroquine on the growth of animal viruses. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 36, 93–104.
- Shirako, Y., Strauss, E.G., Strauss, J.H., 2003. Modification of the 5' terminus of Sindbis virus genomic RNA allow nsP4 RNA polymerases with nonaromatic amino acids at the 5' terminus to function in new replication. *J. Virol.* 77, 4201–4202.
- Shirako, Y., Strauss, J.H., 1994. Regulation of Sindbis virus RNA replication: undecapped P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 68, 1874–1885.
- Shukla, G., Sharma, R., Chatterjee, S., 2008. Group specific phosphatase that acts on ADP-ribose 1'-phosphate, a metabolite of tRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 33, 650–660.
- Singleton, M.R., Dillingham, M.S., Wigley, D.B., 2007. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 23–50.
- Spul, P., Sironen, A., Merits, A., Jitkalo, E., Kääriäinen, L., Ahola, T., 2007. Role of the amphipathic peptide of Semliki Forest virus replicase protein nsP1 in membrane association and virus replication. *J. Virol.* 81, 872–883.
- Stadler, K., Allison, S.L., Schlich, J., Heinz, F.X., 1997. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J. Virol.* 71, 8475–8481.
- Strauss, E.G., deGroot, R.J., Levinson, R., Strauss, J.H., 1992. Identification of the active site residues in the nsP2 proteinase of Sindbis virus. *Virology* 191, 571–580.
- Strauss, J.H., Strauss, E.G., 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* 58, 491–562.
- Strode, G.K., 1951. *Yellow Fever*. McGraw-Hill, New York.
- Sun, Y., Chung, D.H., Chu, Y.K., Jansson, C.B., Parker, W.B., 2007. Activity of ribavirin against Hantaan virus correlates with production of ribavirin-5'-triphosphate not with inhibition of IMP dehydrogenase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 84–88.
- Stofford, D.L., 1998. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and Other Methods), version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tabachnick, W.J., 1991. Evolutionary genetics and arthropod-borne diseases. *The yellow fever mosquito, Aedes aegypti*. *Am. J. Entomol.* 37, 14–24.
- Tani, H., Akimitsu, N., Fujita, O., Matsuda, Y., Miyata, R., Tsuneda, S., Igarashi, M., Sakiguchi, Y., Noda, N., 2009. High-throughput screening assay of hepatitis C virus helicase inhibitors using fluorescence-quenching phenomenon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 1054–1059.
- Taylor, W.H., Pebody, R., 2005. *Arboviruses: Clinical Medicine and Public Health*. Springer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 6242–6247.
- Tomar, S., Hardy, R.W., Smith, J.L., Kuhn, R.J., 2006. Catalytic core of alphavirus non-structural protein nsP4 possesses terminal adenyltransferase activity. *J. Virol.* 80, 9962–9969.
- Tuomi, M., 2007. Nonstructural protein nsP4 of Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 3, e201.
- Tuittila, M.T., Santagati, M.G., Ryttyä, M., Määttä, J.A., Hinkkanen, A.E., 2000. Replicase complex genes of Semliki Forest virus confer lethal neurovirulence. *J. Virol.* 74, 4276–4280.
- Vasiljeva, L., Merits, A., Golubtsov, A., Szemkajka, V., Kääriäinen, L., Ahola, T., 2003. Regulation of the sequential processing of Semliki Forest virus replicase polyprotein. *J. Biol. Chem.* 278, 41636–41645.
- Vasiljeva, L., Merits, A., Aizvinen, P., Kääriäinen, L., 2000. Identification of a novel function of the alphavirus nonstructural RNA 5'-triphosphatase activity of nsP2. *J. Biol. Chem.* 275, 17281–17287.
- Vasiljeva, L., Valmu, L., Kääriäinen, L., Merits, A., 2001. Site-specific protease activity of the carboxyl-terminal domain of Semliki Forest virus replicase protein nsP2. *J. Biol. Chem.* 276, 30786–30793.
- Vihinen, H., Ahola, T., Tuittila, M., Merits, A., Kääriäinen, L., 2001. Elimination of phosphorylation sites of Semliki Forest virus replicase protein nsP3. *J. Biol. Chem.* 276, 5745–5752.
- Walton, T.E., Grayson, M.A., 1988. Venezuelan equine encephalomyelitis. In: Monath, T.P. (Ed.), *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 203–231.
- Wang, H., Yoon, S., Park, S., 2008. Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya. *Vaccine* 26, 5030–5039.
- Wang, H.L., O'Keefe, J., Skollar, V., 1996. Mutagenesis of the Sindbis virus nsP1 protein: effects on methyltransferase activity and viral infectivity. *Virology* 217, 787–791.
- Wang, Y.F., Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., 1994. Alphavirus nsP3 functions to form replication complexes transcribing negative-strand RNA. *J. Virol.* 68, 6466–6475.
- Weaver, S.C., 2005. Host range, amplification and arboviral disease emergence. *Arch. Virol. Suppl.* 33–44.
- Weaver, S.C., 2007. The emergence of arboviral disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 789–801.
- Weaver, S.C., Ferro, C., Barrera, R., Boshell, J., Navarro, J.-C., 2004. Venezuelan equine encephalitis. *Annu. Rev. Entomol.* 49, 141–174.
- Weaver, S.C., Frey, T.K., Huang, H.V., Kinney, R.M., Rice, C.M., Roehrig, J.T., Shope, R.F., Strauss, E.G., 2005. *Taxonomy in Parasitology*. C.M. Mayo, M.A. Mandoff, J. Desseberg, U. Bal, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy VIIIth Report of the ICTV*. Elsevier/Academic Press, London, pp. 999–1008.
- Weaver, S.C., Hagenbaugh, A., Bellow, L.A., Netesov, S.V., Volchkov, V.E., Chang, G.-J.J., Clarke, D.K., Goussat, L., Scott, T.W., Trent, D.W., Holland, J.J., 1993. A comparison of the nucleotide sequences of eastern and western equine encephalomyelitis viruses with those of other alphaviruses and related RNA viruses. *Virology* 197, 375–390.
- Weaver, S.C., Kang, W., Shirako, Y., Rimsnapi, T., Strauss, E.G., Strauss, J.H., 1987. Recombinational history and molecular evolution of western equine encephalomyelitis complex alphaviruses. *J. Virol.* 71, 613–623.
- Weaver, S.C., Park, S., Kim, H., Park, S., 1996. Re-emergence of epidemic Venezuelan equine encephalomyelitis in South America. *Lancet* 348, 436–440.
- Young, K.C., Lindsay, K.L., Lee, K.J., Liu, W.C., Jan-Wen, H.J., Milstein, S.L., Lai, M.M., 2003. Identification of a ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus. *Antiviral Res.* 59, 101–107.
- Young, N.A., 1972. Serologic differentiation of viruses of the Venezuelan encephalitis (VE) complex. In: *Proceedings of the workshop-symposium on Venezuelan encephalitis virus, scientific publication 243*. Pan American Health Organization, Washington, DC, pp. 84–89.
- Young, N.A., 1973. The epidemiology of the Venezuelan encephalitis virus: their geographic distribution and epidemiologic significance. *Am. J. Epidemiol.* 80, 286–307.
- Zhang, D., Tozser, J., Waugh, D.S., 2009. Molecular cloning, overproduction, purification and biochemical characterization of the p39 nsP2 protease domains encoded by three alphaviruses. *Protein Expr. Purif.* 64, 89–97.

- Zhou, S., Liu, R., Baroudy, B.M., Malcolm, B.A., Reyes, G.R., 2003. The effect of ribavirin and IMPDH inhibitors on hepatitis C virus subgenomic replicon RNA. *Virology* 310, 332–342.
- Zhu, W.-Y., Yang, Y.-L., Fu, S.-H., Wang, L.-H., Zhai, Y.-G., Tang, Q., Liang, G.-D., 2009. Substitutions of 169Lys and 173Thr in nonstructural protein 1 influence the infectivity and pathogenicity of XJ160 virus. *Arch. Virol.* 154, 243–253.
- Ziegler, S.A., Liu, L., de Rosa, A.P., Xiao, S.Y., Tesh, R.B., 2005. An animal model for studying the pathogenesis of chikungunya virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 133–139.

## Article de phylogénie: Epidemiological and evolutionary aspects of the recent Chikungunya virus epidemics

### Epidemiological and evolutionary aspects of the recent Chikungunya virus epidemics

Ilenia Delogu<sup>1</sup>, Shelley Cook<sup>2</sup>, Antoine Nougairede<sup>1</sup>, Mael Bessaud<sup>1</sup>, Maria Rosaria Capobianchi<sup>3</sup>, Vittorio Sambri<sup>4</sup>, Rémi Charrel<sup>1</sup> and Xavier de Lamballerie<sup>1\*</sup>

UMR190, Université de la Méditerranée - Institut de Recherche pour le Développement - EHESP French School of Public Health, Marseille, France.

<sup>1</sup>UMR190, IRD – Aix-Marseille 2 University – EHESP French School of Public Health, Unité des Virus Emergents, Marseille, France

<sup>2</sup>The Natural History Museum, Cromwell Road, London, UK

<sup>3</sup>National Institute for Infectious Diseases "L. Spallanzani", Rome, Italy

<sup>4</sup>CRREM, St. Orsola Malpighi University Hospital, University of Bologna, Bologna, Italy

\*Author for correspondence

Pr. X. de Lamballerie

UMR190

Medical University

27, Bd. J. Moulin

13005 Marseille, France

xavier.de-lamballerie@univmed.fr

### Introduction

Chikungunya virus (CHIKV, family *Togaviridae*, genus *Alphavirus*), is a classical arbovirus, discovered more than 50 years ago in East Africa (Ross 1956) and responsible for acute febrile arthralgia, with possible complicated presentations at the acute phase (*e.g.* neurological forms) but also possible long-term persistence of arthritic signs (Pialoux et al. 2007). Over the last 10 years, CHIKV has been responsible for significant outbreaks involving millions of human cases in Eastern and Central Africa, the Indian Ocean, India and South-East Asia, and a limited –but alarming– number of autochthonous cases in Europe.

The viruses responsible for these recent epidemics belong to different genetic clades: (*i*) some cases identified in South-East Asia (Malaysia, Indonesia) were caused by viruses belonging to the Asian canonical clade; (*ii*) the Central Africa outbreaks (*e.g.* Cameroon, Gabon), and (*iii*) the massive Indian Ocean – India – South-East Asia – Europe (IOISEAE) outbreaks were caused by viruses issued from the ECSA (East – Central – South Africa) clade.

CHIKV is usually transmitted to humans by *Aedes aegypti* mosquitoes. However, since 2005, it was shown that an increasing number of transmission cases implicated *Aedes albopictus* mosquitoes. In a previous study (de Lamballerie et al. 2008), we demonstrated three distinct epidemiological examples (in the Indian Ocean islands, India and Central Africa) of the independent acquisition of a single adaptive mutation in CHIKV, that when exposed to *Aedes albopictus*, acquired a mutation in the envelope gene (E1, A226V) that has been reported to provide a selective advantage for the virus to be transmitted by this mosquito (Schuffenecker et al. 2006, Tsetsarkin et al. 2006).

Here, we analysed a large dataset of CHIKV complete coding sequences, including newly produced sequences, and examined a number of epidemiological and evolutionary aspects of the recent CHIKV epidemics that complement and extend previous analyses.

## Materials and methods

In a recent article, Volk and collaborators (2010) produced a comprehensive genome-scale analysis of CHIKV evolution over time. The complete coding sequence nucleotide alignment dataset used for phylogenetic analyses was kindly provided by the authors. It was complemented by a number of non-redundant sequences from public databases and new sequences established from Indian Ocean and European isolates (by sequencing overlapping PCR products –protocol available upon request to the corresponding author).

Two codon positions non-informative for phylogenetic reconstructions were removed from the alignment: they correspond to (i) residue 1,857 of the nonstructural polyprotein (associated with readthrough within the NSP4 protein) and (ii) residue 1,035 of the structural polyprotein (associated with the single adaptive mutation providing selective advantage for transmission by *Aedes albopictus* at E1 position 226).

Phylogenetic analyses were performed using Neighbour-Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML) methods implemented in the Mega 5.0 software programme (Tamura et al. 2011). In addition, Bayesian (BY) analysis was conducted (after partitioning the codons into first, second and third positions and allowing Mr Bayes to estimate different substitution rates for each position).

## Results and Discussion

A ML tree is presented in figure 1. Its general topology identifies the West African, Asian and ECSA clades, and conforms with previously proposed phylogenies (Powers et al. 2000), and with that of NJ and BY reconstructions obtained using the same dataset.

Strain GABOPY1, collected in Gabon in 2007, appears in the ECSA clade (ECSA2 sub-clade). As described elsewhere (Leroy et al. 2007), the Gabon outbreak was associated with significant transmission by *Aedes albopictus*, and all Gabonese strains characterised to date harboured the A226V mutation. The ECSA2 group includes a number of strains collected in Central Africa before 1990 (and, anecdotally, the 2000 MH4 Indian strain which is highly similar to a 1982 Uganda strain and may represent a laboratory contamination, as previously suggested (Volk et al. 2010)). The Cameroon and Gabon strains identified in 2006-2007 represent the only recent isolates. The GABOPY1 isolate is the only one made available for genome-scale analysis, which demonstrates the persistence of ECSA2 viruses in this region and the ability of ECSA2 viruses to adapt to *Aedes albopictus* by E1 mutation.

Regarding strains associated with IOISEAE outbreaks, the tree topology is similar to that proposed by Volk and collaborators (2010) and supports the early hypothesis (de Lamballerie et al. 2008) that the Indian Ocean and Indian subcontinent outbreaks emerged independently, presumably from Kenyan or early Comoran *Aedes aegypti*-adapted CHIKV variants (this hypothesis was supported in Volk's phylogenetic reconstruction by high (>0.98) BY posterior probability values).

We established full coding sequences of isolates from Mayotte (OPY4, 2006) and Madagascar (MADOPY1, 2006) to be able to include them in genome-scale analysis. Like all other isolates characterised to date (Schuffenecker et al. 2006), the Mayotte strain includes the A226V mutation, in contrast with two 2005 available sequences from other Comoran islands. Since both *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* mosquitoes are present in Mayotte, this may imply either that original A226 strains from Comoros became rapidly adapted to *Aedes albopictus*, or alternatively, that the Mayotte CHIKV strains originated from Reunion island or Mauritius where a rapid shift to *Aedes albopictus*-adapted strains was observed (Schuffenecker et al. 2006).

The MADOPY1 strain was isolated in 2006 from a French patient returning from Madagascar. Interestingly, this strain includes the A226V mutation. This is in contrast with eight 2006 Malagasy isolates characterised by Schuffenecker and collaborators (2006). Since both *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* mosquitoes are present in distinct areas of Madagascar, this finding may indicate that both *Aedes albopictus*- and *Aedes aegypti*-adapted strains have co-circulated in Madagascar as early as 2006. The presence of *Aedes albopictus*-adapted virus strains has been subsequently confirmed in 2007 in a traveller returning from Madagascar (Pistone et al. 2009).

In addition, we analysed and included isolates made from autochthonous transmission of CHIKV in Europe. Strain OPY6 (2006) was isolated from a case of autochthonous nosocomial infection in a nurse in metropolitan France (Parola et al. 2006). The index case was a patient returning from Reunion island. As expected, OPY6 sequence includes the A226V mutation and is grouped with the other 2006 Indian Ocean CHIKV sequences.

Other cases were identified in Italy during the 2007 outbreak. Strains StVE and StBI (isolated from human cases of autochthonous CHIKV transmission that occurred in Northern Italy) form a cluster with the previously characterised ITA07-RA1 strain (Fallacara and Bonilauri 2008, unpublished), indicating a single viral introduction

event and subsequent spread in Italy in 2007. All of them contain the A226V mutation, in accordance with the local exclusive transmission by *Aedes albopictus* (Bonilauri et al. 2008).

The analysis of IOISEAE strains illustrates the CHIKV propensity for dispersal and emergence in remote ecological environments. For example, numerous putative instances of CHIKV introduction in Singapore (Sing1-Sing3) or Sri Lanka (SL1-SL4) can be identified (figure 1). In addition, this phylogeny supports the hypothesis that, after 2006, the primary introduction and spread of CHIKV from Kenya in the Indian subcontinent and South-East Asia was associated with *Aedes aegypti*-adapted strains (harbouring the E1 residue A226)(de Lamballerie et al. 2008). In different locations, the selective pressure exerted on CHIKV through the constraint of having to replicate in a new vector (*Aedes albopictus*), was associated with independent events of adaptive mutation (A226V) constituting new examples of "evolutionary convergence". This is illustrated by clusters SL1 and SL4, which contain both A226 and A226V sequences and are supported by NJ and ML bootstrap values >95%, and by BY posterior probability values of 100%, suggesting that at least two introductions of *Aedes aegypti*-adapted strains in Sri Lanka were followed by the emergence of *Aedes albopictus*-adapted strains. However, it must be noted that, during the last decade, CHIKV strains belonging to the canonical Asian clade also circulated in Malaysia & Indonesia. We could identify in databases six Malaysian strains belonging to this clade, isolated in 2006, and for which E1 position 226 had been characterised. All of them harbour the E1 residue A226 (*Aedes aegypti*-adapted) despite the fact that the most recent common ancestor of the Asian clade strains existed around 1950 (Volk et al. 2010), *i.e.* strains belonging to that clade have been circulating for more than 50 years in Asian areas where *Aedes albopictus* is prevalent. This indicates, either that they were not vectored by *Aedes albopictus* mosquitoes, or that they were vectored without the appearance of the A226V adaptive mutation. By contrast, 17 out of 17 strains belonging to the IOISEAE clade and collected between 2006 and 2009 in Malaysia contained the A226V adaptive mutation. This indicates that viruses belonging to the Asian and IOISEAE clades do not have the same propensity to acquire the A226V adaptive mutation, depending on their genetic background. Paradoxically, regarding viruses of the Asian clade, in the absence of specific entomological field studies, we ignore whether this reflects efficient transmission by *Aedes albopictus* without the requirement for an adaptive mutation in the E1 protein, or a poor transmission by this mosquito, associated with a specific constraint that would prevent the appearance of an adaptive mutation.

In conclusion, the genome-scale phylogenetic analysis of Chikungunya viruses confirms the remarkable CHIKV propensity for spread in remote naïve populations. During the recent outbreaks in the Indian subcontinent and South-East Asia, the virus dispersal was most certainly supported by viraemic travellers moving to areas where *Aedes* mosquitoes are prevalent, resulting in multiple independent viral introductions in locations such as Sri Lanka and Singapore. Analyses also identified new events of evolutionary convergence that confirm the ability of viruses belonging to the ECSA2 sub-clade to acquire a single adaptive mutation providing selective advantage for transmission by *Aedes albopictus*. The absence of adaptive mutation in viruses belonging to the Asian clade isolated in the same regions raises the question of their actual transmission by *Aedes albopictus* and that of the influence of the viral genetic background on the propensity to acquire the A226V mutation. No information is available regarding the possible adaptation to the transmission by *Aedes albopictus* in the case of strains belonging to the Asian and West African clades, and to the ECSA1 sub-clade.

Complementing previous competence studies (Tsetsarkin et al. 2006) by constructing infectious cDNA clones of CHIKV using the genetic backbone from isolates from the different clades (the Asian and West African clades, the ECSA1 sub-clade), and using A226 and A226V viruses for performing experimental infection of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes, as well as fitness analyses in both mosquito and mammalian cells, could be of great benefit. It would increase our understanding of the potential for adaptation to new vectors of chikungunya viruses, and thus improve our ability to predict potential for emergence in new ecological niches.

## References:

Bonilauri P, Bellini R, Calzolari M, Angelini R, Venturi L, Fallacara F, Cordioli P, Angelini P, Venturelli C, Meriardi G, Dottori M. Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:852-854.

de Lamballerie X, Leroy E, Charrel RN, Tsetsarkin K, Higgs S, Gould EA. Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *Virol J.* 2008;5:33.

Leroy EM, Nkoghe D, Ollomo B, Nze-Nkoghe C, Becquart P, Grard G, Pourrut X, Charrel R, Moureau G, Ndjoyi-Mbiguino A, de Lamballerie X. Concurrent chikungunya and dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:591-293.

Parola P, de Lamballerie X, Jourdan J, Rovey C, Vaillant V, Minodier P, Brouqui P, Flahault A, Raoult D, Charrel RN. Novel chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:1493-9.

Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7:319-327.

Pistone T, Ezzedine K, Schuffenecker I, Receveur MC, Malvy D. An imported case of Chikungunya fever from Madagascar: use of the sentinel traveller for detecting emerging arboviral infections in tropical and European countries. *Travel Med Infect Dis.* 2009;7:52-4.

Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J Gen Virol.* 2000;81:471-479.

Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC, Lavenir R, Pardigon N, Reynes JM, Pettinelli F, Biscornet L, Diancourt L, Michel S, Duquerroy S, Guigon G, Frenkiel MP, Bréhin AC, Cubito N, Desprès P, Kunst F, Rey FA, Zeller H, Brisse S. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* 2006;3:e263.

Ross RW. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J Hyg.* 1956;54:177-191.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.* 2011 (submitted).

Tsetsarkin K, Higgs S, McGee CE, De Lamballerie X, Charrel RN, Vanlandingham DL. Infectious clones of Chikungunya virus (La Réunion isolate) for vector competence studies. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2006;6:325-337.

Volk SM, Chen R, Tsetsarkin KA, Adams AP, Garcia TI, Sall AA, Nasar F, Schuh AJ, Holmes EC, Higgs S, Maharaj PD, Brault AC, Weaver SC. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *J Virol.* 2010;84:6497-6504.

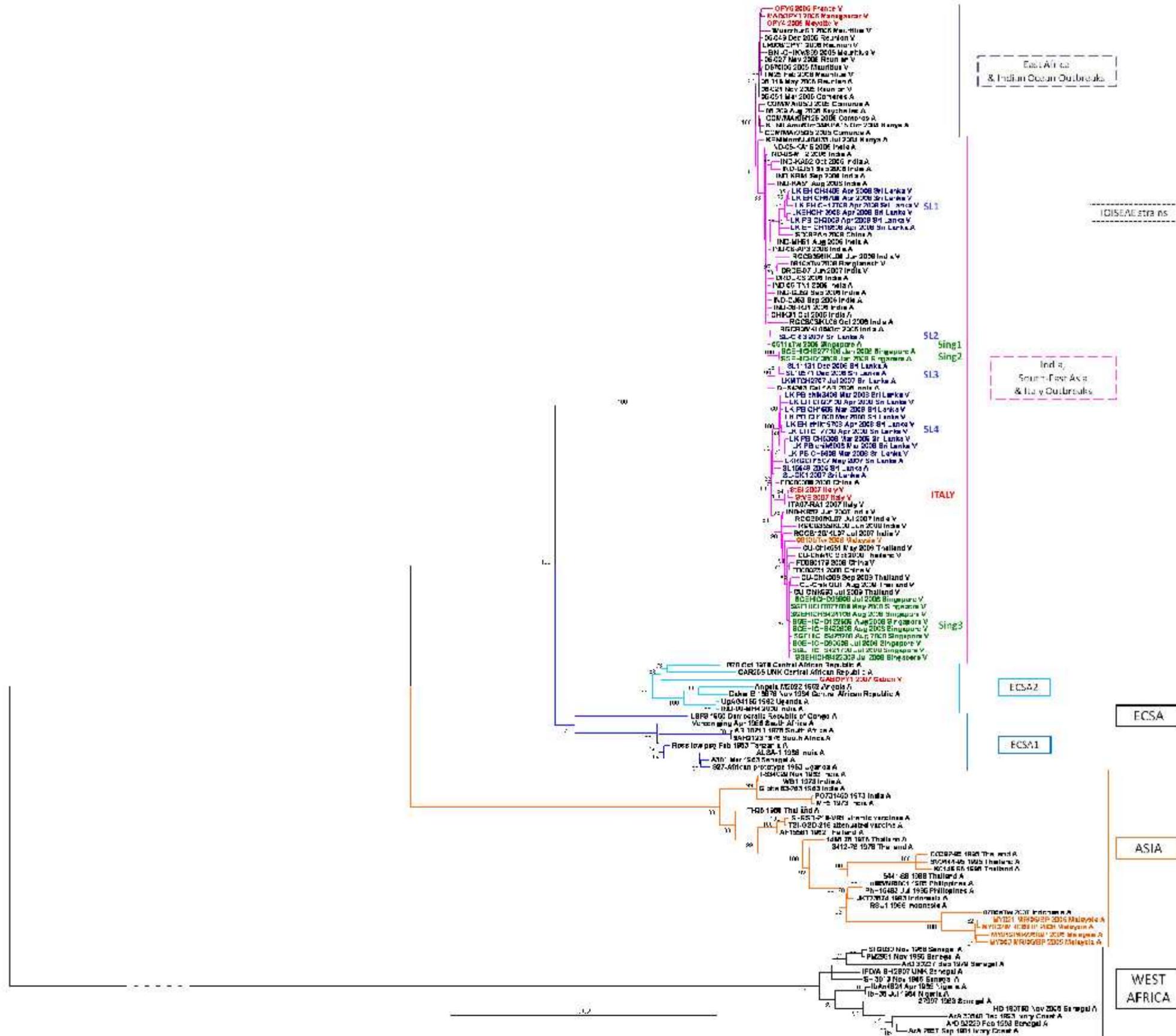
### **Figure 1. Genome-scale phylogenetic analysis.**

The tree was built using the ML statistical method, the Tamura-Nei substitution and Gamma distribution with Invariant sites (G+I) models implemented in the Mega 5.0 software, and 500 bootstrap replications. It includes the 3 major recognised clades (West Africa, Asia, East – Central – South Africa [ECSA]), and viruses characterised during the recent Indian Ocean – India – South-East Asia – Europe [IOISEAE] outbreaks.

Sequences in red were produced by the authors; sequences in orange represent Malaysian CHIKV isolates; sequences in blue represent Sri Lankan isolates; sequences in green represent Singapore isolates.

Strains are labelled as follows: strain name\_date of collection\_country\_residue at position E1 226.





**Chapitre II:  
OBJECTIFS DU  
TRAVAIL ET  
STRATEGIES  
EXPERIMENTALES**

La plupart des arbovirus circulent dans les régions tempérées et tropicales où leurs vecteurs sont adaptés. Le virus Chikungunya, un Alphavirus transmis par des moustiques, n'ayant jamais sévi dans le Sud-Ouest de l'océan Indien, y a fait, à partir de février 2005, une incursion spectaculaire (*Chastel C. 2005*). Il a atteint successivement la République islamique des Comores, Mayotte, l'île Maurice, la Réunion, les Seychelles et Madagascar (*Sissoko et al. 2007; Ratsitorahina M. et al. 2008*). L'impact le plus grave, s'est produit à la Réunion, où quelques 260 000 cas ont été recensés, soit plus du tiers de la population réunionnaise. Les moyens les plus efficaces de prévention sont la protection contre les contacts avec les moustiques porteurs de maladies et la lutte contre les moustiques. Il s'agit notamment d'utiliser un insectifuge avec des substances comme le DEET (N, N-diéthyl-m-toluamide, également appelé N, N'-diéthyl-3-méthylbenzamide ou NNDB), icaridine (également connu sous le nom de picaridine et KBR3023), PMD (p -menthane-3, une substance dérivée de l'eucalyptus citron), ou IR3535. Le port de vêtements à manches longues et pantalons offre également une protection. En outre, les vêtements peuvent être traités avec des pyréthrinoïdes, une classe d'insecticides qui a souvent des propriétés répulsives, les pyréthrinoïdes vaporisés (Ex : spirales anti-moustiques) sont également des insectifuges. La sécurisation par des écrans sur les fenêtres et portes aidera à empêcher l'entrée des moustiques péricidomestiques. Il n'existe aucun traitement, aucun vaccin commercialisé contre le CHIKV. In cellulo, l'interféron alpha recombinant humain (IFN-alpha2b), la glycyrrhizine, la 6-azauridine et la ribavirine sont efficaces sur le CHIKV. Cependant des essais chez l'homme restent à effectuer. Afin de trouver rapidement un traitement contre ce virus, nous avons criblé les molécules de notre chimiothèque AMM (de principes actifs commercialisés). La chloroquine s'est montrée efficace in vitro, mais l'essai clinique mené à la Réunion n'a pas montré d'efficacité chez l'homme. Un autre antipaludéen s'est montré efficace sur le CHIKV. L'objectif de ce travail était donc d'évaluer l'activité d'un antiviral, précisément l'Arbidol sur le CHIKV in vitro afin de vérifier si le mécanisme d'action se situe au niveau de l'entrée du virus dans la cellule, comme pour le virus influenza puisque le CHIKV est un virus enveloppé.

# ***I. Le développement des antiviraux contre le CHIKV***

## **A Résumé**

Dans les 5 dernières années, le CHIKV a été à l'origine d'une forte morbidité en Afrique et en Asie. L'expansion géographique continue des deux vecteurs *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* pourrait conduire au cours des prochaines années, à une expansion de la maladie en Amérique. Il n'existe actuellement aucune thérapie antivirale ou de prophylaxie (vaccins) chez l'homme. Ainsi, lors des dernières épidémies apparues dans l'océan indien, seul un traitement symptomatique (de type antalgique non salicylate ou anti-inflammatoires) a pu être apporté aux patients (Pialoux et al. 2007). Cependant le développement de modèles murin (Couderc et al. 2008; Ziegler et al. 2008 ; de Lamballerie et al. 2009) et primate, (Roques et al. 2009) ainsi qu'une nouvelle approche impliquant des molécules naturelles végétales, contribuent à accroître le développement de nouveaux candidats antiviraux (Li et al. 2007).

### **1 Chloroquine**

La chloroquine a été utilisée pour inhiber le Sindbis Virus (SINV) et l'infectiosité Simliky forest virus (SFV) in vitro (Cassell et al. 1984; Coombs et al. 1981; Helenius et al. 1982; Inglot, 1969, Shimizu et al. 1972), mais des études chez la souris ont suggéré que ce médicament pourrait augmenter la réplication virale et aggraver la maladie (Maheshwari et al. 1991). Les dernières recherches ont porté sur l'efficacité de la posologie chloroquine utilisée pour traiter une infection aiguë par le CHIKV (de Lamballerie et al. 2008. Savarino et al. 2007). La Chloroquine phosphate a également été utilisée pour traiter l'arthrite chronique du chikungunya (Brighton, 1984) basé sur les propriétés anti-inflammatoires de la molécule. Sur la base des expériences de cultures cellulaires, des résultats comparables à ceux obtenus pour le CHIKV, ont également été observés par le coronavirus du SARS. La chloroquine a été envisagée comme potentiellement antivirale pour le traitement des personnes infectées par le coronavirus du SARS (Keyaerts et al. 2004; Leyssen et al. 2006). Pour faire avancer ces études sur la chloroquine et le CHIKV, un double aveugle contrôlé versus placebo (voir <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00391313>) (de Lamballerie et al. 2008a; Leyssen et al. 2006) a été mené à la Réunion (Océan Indien). Aucune différence statistique n'a été observée entre la chloroquine et les groupes placebo, tant sur la durée moyenne d'arthralgies fébriles que sur la virémie. Après 200 jours de traitements et d'observations, les patients traités avec la chloroquine souffraient toujours de douleurs arthralgiques comparés aux patients ayant recus un placebo. Cependant, le nombre de patients inclus dans l'étude était trop petit pour tirer des conclusions définitives au sujet l'effet de la chloroquine. Alors que l'inhibition in vitro de la réplication du CHIKV par la chloroquine est fortement observée, l'index thérapeutique étroit ainsi que l'absence d'amélioration biologique ou clinique, au cours d'un essai clinique, ne militent pas en faveur d'une utilisation thérapeutique dans les cas non compliqués. L'utilisation de la chloroquine à des fins de prophylaxie ou de traitement de cas grave d'infection au CHIKV nécessiterait de plus amples études, notamment sur un modèle animal primate non humain (Labadie et al. 2010).

### **2 Ribavirine**

La ribavirine montre une vaste activité inhibitrice in vitro contre les virus ARN avec des modes d'action différents selon les virus (Leyssen et al. 2006). Dans certains cas, elle inhibe l'IMP déshydrogénase, appauvrissant la synthèse GTP. Dans d'autres, elle est utilisée comme substrat non-canonique pour la synthèse de l'ARN qui introduit un certain nombre de mutations, dont l'accumulation peut provoquer l'inactivation du virus (Crotty et al. 2001; Severson et al. 2003). La ribavirine est utilisée en association avec l'interféron  $\alpha$  pour le

traitement de l'hépatite C (VHC), mais le mécanisme d'action est multifactoriel. Le mécanisme prédominant direct pour lequel la ribavirine exerce son activité antivirale in vitro contre des flavivirus et paramyxovirus est facilité par l'inhibition de l'IMP déshydrogénase (Leyssen *et al.* 2005). Dans le cas des Alphavirus, Le SINV a développé une résistance à la ribavirine (Scheidel *et al.* 1987). La résistance a été associée à une mutation sur la protéine nsP1 (Scheidel *et Stollar*, 1991). Il a été suggéré que le mutant codifie une modification de l'enzyme ARN guanylyltransferase qui a une grande affinité pour le GTP, cela favorise la réplication dans les cellules avec des niveaux réduits de GTP. Ceci est cohérent avec l'hypothèse que la ribavirine agit principalement comme un IMP inhibiteur de la déshydrogénase contre les Alphavirus. Dans d'autres cas, la Ribavirine est utilisée comme substrat non-canonique pour la synthèse de l'ARN, qui introduit un certain nombre de mutations dont l'accumulation peut provoquer l'inactivation du virus (Crotty *et al.* 2001; Severson *et al.* 2003).

La ribavirine est utilisée en association avec l'interféron  $\alpha$  pour le traitement de l'hépatite C (VHC), mais le mécanisme d'action est multifactoriel. Une combinaison d'interféron alpha et ribavirine montre une synergie sur l'inhibition in vitro de CHIKV (Briolant *et al.* 2004). Cependant, l'application clinique nécessitant une injection parentale est coûteuse et inimaginable pour une application à grande échelle, la rendant impropre à l'utilisation à grande échelle au cours des épidémies.

### **3 Carbodine**

Des études récentes sur la Cyclopentylcytosine ou Carbodine suggèrent son potentiel en tant qu'agent antiviral contre le Venezuelan equine encephalite virus (VEEV) (Julandera *et al.* 2008). On a montré que la carbodine peut inhiber la cytidine triphosphate synthétase cellulaire (CTP), qui a la fonction de convertir l'UTP en CTP, entraînant l'inhibition indirecte de la réplication du virus en réduisant le nombre CTP (de Clercq *et al.* 1990). En cultures cellulaires, la carbodine est un antiviral à large spectre (Andrei *et De Clercq*, 1990; Neyts *et al.*, 1996). Dans la nature les nucléosides sont dextrogyres (d), mais les deux formes d-et lévogyre (l)-analogues peuvent inhiber les enzymes métaboliques (Gumina *et al.* 2002), la différence étant que la forme L provoque une cytotoxicité importante alors que le D-énantiomère est responsable d'une cytotoxicité réduite. Par conséquent, la D-énantiomère a été récemment utilisée pour tester l'inhibition du VEEV en utilisant des souris infectées (Julandera *et al.* 2008). L'augmentation du taux de survie, plus grande augmentation de la durée moyenne de la vie et la réduction de la virémie dans le cerveau ont été observées, lorsque le traitement par carbodine a été réalisé sur des souris traitées avec le vaccin vivant atténué (TC83) de VEEV. La carbodine a une action inhibitrice jusqu'à 4 jours après l'infection.

## **B Vaccins anti-CHIKV**

Un vaccin vivant atténué, a été développé par passages successifs avec la lignée cellulaire MRC5 (fibroblastes humains) du CHIKV (Edelman *et al.* 2000). Ce vaccin s'est révélé hautement immunogène, mais sur certains essais de phase II, des volontaires ont développé une arthralgie transitoire. Au moins deux méthodes différentes sont actuellement en cours d'élaboration pour la production de vaccins sûrs et efficaces contre le CHIKV. Une méthode consiste à la préparation de virus purifiés et inactivés par des méthodes similaires à celles qui ont fait leurs preuves, pour le développement d'un vaccin inactivé contre le virus de l'encéphalite à tiques (Pavlova *et al.* 2003). Une deuxième méthode consiste à utiliser des fragments d'ADNc représentant d'importantes régions immunogènes du génome CHIKV (Muthumani *et al.* 2008).

## II Définition des modèles d'études

### A Arbidol

L'Arbidol (HZ2) a été développé par l'Institut de recherche pharmaceutique Russe dans les années 1990 (*Obrosova Serova et al. 1991*). Il est utilisé dans le traitement mais aussi dans la prévention des infections respiratoires virales sévères (influenza A et B, virus respiratoire syncytial (VRS, SARS) chez les adultes et les enfants (*Khamitov RA et al. 2008*). Dans la littérature, on retrouve d'autres virus sur lesquels l'Arbidol est actif (*Deng HY, et al. 2008*). Une équipe américaine a étudié les virus des hépatites B et C, ils ont démontré que cette molécule inhibe la fusion membranaire et donc l'entrée du virus dans la cellule. Ce mécanisme d'action a déjà été décrit pour le virus de la grippe. Une étude récente publiée par une équipe chinoise en 2007 démontre ainsi son efficacité sur plusieurs virus: influenza A, Virus Respiratoire Syncytial (VRS), rhinovirus (HRV), virus Coxsackie, Adénovirus (Shi L. et al. 2007). Les tests prenant en compte les résultats des IC<sub>50</sub> (concentration d'antiviral inhibant 50% de l'infection virale sur culture cellulaire) (Tab.1) ont démontré que le mécanisme d'actions de l'Arbidol est lié à la phase précoce du cycle réplcatif viral pour les virus enveloppes (absorption ou fusion) (*Shi L. et al. 2007*).

	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/ml)				
	FLU-A	RSV	HRV 14	CVB3	AdV-7
Drug added before infection	2.7 ± 1.0	8.7 ± 1.4	13.4 ± 1.3	12.7 ± 0.4	NR
Virucidal assay	4.3 ± 0.7	10.4 ± 1.1	13.8 ± 0.4	13.1 ± 0.6	NR
Drug added after infection	9.6 ± 1.0	11.5 ± 1.2	12.5 ± 1.7	9.5 ± 0.6	15.4 ± 0.3

<sup>a</sup> Mean ± S.D. values are shown from three independent experiments.

NR: IC<sub>50</sub> not reached.

IC<sub>50</sub> is the inhibitory concentration required to reduce viral replication by 50%.

Tab.1 : activité antivirale de l'Arbidol sur différents virus

### B VIRUS CHIKUNGUNYA

Le CHIKV est un Alphavirus de la famille des Togaviridae, il est transmis aux humains par piqûre de moustiques infectés, du genre *Aedes*. Le CHIKV a été découvert lors d'épidémies en Afrique de l'Est en 1952-1953. Il est responsable d'épidémies en Afrique, en Asie et en Océanie. Les études phylogénétiques des différentes souches de CHIKV ont suggéré une origine Africaine du virus et ont identifié trois lignages différents au plan génotypique: lignage ouest africain d'une part et lignage est/central-africain et asiatique (*Powers et al. 2000; Charrel R.N. et de Lamballerie 2006; de Lamballerie 2008*).

En 2005, une épidémie de CHIKV a sévi à l'île de la Réunion avec plus des 260000 cas (*Parola et al. 2006 ; D'Ortenzio et al. 2011*), le virus était encore transmis uniquement par le vecteur *Aedes aegypti* présent dans les régions tropicales ou sub tropicales. La mutation A226V du CHIKV, a permis la transmission du virus par un second vecteur : l'*Ae.albopictus* (*de Lamballerie et al. 2008b*), ce vecteur étant présent dans un grand nombre de pays et notamment en régions tempérées, on souligne ici l'importance de trouver des antiviraux contre le virus du Chikungunya (CHIKV).

### *III Stratégies expérimentales*

L'objectif de cette étude était de caractériser l'efficacité de l'Arbidol, sur la réplication virale du CHIKV et de préciser le mécanisme d'action. Nous avons utilisé, pour cela, deux lignées cellulaires, les VERO (lignée cellulaire immortelle (cellules rénales de singe vert africain (*Cercopithecus aethiops*)) et le MRC5 (lignée de cellules primaires ; fibroblastes humains) (Krejlich-Trotot P., 2011).

La première lignée a été utilisée car c'est un modèle cellulaire bien caractérisé, la seconde lignée a été utilisée pour être plus proche de la situation in vivo puis qu'il s'agit de cellule d'origine humaine.

Les différents points de notre stratégie expérimentale sont :

- Cinétique d'action de l'Arbidol sur la réplication virale du CHIKV, incubant l'Arbidol (HZ2) à différents temps avant, pendant et après l'infection, nous avons constaté que l'inhibition était plus efficace avant l'infection, et donc avant l'entrée du virus dans les cellules.
- Étudiées les effets des différents métabolites de l'Arbidol (HZ2) sur la réplication viral du CHIKV HZ1 et HZ3.
- Déterminer l'IC<sub>50</sub>.
- Sélectionner un mutant résistant. Grâce à la pression de la molécule, a été sélectionné un mutant capable d'échapper à la réponse thérapeutique.
- Caractériser le mutant
  1. Séquençage.
  2. Comparer les cinétiques de réplication entre les souches mutant et wild type (WT).

Dans le but de connaître les gènes impliqués à déterminer la résistance, ainsi que mécanisme d'action a été impliqué, une fois obtenu la souche résistante il a été identifié la mutation en position G407R (E2).

- Construction IC: Pour comparer la souche sauvage avec la nouvelle souche résistante un nouveau clone infectieux (IC) à été développé.
- Le clone infectieux (IC) de la souche LR2006 OPY1 CHIKV (CHIKV-LR<sub>ic</sub>) a été aimablement fourni par le Pr. S. Higgs (Tsetsarkin et al. 2006). Nous avons changé le promoteur SP6 par un promoteur CMV qui permet la synthèse d'ARN in cellulo. Le promoteur CMV est suivi du génome complet du CHIKV terminer par le ribozyme de HDV (hépatites delta virus) qui permet à l'ARN viral d'être coupé juste à la fin de la queue poly A du génome viral. Pour permettre la multiplication du clone Infectieux ainsi que la selection de celui-ci, une partie plasmidique contenant une origine de réplication pBR322 et un gène de résistance à l'ampicilline sont venu refermer le clone infectieux. Le clone infectieux Tonile obtenu, nous avons introduit la mutation G407R pour obtenir le clone infectieux Tonile-ARB. Les deux clones infectieux ont été obtenus par des techniques classiques de biologie moléculaire. Les différents fragments des clones infectieux ont été obtenus par PCR, et les constructions ont été monté à l'aide d'enzyme de restriction de ligation. Pour le clone infectieux Tonile-ARB, les amplicons contenant la mutation ont été digérés et insérés entre les sites de restriction uniques Agel et XhoI de l'IC Tonile (Vanlaningham et al. 2005). Le Tonile et les clones Tonile-ARB infectieux ont été séquencés complètement afin de valider qu'il n'y avait pas des erreurs dans les constructions.

## A Tests d'efficacité in vitro

### 1 Matériels et méthodes

L'Arbidol (HZ2) et deux métabolites dérivés, le HZ1 (6-bromo-4-(diméthylamino)-5-hydroxy-1-méthyl-2-(phenylsulphonylmethyl)-1H-indole-3-carboxylate) et le HZ3 (6-bromo-4-diméthylamino)-5-hydroxy-1-méthyl-2-(methylphenylsulphoxyde)-1H-indole-3-carboxylate) (Fig. 2) ont été fournis par Stragen Pharma SA (Genève, Suisse). Les poudres du HZ2, HZ1 et HZ3 ont été dissoutes dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) à une concentration finale de 10 mg / ml suivie d'une dilution dans de l'eau distillée stérile à 1 mg / ml et stockage à -20°C.

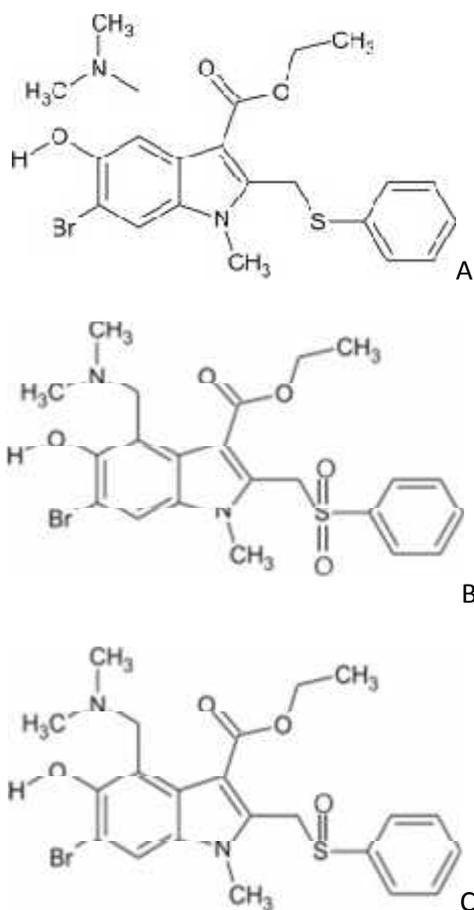


Fig.2 structures chimiques HZ2 (A), HZ1 (B) and HZ3 (C)

#### a) Cellules et virus

Les cellules MRC5 (fibroblastes humains) sont maintenues à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, dans le milieu de culture BME additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 100 U/ml de Pénicilline, 100 U/ml de Streptomycine, 2 mM de Glutamine et de 100 U/ml de Fungizone. Les cellules HEK-293 (cellules embryonnaires humaines de rein), utilisé uniquement pour la transfection du IC (Tonile-ARB) sont maintenues à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, dans le milieu de culture DMEM additionné de 4.5 g/l of D-glucose, 1 mM pyruvate de sodium et 2 mM de Glutamine, additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) 100 U/ml de Pénicilline, 100 U/ml de Streptomycine. Les cellules VERO (cellules rénales de singe vert africain

(*Cercopithecus aethiops*) sont maintenues à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, dans le milieu de culture MEM + 1% Peni/Streptomycine + 1% Glutamine + 7% SVF décomplémenté.

La souche de CHIKV utilisée est LR2006 OPY1 (CHIKV-OPY1, NC004162), elle a été isolée, suite à l'épidémie de fin 2005 à la Réunion, par le laboratoire de virologie de l'hôpital La Timone à Marseille (*Tsetsarkin K. et al. 2006*).

### b) Test de cytotoxicité de l'Arbidol HZ2 sur les cellules MRC5 et VERO

La cytotoxicité de l'Arbidol HZ2 pour les cellules MRC5 et Vero a été évaluée en utilisant le rouge neutre (NR) pour les dosages de l'absorption du colorant et les observations microscopiques (*Repetto et al. 2008*). Nous avons utilisé des Plaques 96 puits MRC5 et Vero confluentes avec des concentrations variables d'Arbidol HZ2 (0 à 100 µg / ml), les plaques ont été incubées à 37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub> pendant 18 ou 48 heures (respectivement pour les cellules MRC5 ou Vero), nous avons ensuite ajouté à chaque puits du rouge neutre (40µg/ml). Après 3 heures d'incubation, le colorant a été lavé avec une solution d'éthanol acidifié puis les densités optiques (DO) ont été lues avec un spectrophotomètre pour microplaques à 540 nm (TECAN Sunrise). Les résultats sont exprimés en CC<sub>50</sub> qui est la concentration de la molécule qui induit la mort de 50% des cellules.

### c) Les Tests d'infection des cellules MRC5 par le CHIKV

Pour déterminer l'IC<sub>50</sub> par analyse immunofluorescence indirecte (IFI), les cellules MRC-5 ont été cultivées sur LabTek II Chamber Slide System 8 Welles (Nalge nunc internationale) Nous avons aussi utilisé le test de TCID<sub>50</sub>, valeur quantitative d'un agent pathogène produisant un changement pathologique dans 50% des les cellules inoculées, exprimé en TCID<sub>50</sub>/ml.

#### IFI (Immunofluorescence Indirecte)

On a utilisé le système LabTek II Chamber Slide System 8 Welles (Nalge nunc international). (Annexe 1).

Les cellules MRC5, à 80% ou 100% de confluence sont incubées pendant 1 heure à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> avec 250µl de CHIKV à différentes dilutions (1/100ème, 1/200ème, 1/1000ème, 1/2000ème, 1/10000ème, 1/20000ème, 1/100000ème) (Fig. 3).

	CHIKV 1/100 <sup>ème</sup>	CHIKV 1/200 <sup>ème</sup>	CHIKV 1/1000 <sup>ème</sup>	CHIKV 1/2000 <sup>ème</sup>
	T-	CHIKV 1/10000 <sup>ème</sup>	CHIKV 1/20000 <sup>ème</sup>	CHIKV 1/100000 <sup>ème</sup>

Fig. 3 : plan de lame LabTek utilisé pour les test d'infection des MRC5 par le CHIKV

Dans chaque puits : 250µl de virus CHIKV-Opy1 dilué dans du BME semi gélifié

Pour le T- : témoin négatif : 250µl de milieu BME semi gélifié sans virus

Ensuite le surnageant est éliminé et après un rinçage des cellules au HBSS (GIBCO), il est remplacé par 250µl de milieu de culture semi gélifié (METHOCULT™ H4100 : gel ralentissant la lyse des cellules par le virus) additionné de 10% de sérum de veau fœtal, 100 U/ml de Pénicilline, 100 U/ml de Streptomycine, 2 Mm de Glutamine, 100 U/ml de Fung zone. Après 48 heures à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, les surnageant sont éliminés et les cellules sont rincées au HBSS. Après retrait du système d'incubation des Labre, les lames sont rincées trois fois pour 5 minutes avec du Phosphate Buffer Salin(PBS), suivi d'un rinçage rapide de 10 secondes avec de l'eau distillée puis incubées 20 minutes dans de l'acétone afin de fixer les cellules aux lames. Les lames sont révélées par immunofluorescence indirecte : après une

incubation de 30 minutes en chambre humide à 37°C avec un sérum de patient immunisé contre le CHIKV, dilué au 1/20 dans du PBS, les lames sont rincées deux fois pour 5 minutes avec du PBS et une fois 10 secondes environ à l'eau distillée. Elles sont ensuite incubées 30 minutes en chambre humide à 37°C avec un anticorps secondaire anti-IgM humaine (Fluoline G, BioMérieux) et du Bleu d'Evans, les deux dilués au 1/400 dans du PBS. Après un rinçage identique au premier, les lames sont montées et lues au microscope à fluorescence. On estime le pourcentage de cellules infectées pour chaque puits, par observation au grossissement x20 du microscope à fluorescence. (Fig. 4 et 5).



Fig.4 : Exemple d'immunofluorescence négative

Cellules MRC5

Microscope à fluorescence au grossissement X20

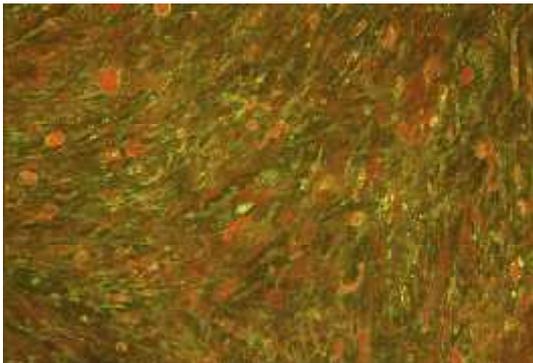


Fig.5 : Exemple d'immunofluorescence positive

Cellules MRC5

Microscope à fluorescence au grossissement X20

Ce test a été réalisé 8 fois. Il permet d'obtenir la concentration de CHIKV qui infecte environ 50% des cellules MRC5 sur système LabTek à 48h post d'infection. Cette concentration sera la notre dilution de référence pour tous les autres tests.

#### **d) Test de sensibilité du CHIKV-Opy1 à l'Arbidol**

On a utilisé le même système LabTek afin de déterminer la concentration d'Arbidol qui permet l'inhibition de 50% de l'infection par le CHIKV sur les cellules MRC5. L'Arbidol a été fourni par le laboratoire Stragen Pharma, il a été solubilisé dans 100µl de DMSO (dimethylsulfoxyde), dilué dans de l'eau stérile à une concentration de 300µl/ml et stocké à -20°C. Les cellules MRC5, à 80% ou 100% de confluence sont incubées 1 heure à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> avec 250µl de virus CHIKV-Opy1 dilué au 1/2000ième. Puis le surnageant est éliminé et après un rinçage des cellules au HBSS (GIBCO), il est remplacé par 250µl de milieu de culture semi gélifié (METHOCULT™ H4100 : gel ralentissant la lyse des cellules par le virus) additionné de 10% de sérum de veau fœtal, 100 U/ml de Penicilline, 100 U/ml de Streptomycine, 2 Mm de Glutamine, 100 U/ml de Fungizone ainsi que de différentes concentrations de Arbidol (0,9 ; 1,8 ; 3,75 ; 7,5 ; 15 et 30µg/ml) (Fig. 6).

	T+	V + AV 0,9µg/ml	V + AV 1,8µg/ml	V + AV 3,7µg/ml
	T-	V + AV 7,5µg/ml	V + AV 15µg/ml	V + AV 30µg/ml

Fig. 6: plan de lame utilisé

T+ : témoin positif : 250µl de CHIKV-Opy1 à la dilution 1/2000<sup>ème</sup> dilué dans du BME semi gélifié

T- : témoin négatif : 250µl de BME semi gélifié sans virus

Après 48 heures à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, les surnageants sont éliminés et les cellules sont rincées au HBSS. Après retrait du système d'incubation des LabTek, les lames sont rincées trois fois pour 5 minutes avec du Phosphate Buffer Salin(PBS), suivi d'un rinçage rapide de 10 secondes avec de l'eau distillée puis incubées 20 minutes dans de l'acétone afin de fixer les cellules aux lames. Les lames sont révélées par immunofluorescence indirecte. Après une incubation de 30 minutes en chambre humide à 37°C avec un sérum de patient immunisé contre le CHIKV, dilué au 1/20 dans du PBS, les lames sont rincées deux fois 5 minutes au PBS et une fois 10 secondes environ à l'eau distillée. Elles sont ensuite incubées 30 minutes en chambre humide à 37°C avec un anticorps secondaire anti-IgG humaine (Fluoline G\*, BioMérieux) et du Bleu d'Evans, les deux dilués au 1/400 dans du PBS. Après un rinçage identique au premier, les lames sont montées et lues au microscope à fluorescence. On estime le pourcentage de cellules infectées pour chaque puits, par observation au grossissement x20 du microscope à fluorescence. L'IC50 est calculé grâce à la droite de régression issue du calcul du pourcentage d'inhibition (rapport du % d'infection mesuré sur le % d'infection sans Arbidol)

$$\% \text{ d'inhibition} = [(A \times \ln(\text{concentration en STR } 108))] + B$$

Après l'obtention de A et B par régression linéaire, on calcule l'IC50, c'est-à-dire la concentration d'Arbidol qui entraîne 50% d'inhibition grâce à l'équation de la droite. Ce test a été effectué N8 fois.

En parallèle, nous avons évalué l'IC<sub>50</sub> sur un autre support cellulaire: les plaques 12 puits (FALCON) et aussi sur d'autres cellules BGM (cellules de foie de singe), Hep-2(cellules de lignée tumorale humaine). Dans un premier temps, il faut déterminer la dilution de virus qui infecte environ 50% des cellules. Les cellules MRC5, BGM et Hep, à 80% ou 100% de confluence sont incubées 1 heure à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> avec 500µl de virus CHIKV-Opy1 dilué au 1/100<sup>ième</sup>, 1/1000<sup>ème</sup>, 1/10000<sup>ème</sup>, 1/100000<sup>ème</sup> et 1/1000000<sup>ème</sup>. Puis le surnageant est éliminé et après un rinçage des cellules au HBSS (GIBCO), il est remplacé par 1ml de milieu de culture additionné de 10% de sérum de veau fœtal, 100 U/ml de Pénicilline, 100 U/ml de Streptomycine, 2 Mm de Glutamine, 100 U/ml de Fungizone. Après 48 heures à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, les surnageants sont éliminés et les cellules sont rincées au HBSS. 500µl de trypsine sont ajoutés, on incube à 37°C jusqu'à ce que les cellules soient complètement décollées, on ajoute alors 1,5ml de milieu de culture pour inhiber l'action de la trypsine. On met 150µl de chaque échantillon dans un FUNNEL de SHANDON. On centrifuge 3minutes à 900 rpm. Après avoir séché et fixé les lames, on réalise un test d'immunofluorescence indirecte décrit précédemment. Une fois cette dilution déterminée pour chaque type cellulaire, on teste l'efficacité de l'Arbidol en utilisant le même procédé et en ajoutant les concentrations d'antiviral (0,9 ; 1,8 ; 3,75 ; 7,5 ; 15 et 30µg/ml) 1h après l'infection des cellules. Ce test a été réalisé 1 fois.

### e) Test de sensibilité du CHIKV-Opy1 à l'Arbidol activé

Une équipe russe (Obrosova-Serova NP. et al. 1991) a démontré que cette molécule est plus efficace sur le virus de la grippe si on l'incube au préalable 12h à 37°C avant d'infecter les cellules. Pour cela, on a utilisé le système LabTek et la même procédure décrite

précédemment et on prépare les dilutions d'Arbidol dans le même milieu 12h avant l'infection des cellules, on l'incube à 37°C. Ce test a été réalisé 5 fois.

#### **f) Test de sensibilité du CHIKV-Opy1 aux métabolites de l'Arbidol**

Le laboratoire STRAGENE nous a fourni 2 métabolites d'origine chimique du HZ1 et HZ3. Pour les tester on a utilisé la même procédure que celle utilisée pour tester l'Arbidol et aux mêmes concentrations. Ce test a été réalisé 5 fois.

#### **g) Test cinétique de l'activité de l'Arbidol sur le CHIKV-Opy1**

Traitement antiviral avant infection virale: les cellules dans le système LabTek sont incubées avec 250µl de Arbidol aux mêmes concentrations décrites précédemment 1, 3, 5, 8, 24h avant l'infection par le virus. Après 1h d'incubation pour l'adsorption virale, les cellules sont débarrassées du surnageant, rincées au HBSS et rée-incubées avec 250µl d'Arbidol pendant 48h. La détermination de l'IC<sub>50</sub> est réalisée par immunofluorescence indirecte com décrite précédemment. Ce test a été réalisé 5 fois.

Traitement antiviral et infection virale simultanés Le virus est dilué dans du milieu dans lequel il a déjà été dilué l'Arbidol dans ses différentes concentrations. Les cellules sont infectées avec cette suspension (virus+antiviral). Après 1h d'incubation pour l'adsorption virale, les cellules sont débarrassées du surnageant, rincées au HBSS et rée-incubées avec 250µl d'Arbidol pendant 48h. La détermination de l'IC<sub>50</sub> est réalisée par IFI com décrite précédemment. Ce test a été répliqué 5 fois.

## **B Effet direct de l'Arbidol sur le virus**

Le virus et l'Arbidol ont été incubés ensemble dans du milieu de culture cellulaire pendant 30 et 60 min avant l'infection des cellules avec 250µl de cette suspension. Après 1 heure d'incubation pour l'adsorption virale, les cellules sont débarrassées du surnageant, rincées au HBSS et rée-incubées avec de l'Arbidol aux différentes concentrations pendant 48h. La détermination de l'IC<sub>50</sub> est réalisée par IFI décrite précédemment. Ce test a été répliqué 3 fois.

### **1 Obtention d'un CHIKV mutant Arbidol résistant (CHIKV-Opy1-ARB)**

Il s'agit de repasser un certain nombre de fois le CHIKV sur des cellules en présence d'Arbidol en débutant par une faible concentration pour arriver à une concentration importante d'antiviral. Enfin que le virus s'adapte à la pression de sélection imposée par l'antiviral, cela pour pouvoir observer cette adaptation au niveau moléculaire.

On a utilise des plaques 12 puits (FALCON), le virus est passé en multiplicité d'infection (dilutions à 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> et 10<sup>-6</sup>), avec une concentration d'antiviral 3,5µg/ml en parallèle à un test sans antiviral. On récupère le surnageant de la dernière dilution de virus dont l'effet cytopathogène est observable au microscope. Ce dernier est ensuite utilisé pour être repassé en multiplicité d'infection (dilutions à 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> et 10<sup>-6</sup>), avec les concentrations d'antiviral augmentées (3,5 4,5 et 5,5). Le même schéma est réalisé avec une augmentation de la concentration de 1 et 2µg/ml. On récupère le surnageant du passage 17 avec 30µg/ml d'Arbidol, et congèle à -80°C. L'IC<sub>50</sub> d'Arbidol pour ce mutant en s'appuyant sur la même procédure utilisée pour le virus sauvage.

### **2 Séquençage du génome complet du CHIKV mutant résistant à l'Arbidol**

Pour obtenir les ARN viraux, 100µl de surnageant sont extraits (EZ1 Virus Mini kit V2.0 sur BioRobot EZ1, QIAGEN ; volume d'éluion : 60µl) puis après transcription inverse (Reverse Transcriptase Multiscribe™, Applied Biosystems Roche, avec randoms hexamers), l'ADN

complémentaire est amplifié par PCR avec 18 couples (Annexe.2) d'amorces qui permettent l'obtention du génome complet de CHIKV (Taq DNA Hi Fi Polymerase, Invitrogen, avec température d'hybridation entre 45 et 60°C). Après vérification des produits de PCR, par migration sur gel d'agarose 1,5% en parallèle d'un marqueur de poids moléculaire (1 kb DNA Ladder, Biolabs), ces derniers sont séquencés. Les chromatogrammes ainsi obtenus sont analysés avec le logiciel Séquencer 4.7 (Gene codes corporation, Ann Arbor, USA).

### 3 Construction de l'IC Tonile

Notre clone infectieux (nommé IC Tonile) dérive du clone infectieux pCHIK-LR (Fig.21) construit par l'équipe du Pr. Higgs à Galveston au Texas (Tsetsarkin et al. 2006). Nous avons remplacé le promoteur SP6 par un promoteur CMV (pCMV) qui permet la synthèse d'ARN *in cellulo*. Nous avons également ajouté le ribozyme du virus de l'hépatite delta (HDV ribozyme) qui permet à l'ARN viral d'être coupé juste à la fin de la queue poly A du génome viral puis remplacé la partie plasmidique qui dérive désormais d'un pBR322 avec un gène de résistance à l'ampicilline (Fig.22).

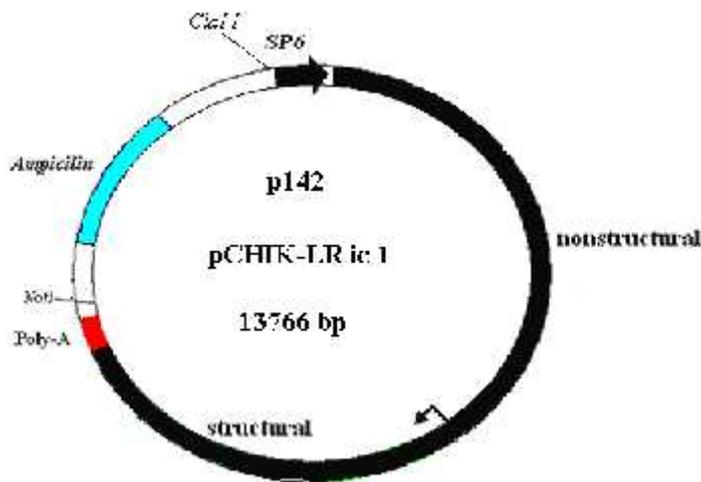


Fig21 Représente en schéma le pCHIK-LR

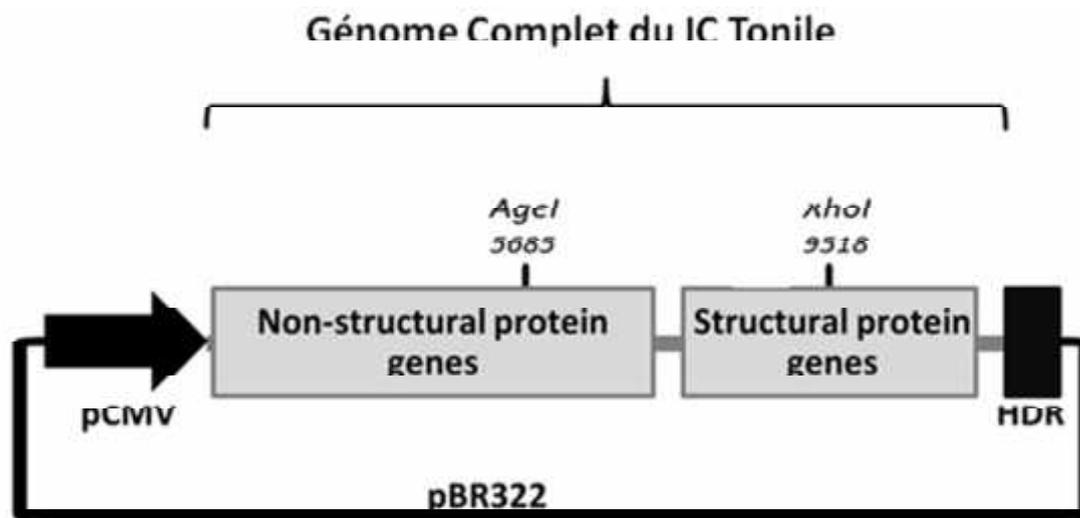


Fig.22 Schéma du clone infectieux CHIKV Tonile

Afin d'obtenir ce clone infectieux, différents fragments ont été obtenus par PCR (Herculase II Fusion; Stragene) à partir de pCHIK-LR et d'un clone infectieux d'Enterovirus obtenu au laboratoire (pour la partie plasmidique, le pCMV et le HDV ribozyme). Les différents fragments obtenus sont détaillés en figure 23 (A, B, C, D et E). Les fragments A et B ont été

ensuite fusionnés à l'aide de l'enzyme de restriction NotI (digestion, purification sur gel, ligation avec la T4 DNA Ligase). Les fragments C et D ont également été fusionnés grâce à l'enzyme de restriction HindIII puis le nouveau fragment obtenu (CD) fusionné au fragment E à l'aide de l'enzyme de restriction XhoI (digestion, purification sur gel, ligation avec la T4 DNA Ligase). Après une ligation « blunt » pour AB avec de la T4 DNA ligase qui contient le pBR322 et amplification de CDE par PCR (Herculase II Fusion; Stragene), ces deux fragments ont été digérés par BamHI et AvrII, purifiés sur gel et ligués (T4 DNA Ligase). Suite à la transformation de la ligation dans des bactéries STBL4 electrocompetentes (Invitrogen), des colonies résistantes à l'ampicilline ont été obtenus. Après leur repiquage en milieu liquide, 60 colonies ont été criblées par PCR (Taq Invitrogen) avec deux systèmes à cheval sur les sites de restriction BamHI et AvrII. Les 14 clones doublement positifs ont été congelés, puis les plasmides purifiés par miniprep (Qiagen). Après vérification de l'intégrité des clones par carte de restriction (Nhe) et par PCR (Taq Invitrogen), un clone a été choisi, puis produit en grande quantité (Midiprep, Macherey Nagel) et enfin séquencé entièrement (BigDye Terminator v1.1, AB). Ce clone infectieux, nommé IC-Tonile, a ensuite été transfecté (Fugène6, Roche) directement dans des cellules Vero (75% confluentes). Après rinçage des cellules avec HBSS et 3 heures et incubation des cellules 4 jours à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub>, le virus issu du clone infectieux a produit un effet cytopathique. Afin de vérifier l'intégrité du virus, ce dernier a été repassé 2 fois au 1/1000 sur cellules Vero puis testé en qRT-PCR (surnageant) et immunofluorescence (cellules) tous deux positifs à chaque passage.

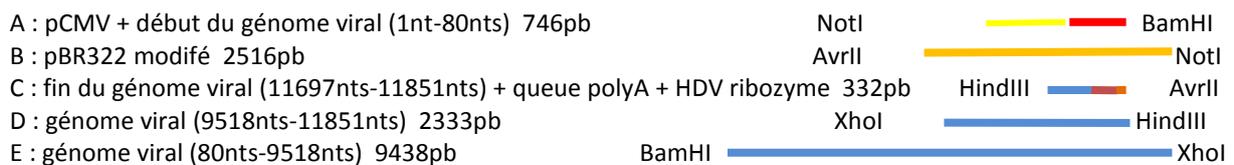


Fig.23 Schéma de la digestion de chaque fragment.

#### 4 Insertion de la mutation G407R dans le IC Tonile

Dans le nouveau IC (Tonile) la mutation G407R a été insérée afin de obtenir le clone infectieux, appelé Tonile-ARB, construit par des techniques classiques de biologie moléculaire. Les fragments de PCR contenant la mutation ont été clonés et insérés entre les sites uniques de restriction AgeI et XhoI existantes dans le plasmide Tonile (Vanlaningham et al. 2005). Les clones: Tonile et Tonile-ARB ont été entièrement séquencés pour vérifier que nous avons toujours eu les bonnes séquences.

##### a) Construction de l'IC Tonile-ARB

Pour insérer la mutation G407R dans le clone infectieux Tonile il a été nécessaire de rechercher dans les environs de la mutation en position 8785 nts deux sites de restriction uniques, de manière à libérer l'amplicon sans la mutation, pour faciliter l'insertion de l'amplicon contenant la mutation, coupe avec les enzymes de restriction AgeI en position 5685 nts et XhoI en position 9518 nts, obtenant donc un amplicon de 3833 pb.

##### b) Construction de l'amplicon de 3833 pb

L'amplicon de 3833 pb a été construit en trois étapes :

Première étape: le fragment qui commence à 5685 nts jusqu'à 8785 nts, a été obtenu par PCR avec le kit pFu Ultra II HS Fusion DNA Polymerase (STRAGENE) en utilisant le système d'amorces FAgeI 5685/RMut8785 (Annexe3).

Deuxième étape: le deuxième fragment qui commence à 8785 nts jusqu'à 9518 nts a été obtenu par PCR avec le kit pFu Ultra II HS Fusion DNA Polymerase (STRAGENE) en utilisant le système d'amorces FMut8785/RXhoI9518 (Annexe3).

Troisième étape: les deux fragments, obtenus ont été purifiés par le kit QIAquick PCR Purification Kit (250) (QIAGEN), les deux fragments ont été additionnés par PCR de fusion par le kit pFu Ultra II HS Fusion DNA Polymerase (STRAGENE) en utilisant le système d'amorces FAgeI 5685/RXhoI9518(Annexe3).

### **c) Assemblage**

Une fois obtenu, l'amplicon de 3833 pb a été purifié par le kit QIAquick PCR Purification Kit (250) (QIAGEN), ensuite évalué la présence de la mutation en position 8785 nts par séquençage (BigDye Terminator v1.1). Pour insérer l'amplicon 3833 pb muté, il a été nécessaire de digérer simultanément dans un tube l'IC Tonile par les enzymes de restriction AgeI en position 5685 nts et XhoI en position 9518 nts avec le TamponI durant 3h à 37°C et dans un autre tube l'amplicon 3833 pb muté a été digéré par la même procédure que celle décrite ci-dessus. Pour séparer les fragments obtenus par digestion enzymatique de l'IC Tonile, nous avons procédé avec une purification sur gel avec le Kit Purification Gel (QIAGEN). Après séparation sur gel des fragments de digestion de 11453pb et de 3833pb, la bande à 11453pb est récupérée. L'amplicon de 3833 pb, digéré est purifié sur colonne avec le kit PCR Purification Kit (250) (QIAGEN).

### **d) Ligation, Transformation et Transfection**

Pour sélectionner les constructions viables, 1.5µl de produit de la ligation est transformé dans 50µl de bactéries électrocompétantes Stbl4 (ElectroMAX™ Stbl4™ Competent Cells INVITROGENE). Après une période d'incubation, sur boîte de petri, de 24h à 30°C, les différentes colonies observées sont criblées par PCR (Taq INVITROGENE) à l'aide de primers chevauchant la partie de 11453 pb et l'insert de 3833pb. Sur un totale de 300 colonies qui ont été testées par PCR (Taq INVITROGENE), environ 54 colonies positives, qui ont été criblées. Trois colonies positives ont été utilisées pour continuer mon travail, et la mise en production pour chacune des 3 colonies a été faite par (QIAGEN Plasmid Midi Kit (25)) midiprep à partir d'une culture dans 250mL LB plus ampicilline 1/1000 24h à 30°C.

Afin de vérifier la présence de la mutation en position 8785nts, les produits de PCR entourant cette région ont été séquencés (BigDye Terminator v1.1). Pour finir nous avons sélectionné un seul clone que nous avons séquencé entièrement.

Après dosage du clone infectieux obtenu, nous l'avons transfecter dans les cellules HEK-293 (cellules rénales embryonnaires humaines). Nous avons utilisé ces cellules, notamment pour la production de véhicules pour le transfert de gènes. Nous avons utilisé pour la transfection la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) avec ratio 1 µg de ADN pour 1.5µl de Lipofectamine. Après incubation de 4h, trois lavages sont effectués avec du HBSS, le milieu est ainsi remplacé par du DMEM additionné 30 µg/ml d'Arbidol et l'incubation ce poursuit durant 16h. Les surnageants récupérés sont repassés en multiplicité d'infection, après 24h d'incubation, les surnageants sont aliquotés dans des tubes de 1.5ml stockés à -80°C.

200µl de surnageant de l'infections ont été utilisés pour extraire l'ARN viral (EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (48)) puis testée par RT-PCR quantitative (Applied Biosystems Roche; Taq Man Reverse Transcription Reagents) et totalement séquencé. Les chromatogrammes ainsi obtenus sont analysés avec le logiciel Sequencher 4.7 (Gene codes corporation, Ann Arbor, USA) pour être sûre d'avoir la bonne séquence (Fig25).

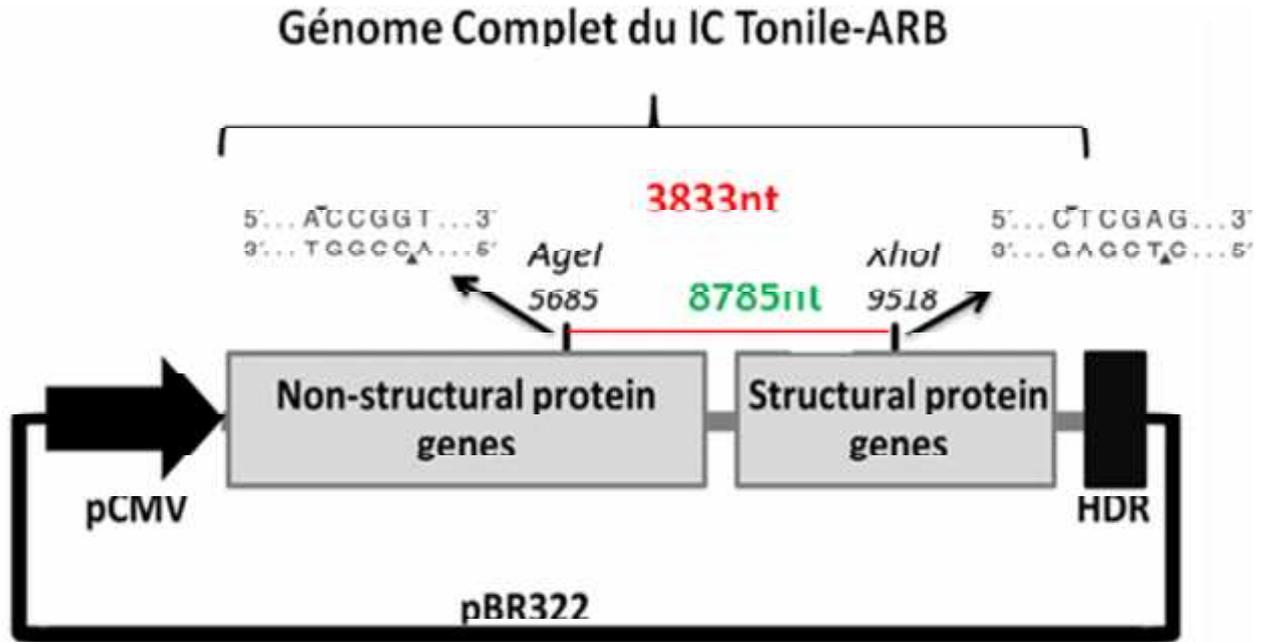


Fig.25 Génome complet du IC Tonile-ARB

- **TCID<sub>50</sub>**

Les titres de virus ont été déterminés par le Dose50 Tissue Culture Infectieuse (TCID<sub>50</sub>), le titrage du virus a été effectué avec des plaques à 96 puits « ELISA » à fond rond, les cellules Vero doit être confluentes à 80% donc après la décongélation des souches :

LR2006-OPY1 (CHIKV WT)

CHIKV-ARB (mutante résistant à l'Arbidol)

Tonile (clone infectieux)

Tonile-ARB (clone infectieux avec la mutation)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Fig.26 Représentation de la plaque à 96 puits

Par chaque souche :

On a préparé en premier les dilutions de virus dans la plaque 96 puits dans chaque puits, il y a 150µl de milieu+Virus, incubé à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub>. Les manipulations ont été produites en double. Pendant 7 jours elles ont été observées au microscope pour vérifier la présence d'un CPE. Pour chaque échantillon le surnageant, de toutes les dilutions ont été exprimées en TCID<sub>50</sub>/ml en utilisant les formules Karber.

Calcul TCID<sub>50</sub> = 10<sup>log dilution au dessus de 50% - (I x h)</sup>

I=h (%dilution >50%-50% / %dilution>50% - % dilution <50%)

Dilutions des souches virales il y a une valeur de : MOIs à partir de 1 à 0.0001 TCID<sub>50</sub>/cellule.

**e) Détermination IC<sub>50</sub> en utilisant l'analyse comparative RT-PCR quantitative**

Une fois qu'on a la concentration pour chaque souche virale capable d'infecter 50% des cellules, en utilisant cette concentration virale pour préparer deux plaques 96 puits, pour chaque souche virale avec 150µl de milieu+Virus, incubé à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub> après 1h de l'infection on a mis l'antiviral Arbidol en suspension dans un milieu de culture et incubé pendant 24h à 37°C.

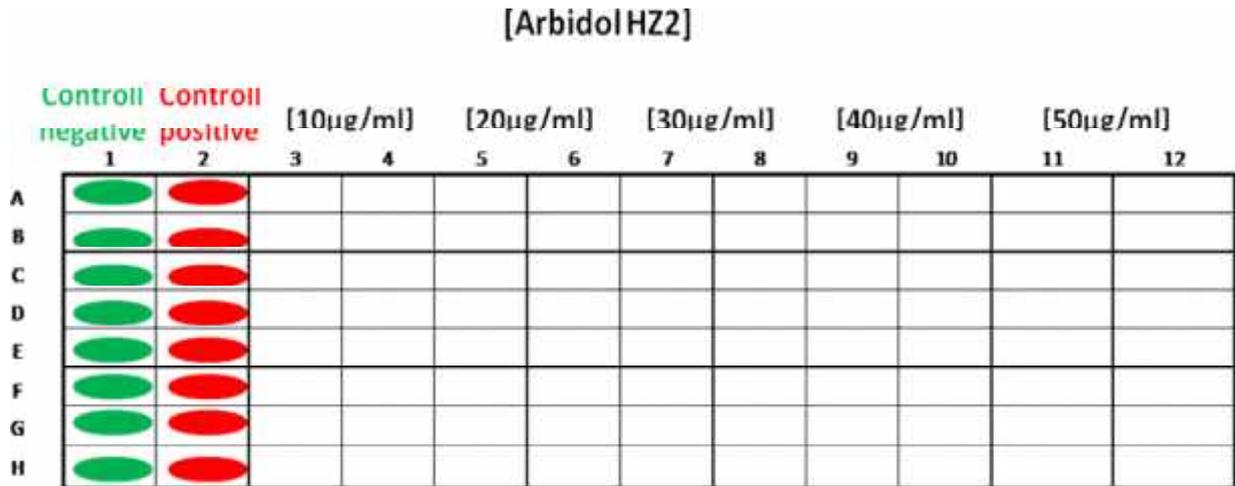


Fig27 Plaque utilisé pour le test d'efficacité de l'Arbidol

Le lendemain on a regardé au microscope les plaques infectées, prélevés 200µl pour chaque puits de toutes les souches virales, lequel on a extrait l'ARN viral avec (EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (48)). Ensuite sont été toutes testées par RT-PCR quantitative (Applied Biosystems Roche; Taq Man Reverse Transcription Reagents).

# **CHAPITRE III: RESULTATS**

## ARTICLE 1

### AVANT-PROPOS

#### **«*In vitro* antiviral activity of arbidol against Chikungunya virus and characteristics of a selected resistant mutant»**

L'Arbidol (HZ2) a été développé par l'Institut de recherche pharmaceutique Russe dans les années 1990. Démontre une activité antivirale pour les virus de la grippe A et B, mais également un effet clinique dans la prévention des infections respiratoires virales sévères (Panisheva, 1988 ; Khamitov RA. et al. 2008) (influenza A et B, virus respiratoire syncytial VRS ; SARS).

Dans cette étude, nous avons étudié l'effet antiviral *in vitro* du HZ2 sur la réplication du virus Chikungunya (CHIKV).

L'Arbidol HZ2 a une activité inhibitrice sur la réplication du CHIKV dans des cellules Vero et MRC ( $IC_{50} < 10 \mu\text{g} / \text{ml}$ ). Un mutant résistant CHIKV a été obtenu et adapté à la culture en présence de  $30 \mu\text{g} / \text{ml}$  HZ2 dans les cellules MRC5. Après analyse de la séquence complète de ce mutant, une seule mutation à niveau de l'acide aminé (G407R) localisée dans la protéine d'enveloppe E2 a été identifiée. Pour confirmer son rôle dans le mécanisme moléculaire de la résistance à l'HZ2 la mutation G407R a été insérée dans le clone infectieux du CHIKV Tonile, et nous avons pu vérifier que cette mutation transférait le phénotype de résistance. Enfin, nos résultats démontrent l'efficacité *in vitro* de l'activité antivirale du HZ2 contre le CHIKV, donnent quelques pistes pour mieux comprendre le mécanisme moléculaire de la résistance à l'HZ2.

Article accepted: Antiviral Research 90 (2011) 99–107

# In vitro antiviral activity of arbidol against Chikungunya virus and characteristics of a selected resistant mutant

Ilenia Deloqui<sup>1</sup>, Boris Pastorino<sup>1,3</sup>, Cécile Baronti, Antoine Nougairède, Emilie Bonnet, Xavier de Lamballerie

Unité des Virus Emergents, UMR190 "Emergence des pathologies virales" Université de la Méditerranée, Institut de Recherche pour le Développement, IHSP French School of Public Health, Faculté de Médecine, Marseille, France

## article info

Article history:  
Received 20 February 2011  
Revised 14 March 2011  
Accepted 17 March 2011  
Available online 1 April 2011

Keywords:  
Chikungunya virus  
Arbidol  
Antiviral  
Arbidol resistance  
Mutant

## abstract

Arbidol (ARB) is an antiviral drug originally licensed in Russia for use against influenza and other respiratory viral infections. Although its broad spectrum antiviral activity has been reported for this drug, there is until now no data regarding its effects against alphavirus infection. Here, the in vitro antiviral effect of ARB on Chikungunya virus (CHIKV) replication was investigated and this compound was found to present potent inhibitory activity against the virus propagated onto immortalized Vero cells or primary human fibroblasts (MRC-5 lung cells) ( $IC_{50} = 10.1 \mu\text{g/ml}$ ). A CHIKV resistant mutant was then selected and adapted to growth in the presence of 30  $\mu\text{g/ml}$  ARB in MRC5 cells; its complete sequence analysis revealed a single amino acid substitution (G407R) localized in the E2 envelope protein. To confirm the G407R role in the molecular mechanism of ARB resistance, a CHIKV infectious clone harboring the same substitution was engineered, tested, and was found to display a similar level of resistance. Finally, our results demonstrated the effective in vitro antiviral activity of ARB against CHIKV and gave some tracks to understand the molecular basis of ARB activity.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Chikungunya virus (CHIKV) is an arthropod-borne viral disease first described in Tanzania in 1952 (Robinson, 1955) which has reemerged since 2005 in Eastern Africa, the Indian Ocean, India and South-East Asia and even reached Europe in 2007 (Arankalle et al., 2007; Basso et al., 2007). From 2005, this new variant has been responsible for millions of cases of CHIKV disease. The adaptation to its new vector, *Aedes albopictus* (Santhosh et al., 2008; Schuffenecker et al., 2006) rendered possible the spread of the virus in new territories in both the developed world (e.g., Reunion Island, Mauritius, and the south of Europe). CHIKV infection is commonly an acute disease marked by febrile arthralgia and a frequent rash, but persisting arthralgia has been reported in a significant number of cases (Coriguerini et al., 2006). Latent infections are rare but severe cases have been described including neurological presentations and neonatal contaminations which were documented during the outbreak in Reunion Island (Economopoulou et al., 2009; Lemant et al., 2006). Current treatments of Chikungunya fever are for symptoms with no effective licensed vaccine nor specific antiviral drug available. The utilization of the antimalarial chloroquine

proved to be poorly active in vivo despite its in cellulo antiviral effect on CHIKV infection (de Lamballerie et al., 2008; Michault and Staikowsky, 2009; Thibaut et al., 2010). Recently, it has been shown that the combination of interferon-alpha and ribavirin is effective on CHIKV replication in vitro but these compounds have not been tested in animal models and/or clinical trials (Briolant et al., 2004; de Lamballerie et al., 2009).

The antiviral drug arbidol (ARB) (1-methyl-2-phenyl-thio-methyl-3-carboxy-4-dimethylaminomethyl-5-hydroxy-6-bromo-indolehydrochloride monohydrate) (Fig. 1) was originally developed at the Russian Research Structural and Pharmaceutical Institute about 20 years ago (Panisheva et al., 1988) and since 1990 this drug has been used in Russia for prophylaxis and treatment of acute respiratory infections including influenza. Until now, it has been shown that ARB exhibits a wide range of activity against a number of RNA, DNA, enveloped and non-enveloped viruses (Boriskin et al., 2008). This suggests that ARB targets common critical step(s) in virus-cell interaction. Recent data showed that ARB incorporates into cellular membranes leading to perturbed membrane structures and inhibition of virus-mediated fusion (Villalain, 2010). In case of influenza viruses or hepatitis C virus (HCV), ARB blocks virus entry into target cells but exploits different modalities proving its effective broad-spectrum antiviral activity (Leneva et al., 2009; Pecheur et al., 2007).

In this study, we investigated the in cellulo antiviral ARB activity against CHIKV. Several cell lines were assayed (MRC-5 and Vero), in

Corresponding author. Address: UMR190 Unité des Virus Emergents, Faculté de Médecine, de Marseille 27, Bd Jean Moulin, 13005 Marseille cedex 05, France. Tel.: +33 4 91 32 44 20; fax: +33 4 91 32 44 21.

E-mail address: boris.pastorino@univmed.fr (B. Pastorino).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

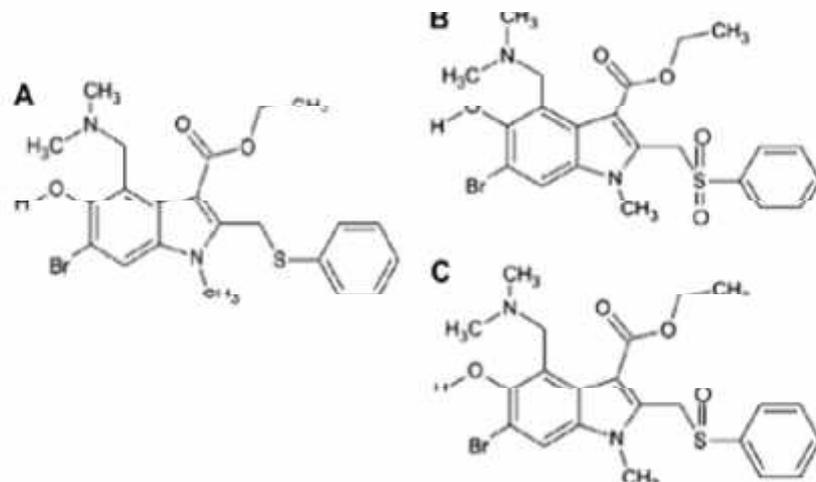


Fig. 1. Chemical structures of arbidol (A), HZ1 (B) and HZ3 (C).

various conditions (pre and post-infection treatments) and using different ARB metabolites to demonstrated the in vitro inhibitory effects of ARB on CHIKV replication ( $IC_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$ ). To further characterize the mechanism of ARB action, we also selected ARB-resistant mutant of CHIKV, identified a single drug-resistant mutation in the E2 envelope viral protein (G407R) and confirmed its role in the virus resistance using infectious clones in in vitro assays.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cells and viruses

The MRC-5 cells (ATCC number CCL-171) were grown in Basal Medium Eagle (BME) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 I/g/ml streptomycin sulfate, under 5%  $CO_2$ . The Vero cell line (ATCC number CCL-81) was grown in minimal essential medium (MEM) supplemented with 5% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 I/g/ml streptomycin sulfate, under 5%  $CO_2$ . HEK-293 cells (ATCC number CRL-1573) were cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) containing 4.5 g/l of D-glucose, 1 mM of sodium pyruvate and 2 mM of L-glutamine, supplemented with 10% decompartmented fetal calf serum (FCS) and antibiotics.

The CHIKV strain used in this study for antiviral assays or the construction of infectious clone was LR2006 OPY1 (GenBank accession number DQ443544), isolated from a patient during the outbreak on Reunion Island in 2006 (Parola et al., 2006).

### 2.2. Compounds

Purified arbidol (ARB) and two derived metabolites, HZ1 (6-bromo-4-(dimethylaminomethyl)-5-hydroxy-1-methyl-2-(phenylsulfonylethyl)-1H-indole-3-carboxylate) and HZ3 (6-bromo-4-(dimethylaminomethyl)-5-hydroxy-1-methyl-2-(methylphenylsulfonylethyl)-1H-indole-3-carboxylate) (Fig. 1) were provided by Stragen Pharma SA (Geneva, Switzerland). HZ2, HZ1 and HZ3 powders were dissolved to completion in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a final concentration of 10 mg/ml followed by dilution in sterile distilled water to prepare stocks at 1 mg/ml. After storage at  $-20^\circ\text{C}$ , these samples were used for preparation of required drug solutions in all experiments. The final 0.005% maximum DMSO concentration was also added to all mock control samples.

### 2.3. Cell viability assay

The ARB cytotoxicity in MRC5 and Vero cells was evaluated using neutral red (NR) dye uptake assays and microscopic observations (Repetto et al., 2008). Briefly, for NR dye uptake assays, 96-well tissue culture plates were seeded with cells then exposed at 90% confluence to varying ARB concentrations (0–100 I/g/ml). Plates were then incubated at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $CO_2$  for 18 or 48 h (respectively, for Vero or MRC5 cells), at which times medium containing neutral red (40 I/g/ml) was added to each well. After 3 h of incubation, the dye was extracted with acidified ethanol solution and optical densities (OD) were read using a microplate spectrophotometer at 540 nm (TECAN Sunrise). Results were expressed as a percentage of OD value of treated cell cultures with respect to untreated ones and the 50% cytotoxic ( $CC_{50}$ ) concentrations of ARB for MRC5 and Vero cells were determined by regression analysis.

### 2.4. Selection of an ARB-resistant mutant

MRC-5 cells grown in 12-well plates were infected with different dilutions of CHIKV (LR2006 OPY1 strain) at a multiplicity of infection (MOI) of 1–0.001 TCID<sub>50</sub>/cell. Virus growth in the presence or absence of ARB was examined at each passage by direct microscopic observations of cytopathic effect (CPE) on MRC-5 cells. The clarified supernatant from the highest dilution providing CPE was used for subsequent passage. Initially, CHIKV did not grow in the presence of ARB at a concentration  $>10 \mu\text{g/ml}$ ; its concentration was increased gradually from 4 to 30 I/g/ml during successive virus passages using 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 26, 28 and 30 I/g/ml ARB. By the 17th passage the virus appeared to have adapted to 30 I/g/ml ARB in MRC-5 cell. This specific clarified supernatant was stored at  $-80^\circ\text{C}$  for further analysis.

### 2.5. Quantitative analysis

Viral RNA was extracted from samples using the EZ1 virus mini kit on an EZ1 Biorobot workstation (Qiagen). Viral genomes were reverse-transcribed and amplified by use a one-step RT-PCR kit (Access RT-PCR core reagent kit, Promega) according to the manufacturer's instructions. PCR products were purified using the Qiagen PCR extraction kit and sequenced using the ABI PRISM

BigDye terminator cycle sequencing kit on an ABI PRISM 3101XA Genetic Analyser sequencer. The sequencing primers were those already used for the complete sequencing of the LR2006 OPY1 CHIKV strain (Parola et al., 2006).

## 2.6. Construction of CHIKV infectious clones

The preparation of an infectious clone from the LR2006 CHIKV strain was reported elsewhere (Tsatsarkin et al., 2006). The original construct was modified by adding a CMV promoter and the Hepatitis D virus ribozyme at the 5' and 3' ends of the genome, respectively, in order to be able to transfect DNA and generate in cellulo infectious viral RNAs. The resulting construct (set-up in a pBR322 plasmid possessing an ampicilline resistance gene) was named "Tonile". The infectious CHIKV clone containing the mutation G207R called "Tonile-ARB-R" was produced by standard molecular biology techniques. The PCR fragments containing the mutation were cloned and inserted between the unique restriction sites AgeI and XhoI into the Tonile plasmid backbone (Vanlandingham et al., 2006) (Fig. 6). The Tonile and Tonile-ARB-R infectious clones were sequenced completely as described previously to validate the constructions.

## 2.7. Transfection and production of CHIKV infectious clones

HEK-293 cells were seeded on 75 cm<sup>2</sup> flask in complete DMEM without antibiotics. The day after, cells were transfected with the CHIKV infectious clones (Tonile or Tonile-ARB-R) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with a ratio of 1  $\mu$ g of DNA per 1.5  $\mu$ l of Lipofectamine. Four hours post-transfection, transfected cells were washed three times in Hanks balanced salt solution (HBSS) then incubated for 10 h in complete DMEM supplemented with antibiotics and 30  $\mu$ g/ml ARB for cells transfected with Tonile-ARB-R. For each viral production, stocks were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  and a sample was used to perform complete genome sequencing and virus titration.

## 2.8. Virus titration

Virus titers were determined by the Tissue Culture Infectious Dose<sub>50</sub> (TCID<sub>50</sub>) method in Vero cell cultures (Reed and Muench, 1938). Briefly, the TCID<sub>50</sub> assay was performed on Vero cells seeded in 96-well plates. When the cells reached 80% confluence, six replicates were infected with 150  $\mu$ l of ten-fold serial dilutions of the virus sample, and then incubated 7 days before microscopic observations and positive CPE well counting. For each supernatant sample, the infectivity titer was expressed as TCID<sub>50</sub>/ml using the Karber formulae.

## 2.9. In vitro antiviral activity of ARB

### 2.9.1. IC<sub>50</sub> determination using Indirect Immunofluorescence Assays (IFA).

MRC-5 cells were grown in an 8-microchamber Lab-Tek II slide (Nalge Nunc International) to reach 80% confluence. Cells were then infected with different dilutions of CHIKV at MOIs from 1 to 0.0001 TCID<sub>50</sub>/cell. One hour after infection, the viral inoculum was removed and cells were washed one time with PBS. Complete medium (400  $\mu$ l) supplemented with 0.02% concentration of Methocult (H4100, StemCell Technologies INC), containing different concentration of ARB (0.9; 1.8; 3.75; 7.5; 15 and 30  $\mu$ g/ml) were added to each well and cells were grown for 48 h. After PBS washing, cells were fixed with acetone for 20 min at room temperature and viral antigens were detected by IFA using CHIKV-specific immune human serum (1:20) and fluorescein-conjugated anti-human IgG (1:400). The percentage of fluorescent cells in each well

was determined, the IC<sub>50</sub> value (i.e. the concentration of compound required to inhibit cell infection by 50%) was determined by plotting the percentage inhibition of cell infection as a function of ARB concentration after 4 independent experiments.

### 2.9.2. Virucidal activity

To evaluate a putative virucidal action of ARB on CHIKV, the same experiments were performed using CHIKV pre incubated during 0.5 or 1 h with ARB concentrations ranging from 1 to 30  $\mu$ g/ml before MRC5 infection. Each assay was realized in duplicate, and 2 independent experiments were performed. The IC<sub>50</sub> values were determined as described previously.

### 2.9.3. Kinetics of ARB cell treatment

To evaluate the influence of pre- and post-infection ARB treatment on virus replication, the same experiments were performed using MRC5 cells with the addition of ARB 1, 3, 5, 8, 24 h before and post infection. Each assay was realized in duplicate and 2 independent experiments were performed. The IC<sub>50</sub> values were determined as described previously. The Mann-Whitney U statistical test was then used to analyze IC<sub>50</sub> values obtained from different times in comparison with the chosen reference one (IC<sub>50</sub> value corresponding to the time 1 h post infection).

### 2.9.4. IC<sub>50</sub> determination using comparative quantitative RT-PCR analysis

Antiviral assays were carried out in Vero cells in 48-well plates in duplicate and two independent experiments were performed. Briefly, 1 day after seeding, cells were infected with 100  $\mu$ l of the viral inoculum (at MOIs of either 0.1 or 0.01 TCID<sub>50</sub>/cell) for 90 min, at 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub>. Following incubation, the viral inoculum was removed and cultures were washed once with PBS after which 500  $\mu$ l of fresh complete MEM medium supplemented with 0, 10, 20, 30, 40 or 50  $\mu$ g/ml ARB (HZ2) were added to the wells. After 18 h p.i., supernatants were harvested and viral RNA was extracted from 100  $\mu$ l of cell culture clarified supernatant using the NucleoSpin 96 virus kit according to the manufacturer's protocol (Macherey-Nagel, Duren, Germany) and an epMotion 5075 workstation (Eppendorf France SARL). One-step qRT-PCR was performed on the Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System using primers and probes already described (Pastorino et al., 2005). For comparative quantification, data were expressed as the percentage of untreated virus control, and log reduction values were calculated. The IC<sub>50</sub> value (i.e. the concentration of compound required to inhibit viral RNA load by 50%) was determined by plotting the percentage inhibition of cell infection as a function of ARB concentration.

### 2.9.5. IC<sub>50</sub> determination using virus titration assays

Supernatant used in antiviral assays and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  were titrated using the method described above. For each sample, the viral titer was represented as percentage of positive control (viral titer from infected cell supernatant sample without antiviral compound). The IC<sub>50</sub> value (i.e. the concentration of compound required to inhibit infectious virus titer by 50%) was determined by plotting the percentage inhibition of cell infection as a function of ARB concentration.

## 2.10. Hemagglutination assay

Hemagglutination titration of the CHIKV strain LR2006 OPY1 was first performed using standard methods (Clarke and Casals, 1958); (two-fold serial dilution of virus samples (cell supernatant) on U-bottom microplates were carried out with 0.4% bovine albumin/borate saline pH 9.0 solution (final volume: 35  $\mu$ l/well). Thirty-five microliters of pre-diluted goose red blood cells (1/150

using the final pH 6.0 adjusting diluents) were added, the mixture was homogenized, incubated 45 min at room temperature and then read using four scoring symbols: ++ for complete hemagglutination, + for partial hemagglutination, +A for trace hemagglutination and A for negative hemagglutination. The titer was the reciprocal of the last dilution in which + was observed. To assess the effect of ARB on hemagglutination, we then performed a hemagglutination assay in the same condition with 3 amounts of virus (8, 4 and 2 UHA/well). Each concentration of virus was used in triplicate in presence of various ARB concentrations (0, 15, 30 and 60  $\mu\text{g/ml}$ ). Negative controls contained no virus and allowed us to observe the effect of ARB on goose red blood cells sedimentation.

### 3. Results

#### 3.1. Effect of arbidol and its metabolites HZ1 and HZ3 on CHIKV strain LR2006 OPY1

The cytotoxic effect of ARB was evaluated using NR cytotoxicity assay and microscopic observations. Fig. 2C shows the 50% cytotoxic concentration values ( $CC_{50}$ ) obtained for confluent Vero and MRC5 cells after, respectively, 18 or 48 h of ARB treatment.

Then, the effect of ARB and two sulfone and sulfoxide metabolites (HZ1 and HZ3) (Fig. 1) on CHIKV replication was determined using specific indirect immunofluorescent assays (IFA). As shown in Fig. 2A, ARB was found to inhibit CHIKV infection with  $IC_{50}$  values at  $6.49 \pm 1.17 \mu\text{g/ml}$ . This was further confirmed using infected Vero cells and qRT-PCR assays which also provided estimated  $IC_{50}$  values  $6.10 \mu\text{g/ml}$  (Fig. 2B). ARB selectivity indices ( $SI$ ) calculated using Vero and MRC5 cell line, provided values about 28

and 30, respectively (Fig. 2C). Moreover, subconfluent monolayers of Vero and MRC5 cells treated for 18 or 48 h with ARB at concentrations of 0–30  $\mu\text{g/ml}$  did not show any microscopically visible changes in cell morphology or cell density.

In the case of arbidol HZ1 and HZ3 compounds, a weak antiviral activity was observed, with  $IC_{50}$  values reaching 30  $\mu\text{g/ml}$ . Furthermore, pre-incubation of ARB for 12 h at 37 °C did not improve its antiviral effect on MRC5 cells (HZ2a,  $IC_{50}$  value  $6.21 \pm 0.73 \mu\text{g/ml}$ ) (see Fig. 2A). These results suggested that the arbidol antiviral activity against CHIKV was due to the HZ2 molecule and was not extended to its metabolites or degradation products.

Finally, to investigate the direct inactivating effect of ARB, CHIKV was pre treated for 0.5 or 1 h with concentrations ranging from 1 to 30  $\mu\text{g/ml}$ . The  $IC_{50}$  obtained (respectively,  $12.3 \pm 2.67 \mu\text{g/ml}$  and  $16.85 \pm 3.87 \mu\text{g/ml}$ ) indicated that the antiviral activity of ARB on CHIKV infection was not due to a virucidal activity (Fig. 2A).

#### 3.2. Time-of-drug-addition studies

To examine the mechanism of viral inhibition by ARB, a time-of-drug-addition experiment was carried out. Various concentrations of ARB HZ2 were added to CHIKV-MRC5 infected cells at several time points before or post infection. As shown in Fig. 3, a decrease in the  $IC_{50}$  values was observed from times 0 to 24 before infection and the  $IC_{50}$  value at 24 h before infection reached a statistically significant difference from  $IC_{50}$  observed 1 h post infection ( $P < 0.05$ ). Moreover, antiviral activity was progressively reduced when ARB was added at post infection stages and the increased  $IC_{50}$  values at 3, 5 and 8 h post infection were statistically different

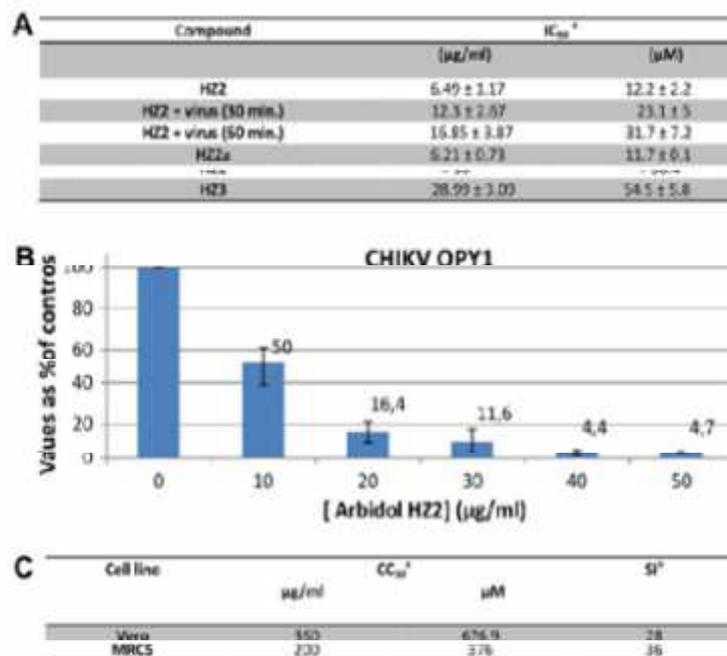


Fig. 2. Antiviral activity of ARB against CHIKV strain LR2006 OPY1. (A) The  $IC_{50}$  values were determined using indirect immunofluorescence assay (IFA) and MRC5 cells. HZ2 + virus (30 or 60 min.) represented experiments where CHIKV was pre incubated during 30 or 60 min. with various ARB concentrations before cell infection. HZ2a represented experiments where ARB was pre incubated for 12 h at 37 °C before cell infection.  $IC_{50}$  values are obtained from four independent experiments. (B) Effect of ARB on CHIKV replication using Vero cells and comparative qRT-PCR assays. Data were expressed as the percentage of untreated virus control and each point represents the mean of two replicates in two independent experiments. (C) Cytotoxicity of ARB in our experimental conditions. <sup>a</sup>The 50% cytotoxic ( $CC_{50}$ ) concentrations of ARB for MRC5 and Vero cells were determined using neutral red (NR) dye uptake assays after, respectively, 18 or 24 h ARB treatment. <sup>b</sup>Selectivity index ( $SI$ ) is expressed as the ratio  $CC_{50}/IC_{50}$ .

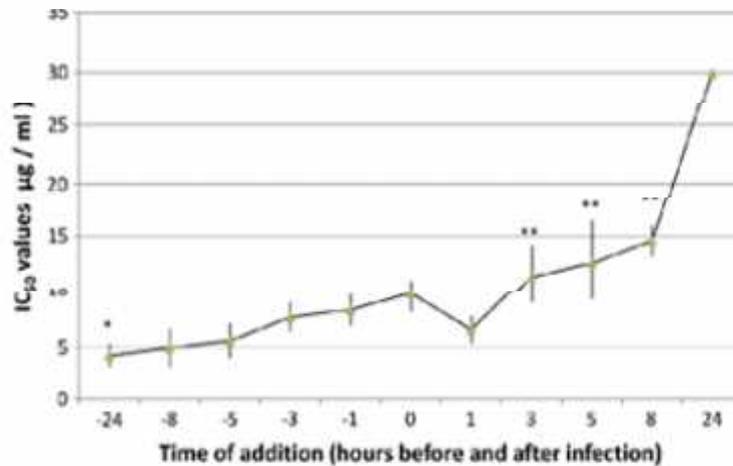


Fig. 3. Time-of-addition study. Experiments were performed using MRC5 cells with the addition of ARB 1, 3, 5, 8, 24 h before and post infection. The IC<sub>50</sub> values were determined using IFA as described previously. Each point represents the mean of two replicate in two independent experiments. \*P < 0.05 vs. reference value at 1 h post infection; \*\*P < 0.01 vs. reference value at 1 h post infection.

from IC<sub>50</sub> observed 1 h post infection (P < 0.01). These results suggested that ARB interferes with the earliest stages of the viral replication cycle (i.e., virus attachment/entry).

### 3.3. Effect of ARB on CHIKV hemagglutination

The ability of viruses to agglutinate erythrocyte is a potentially simple model for the study of virus attachment to cellular receptors. Therefore, to make precise the mechanism of ARB action, hemagglutination assays were performed and analyzed. As shown in Fig. 4, ARB concentration equal or higher than 15 µg/ml inhibited the hemagglutination of CHIKV onto goose red blood cells depending on the amount of virus. With 2 UHA/well and 30 µg/ml ARB, the hemagglutination-inhibition reached around 50%. When 60 µg/ml ARB was added in the assay, no CHIKV hemagglutination was detected. Clearly, these results showed that ARB prevents the interaction of CHIKV with goose red blood which could suggest by analogy that the drug blocks the CHIKV replication cycle at the cell adhesion step.

### 3.4. Selection and characteristics of an ARB-resistant mutant

CHIKV lineage OPY1 strain was used to select an ARB-resistant variant following passage on MRC5 cells with increasing concentrations of the drug (from 4 to 30 µg/ml). Efficient virus

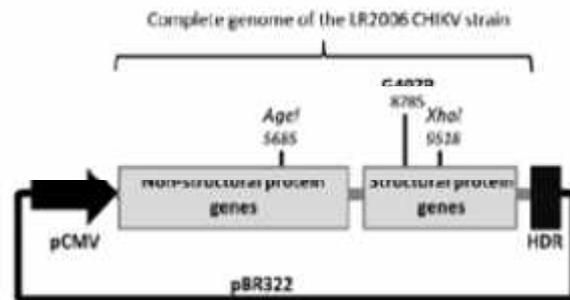


Fig. 5. Schematic representation of the infectious clone Tonile-ARB-R containing the G407R mutation. Tonile-ARB-R derives from the Tonile infectious clone which contains the whole genome of the LR2006 CHIKV strain. The promoter CMV (pCMV) and the Hepatitis Delta virus ribozyme (HDR) allow to generate in cellulo infectious viral RNAs. All of them are inserted into a pBR322 plasmid possessing an ampicillin resistance gene. The unique restriction sites AgeI and XhoI were used to add the G407R mutation. Positions indicated in this figure are based on the complete genome sequence.

propagation was ultimately obtained at the 17th passage after 4 months of culture. The resistant mutant (called CHIKV<sub>ARB</sub>) was purified by end-point dilution in the presence of 30 µg/ml ARB and a virus stock was prepared under the same concentration of

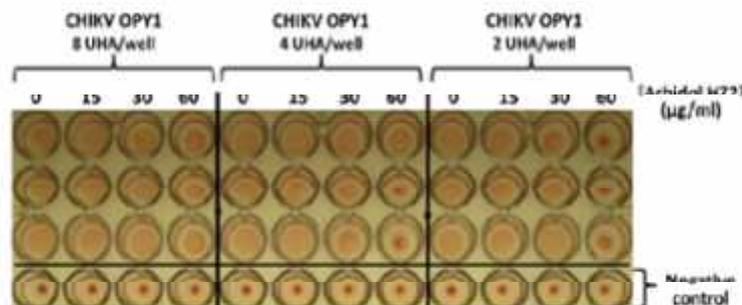


Fig. 4. Hemagglutination assay. Three amounts of virus (8, 4 and 2 UHA/well) were used in triplicate and in presence of various ARB concentrations (0, 15, 30 and 60 µg/ml) to observe modification on goose red blood cells hemagglutination. Negative controls represented wells without virus.

drug. Complete nucleotide sequence of CHIKV-R revealed a single amino acid substitution G407R localized in the E2 viral envelope protein (Fig. 5). CHIKV-R was further characterized for ARB resistance and replication fitness. For both studies, CHIKV replication was determined on Vero cells using comparative qRT-PCR. As described in Fig. 6, CHIKV-R was highly resistant to ARB, with no significant difference in virus replication after 18 h post infection when exposed to 10 from 50  $\mu\text{g/ml}$  ARB. The fitness of CHIKV OPY1 and CHIKV-R was compared in infection assays using the same MOIs (0.1 and 0.01 TCID<sub>50</sub>/cell) for both viruses. Viral RNA load was quantified every eight hours for four days in the absence of any antiviral drug using specific one-step qRT-PCR detection (Pastorino et al., 2005) (Fig. 7). Despite slight initial difference in the numbers of viral RNA copies, the growth curves exhibited the same pattern with a similar exponential growth phase until reaching a plateau at the end of the second day and CPE apparition at day 3. The rate of viral growth was identical between hours 8

and 20 for both viruses with no significant difference in viral RNA copies (Fig. 7).

However, in the absence of ARB selection pressure, CHIKV-R seemed to be unstable as the reversion G407R G407 was rapidly detected: when CHIKV-R was propagated on Vero cells without ARB in the medium culture, sequence analysis of viral production revealed the emergence of the G407 revertant as soon as 3 days post infection. This suggests that the wild-type virus is much better adapted to replication than the G407R variant in our experimental conditions.

### 3.5. Effect of arbidol on Tonile-ARB-R an infectious clone of CHIKV containing the mutation G407R

Tonile and Tonile-ARB-R CHIKV infectious clones were used to infect Vero cells at the same MOIs (0.1 and 0.01 TCID<sub>50</sub>/cell) in the presence of various ARB concentrations (0–50  $\mu\text{g/ml}$ ). Eighteen

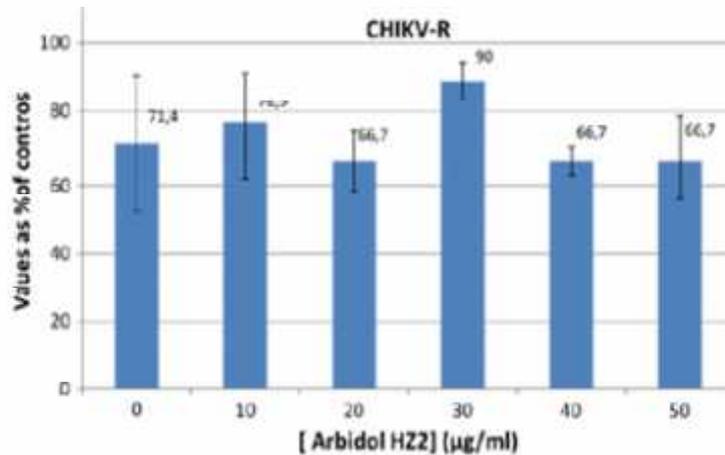


Fig. 6. Effect of ARB on CHIKV-R mutant replication. The antiviral activity of ARB on CHIKV-R mutant replication was evaluated using Vero cells and comparative qRT-PCR assays as described previously. Data were expressed as the percentage of untreated virus control and each point represents the mean of two replicates in two independent experiments.

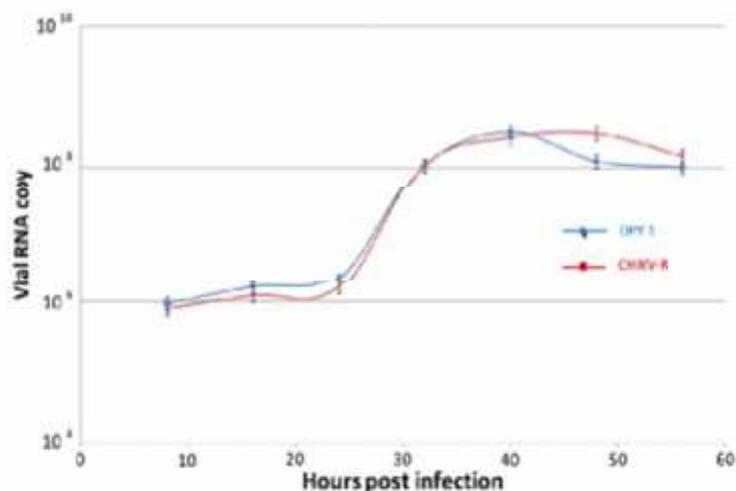


Fig. 7. Replication kinetics of CHIKV OPY1 and CHIKV-R mutant. Vero cells were infected with CHIKV OPY1 or CHIKV-R strains at the same MOIs (0.1 and 0.01 TCID<sub>50</sub>/cell). The viral growth in the absence of antiviral compound was followed by measuring viral RNA copies every 8 h for 4 days using specific real-time RT-PCR assay.

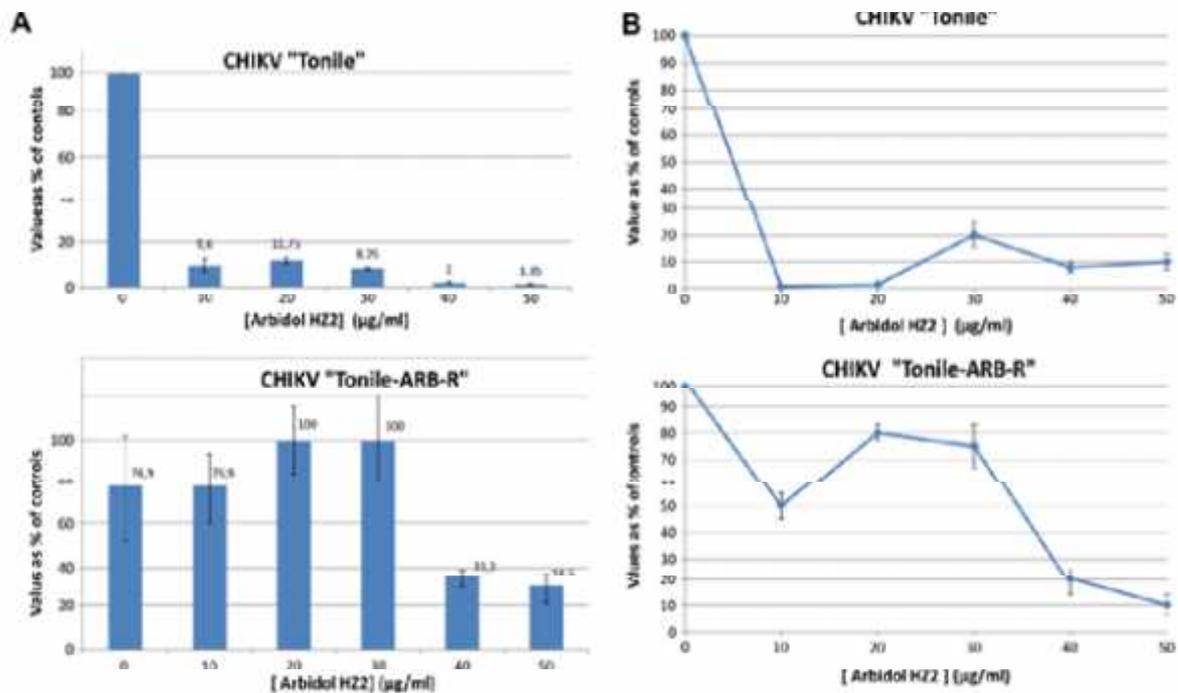


Fig. 8. Effect of ARB on CHIKV infectious clones replication. (A) The effect of ARB on Tonile and Tonile-ARB-R replication was assayed using Vero cells and comparative qRT-PCR assays as already described. Data were expressed as the percentage of untreated virus control and each point represents the mean of two replicates in two independent experiments. (B) The effect of CHIKV Tonile and Tonile-ARB-R infectivity was determined using Vero cells and the titration of cell culture supernatants. Data were expressed as the percentage of untreated virus control and each point represents the mean of two replicates in two independent experiments.

hours post infection, infected cell supernatants were harvested and compared using viral RNA quantification and virus titration assays. As expected (see Fig. 8A), a strong viral load decrease was observed for Tonile CHIKV when arbidol was added to the culture medium. A 90% reduction of viral RNA was observed after addition of 10 l/g/ml ARB in the culture medium. The same experiment using Tonile-ARB-R CHIKV infectious clone resulted in no significant difference for viral load when 0 to 30 l/g/ml of arbidol was added to the culture medium. A 70% reduction of viral RNA was only observed when the medium was supplemented with 40 or 50 l/g/ml of the drug. Virus titration assays confirmed the results obtained for viral RNA quantification (Fig. 8B) with a complete suppression of Tonile CHIKV production using 10 l/g/ml ARB whereas the infectivity of Tonile-ARB-R was only significantly reduced with a 40 l/g/ml ARB concentration.

#### 4. Discussion

Arbidol is a small molecule derivative molecule that was first marketed in Russia in 1993 and in China in 2006 for prophylaxis and treatment of infections by influenza A and B viruses (Boriskin et al., 2008; Brooks et al., 2004). This drug proved to be efficient to reduce the duration of influenza and to prevent the development of post-influenza complications (Leneva et al., 2009). Moreover, despite a clinical use for more than 15 years, no ARB-resistant viruses have been isolated so far and clinical trials revealed that the drug was well tolerated with minor side effects (Liu et al., 2008). More than 17 tonnes of ARB are used yearly in Russia for the treatment of acute respiratory infectious syndromes. In addition to possible immune-modulatory effects, ARB demonstrated a broad-spectrum

antiviral activity against a number of enveloped and non-enveloped viruses which could in part be due to its membranotropism (Shi et al., 2007). Indeed, it has been shown that ARB was an entry inhibitor of influenza virus infection by stabilizing the influenza HA and preventing the endosomal membrane fusion (Leneva et al., 2009). Similarly, ARB proved to be active in vitro against HCV infection and the antiviral mechanism was related to inhibition of the HCV glycoprotein conformational changes needed for the membrane fusion process (Boriskin et al., 2008; Pecher et al., 2007; Teissier et al., 2011).

Since 2004, CHIKV has been identified as a reemerging arbovirus with a high epidemic potential in relation with its possible dissemination by rapid long-distance travels and its transmissibility by urban mosquito vectors (Chevillon et al., 2008). Originally confined to the developing nations, the virus began to encroach on the boundaries of the developed world but there is currently no vaccine available or effective treatment for CHIKV infection. In this context, the development of prophylactic and therapeutic strategies for CHIKV infection is important (Couderc et al., 2009; Tribout et al., 2010).

Until now, our understanding of the interactions of CHIKV with human cells remains limited. However, CHIKV is capable of replication in vitro in a variety of mammalian cells with the production of infectious virus. Among these cells, continuous Vero and MRC5 ones are highly permissive to CHIKV infection. Primary human fibroblasts as MRC5 are cells of specific interest since human fibroblasts are known targets of CHIKV infection (Couderc et al., 2008; Bourrisseau et al., 2007).

In the current study, we used these two cell lines to demonstrate that ARB was able to inhibit CHIKV replication when added before infection. The  $IC_{50}$  values obtained 6.10 l/g/ml indicated that

ARB was active at concentrations which were significantly lower than its cytotoxic concentrations ( $CC_{50}$  P 2001 g/ml), and similar to those observed for the influenza A virus. The high  $CC_{50}$  values measured could be explained by the short time of drug exposition (18 or 48 h) in our experiments. This choice was justified on the one hand by the high rate of CHIKV growth and on the other hand by the low half-life of ARB in cultured cells (about 18 h). Moreover, in relation with its ester prodrug nature, it is known that ARB antiviral activity may be produced by one or several hydrolyzed metabolites. Among them oxidized sulfone and sulfoxide forms of ARB are strongly represented (Anisimova et al., 1995; Boriskin et al., 2008). However, our results did not confirm this hypothesis in the case of CHIKV, with no effect of two derived synthetic HZ2 products (HZ1, HZ3) on CHIKV replication. In addition, no virucidal effect of ARB HZ2 for CHIKV was observed, in opposition with previous studies on influenza A virus, respiratory syncytial virus, human rhinovirus type 14 and coxsackie virus B3 (Shi et al., 2007) but in agreement with data reported for Hantaan virus (Deng et al., 2009). This result combined with those obtained in our time of drug addition experiment indicated that ARB blocks the earliest stages of the CHIKV replication cycle (i.e., virus attachment and/or virus entry) as previously demonstrated for other enveloped viruses (Boriskin et al., 2008). To further characterize the mechanism of ARB action, we selected a CHIKV mutant and identified a single crucial amino acid substitution G407R localized in the E2 viral envelope protein. Sequence alignments revealed that this residue G407 was not conserved throughout the alphavirus genus. Based on recent structural analysis of the CHIKV glycoprotein, this mutation was shown to be localized in the domain A of E2 and more precisely in the "wings" insertion which could be involved in alphavirus interactions with cell receptors (Voss et al., 2010). Accordingly, the mechanism of arbidol antiviral activity may be related to cell adsorption. This hypothesis was reinforced by the observed inhibition of CHIKV hemagglutination by ARB. However, structural studies have also demonstrated that CHIKV E2 protein was tightly associated with E1, a viral protein mostly implicated in membrane fusion (Kielian, 2010; Li et al., 2010). Although the E2 domain B has been identified as the covered E1 fusion loop, it cannot be excluded that residue 407 may be indirectly involved in the fusion process. Altogether, while a precise mechanism remains to be fully elucidated, our results strongly suggested that arbidol interferes with the early stages of Chikungunya virus infection (virus attachment or entry) by targeting the cellular membrane. In conclusion, arbidol, a molecule which has been extensively used previously for the treatment of viral respiratory infections in humans, was found to be a potent inhibitor against *in vitro* CHIKV infection. In addition to the elucidation of its cellular mode of action, this drug should be further evaluated for the prevention of CHIKV infection and for the management of severe presentations.

## References

- Anisimova, O.S.F., Protova, L.V., Ostrovskoy, V.V., Ermachenkov, I.A., Golovanova, I.V.Z., Sa, Plozkova, A.P., Yarovskaya, V.A., Shcher, Y.N., 1995. Study of metabolism of the antiviral drug arbidol by mass spectrometry, thin-layer and high-performance liquid chromatography. *Pharm. Chem. J.* 29, 76–82.
- Arankalle, V.A., Shrivastava, S., Oshian, S., Gunjikar, R.S., Walimbe, A.M., Jethar, S.M., Sudeep, A.B., Mishra, A.C., 2007. Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1953–2006) with special reference to the 2006–2009 explosive epidemic. *J Gen Virol* 88, 1967–1976.
- Borgherini, G., Poubéau, P., Betsaume, A., Goux, A., Cotte, L., Michault, A., Arvin-Berod, C., Paganin, F., 2008. Persistent arthralgia associated with chikungunya virus: a study of 88 adult patients on reunion island. *Clin. Infect. Dis.* 47, 402–410.
- Boriskin, Y.S., Leneva, I.A., Pechur, E.I., Polyak, S.J., 2008. Arbidol: a broad-spectrum antiviral compound that blocks viral fusion. *Curr. Med. Chem.* 15, 997–1005.
- Briolant, S., Garin, D., Sarranazzino, N., Juan, A., Gracco, J.M., 2004. *In vitro* inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of monoclonal antibodies treatment. *Antiviral Res.* 61, 111–117.
- Brooks, M.J., Sasadeusz, J.J., Tannock, G.A., 2004. Antiviral chemotherapeutic agents against respiratory viruses: where are we now and what's in the pipeline? *Curr. Opin. Pulm. Med.* 10, 197–203.
- Chikungunya virus: epidemiology, ecology, and evolution. *Trends Microbiol.* 16, 80–88.
- Clark, D.H., Casals, J., 1958. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 7, 561–573.
- Touret, Y., Barau, G., Ceyat, N., Schuffenecker, I., Despres, P., Arenzana-Seisdedos, F., Michault, A., Albert, M.L., Lecuit, M., 2008. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathog.* 4, e29.
- J.F. Lecuit, M., 2009. Prophylaxis and therapy for Chikungunya virus infection. *J. Infect. Dis.* 200, 516–523.
- de Lamballerie, X., Boisson, V., Reynier, J.C., Enault, S., Charrel, R.N., Rahaut, A., Roques, P., Le Grand, R., 2008. On chikungunya acute infection and chloroquine treatment. *PLoS One* 3, e29722.
- de Lamballerie, X., Ninove, L., Charrel, R.N., 2009. Antiviral treatment of chikungunya virus infection. *Infect. Disord. Drug Targets* 9, 101–104.
- Deng, H.Y., Luo, F., Shi, L.Q., Zhong, Q., Liu, Y.J., Yang, Z.Q., 2009. Efficacy of arbidol on lethal hantaan virus infections in suckling mice and *in vitro*. *Acta Pharmacol. Sin.* 30, 1008–1012.
- Economopoulou, A., Dominguez, M., Helynick, B., Saeko, D., Wichmann, O., Querel, P., Germonneau, P., Quatrecas, L., 2009. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Reunion. *Epidemiol. Infect.* 137, 622–623.
- Kielian, M., 2010. Structural biology: an alphavirus puzzle solved. *Nature* 466, 645–646.
- Lemant, J., Boisson, V., Winer, A., Thibault, L., Andre, H., Tixier, F., Lemerder, M., Antok, E., Ousta, M.P., Grivard, P., Bernard, M., Rollot, O., Favier, F., Huerra, M., Cammion, J.L., Michault, A., 2008. Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the Reunion Island outbreak in 2005–2006. *Crit. Care Med.* 36, 2536–2541.
- Leneva, I.A., Russell, R.J., Boriskin, Y.S., Hay, A.J., 2009. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral Res.* 81, 132–140.
- U. L., Zou, J., Xiang, Y., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., 2010. Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. *Nature* 468, 705–708.
- Uu, M.Y., Wang, S., Yao, W.F., Wu, H.Z., Meng, S.N., Wei, M.J., 2009. Pharmacokinetic properties and bioequivalence of two formulations of arbidol: an open-label, single-dose, randomized-sequence, two-period crossover study in healthy Chinese male volunteers. *Clin. Ther.* 31, 784–792.
- Michault, A., Stakowsky, F., 2009. Chikungunya: first steps toward specific treatment and prophylaxis. *J. Infect. Dis.* 200, 489–491.
- Pansheva, E.K.M., Mikerova, N.I., Nikolaeva, I.S., Fomina, A.N., Oshkova, A.A., Golovanova, E.A., Krylova, L.Y., 1988. *Pharm. Chem.* 21, 1455.
- Marlot, P., de Lamballerie, X., Jourdan, J., Hovary, C., Yankiet, V., Minodier, P., Brouqui, P., Rahaut, A., Raoult, D., Charrel, R.N., 2006. Novel chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1493–1499.
- Pastorino, B., Bessaud, M., Grandadam, M., Murri, S., Tolou, H.J., Peyrefitte, C.N., 2009. Development of a rapid and easy assay without PCR extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. *J. Virol. Meth.* 124, 65–71.
- Pechur, E.I., Lavillette, D., Alcaras, F., Mollé, J., Boriskin, Y.S., Roberts, M., Cosset, F.L., Polyak, S.J., 2007. Biochemical mechanism of hepatitis C virus inhibition by the antiviral compound arbidol in human hepatocellular carcinoma cells. *Antiviral Res.* 72, 145–155.
- Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene* 27, 493–497.
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L., 2006. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* 3, 1125–1131.
- Chikungunya virus: epidemiology, ecology, and evolution. *Trends Microbiol.* 16, 80–88.
- Fortuna, C., Boros, S., Magarano, F., Sivi, G., Angelini, P., Dottori, M., Gufolini, M.G., Majori, G.C., Cassone, A., 2007. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370, 1840–1846.
- Robinson, M.C., 1955. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika, 1952–53. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 48, 28–32.
- Santhosh, S.R., Dash, P.K., Parida, M.M., Khan, M., Tiwari, M., Lakshmana Rao, P.V., 2008. Comparative full genome analysis revealed E1: A226V shift in 2007 Indian Chikungunya virus isolates. *Virus Res.* 135, 36–41.
- Lavenir, R., Pardigon, N., Reynes, J.M., Pettinelli, F., Biscornet, L., Diancourt, L., Michel, S., Duquerroy, S., Guigon, G., Frenkiel, M.P., Brehin, A.C., Quito, N., Despres, P., Kunst, F., Rey, F.A., Zeller, H., Brisse, S., 2006. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Pathog.* 2, e121.
- Shi, L., Xiong, H., He, J., Deng, H., U. Q., Zhong, Q., Hou, W., Cheng, L., Xiao, H., Yang, Z., 2007. Antiviral activity of arbidol against influenza A virus, respiratory syncytial virus, rhinovirus, coxsackie virus and adenovirus *in vitro* and *in vivo*. *Arch. Virol.* 152, 1447–1455.

- Sourisseau, M., Schilte, C., Casartelli, N., Trouillet, C., Guivel-Benhassine, F., Rudnicka, D., Sol-Foulon, N., Le Roux, K., Prevost, M.C., Fehli, H., Frenkel, M.P., Blanchet, F., Alonso, P.V., Coccardi, P.E., Ozden, S., Gessen, A., Schuffenecker, I., Vattanasil, B., Fanchutti, S., Sak, A., Bao, F.A., Anonnan, S., Sattar, S., Pavesi, P., Michault, A., Albert, M.L., Schwartz, O., 2007. Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog.* 3, e69.
- Teissier, E., Penin, F., Pecher, E.J., 2011. Targeting cell entry of enveloped viruses as an antiviral strategy. *Molecules* 16, 221–250.
- Thirumangalakudi, S., Kumar, S., Sankaranarayanan, V.N., 2004. Designing an SRIKANTH, P., WEINER, D.B., MUTHUMANI, K., 2010. Chikungunya: a potentially emerging epidemic? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e623.
- Tsatsarkin, K., Higgs, S., McGee, C.E., de Lamballerie, X., Charrel, R.N., Vanlandingham, D.L., 2006. Infectious clones of Chikungunya virus (La Reunion isolate) for vector competence studies. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6, 325–337.
- Vanlandingham, D.L., Tsatsarkin, K., Hong, C., Klingler, K., McBry, K.L., Takano, M.J., Higgs, S., 2005. Development and characterization of a double subgenomic chikungunya virus infectious clone to express heterologous genes in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 1162–1170.
- Villalón, J., 2010. Membranotropic effects of arbidol, a broad anti-viral molecule, on phospholipid model membranes. *J. Phys. Chem. B* 114, 10200–10207.
- Voss, J.E., Vasey, M.C., Duquerry, S., Votrhub, C., Grand-Banc, C., Oublet, E., Thompson, A., Bricogne, G., Ray, F.A., 2010. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 468, 709–712.

## Discussion

L'Arbidol (HZ2) est une molécule utilisée en Russie depuis 1993 et en Chine depuis 2006 pour le traitement des infections par les virus de la grippe A et de la grippe B (*Obrosova-Serova NP. et al. 1991 ; Boriskin et al. 2008; Brooks et al. 2004*). Ce médicament s'est avéré efficace pour réduire la durée de la maladie et de prévenir l'apparition de complications post-grippales (*Leneva et al. 2009*). En outre, en dépit d'une utilisation clinique depuis plus de 15 ans, aucun virus résistant à l'Arbidol ont été isolé à ce jour et les essais cliniques ont révélé que le médicament était bien toléré avec des effets secondaires mineurs (*Liu et al. 2009*). L'activité antivirale de l'Arbidol est à large spectre, incluant un certain nombre de virus enveloppés et non enveloppés (*Shi et al. 2007*). Il a été démontré que l'Arbidol inhibe la fusion membranaire par le virus de la grippe en stabilisant l'HA de la grippe et la prévention de la fusion membranaire endosomale (*Leneva et al. 2009*). De la même manière, l'Arbidol a une action *in vitro* contre l'infection par le VHC et le mécanisme d'inhibition est déterminé par des changements conformationnels de la glycoprotéine membranaire de fusion du VHC nécessaires pour la fusion cellulaire (*Boriskin et al, 2008;. Pecheur et al 2007; Teissier et al. 2011*).

Depuis 2004, CHIKV a été identifié comme un arbovirus ré-émergent avec un potentiel épidémique élevé compte tenu de sa diffusion rapide possible par les voyageurs et sa transmissibilité par les moustiques urbain (*Chevillon et al. 2008*). Il n'existe actuellement aucun vaccin ou traitement efficace utilisable pour l'infection à CHIKV. Dans ce contexte, l'élaboration de stratégies prophylactiques et thérapeutiques pour l'infection à CHIKV est une priorité (*Couderc et al. 2009; Thiboutot et al. 2010*). Le CHIKV est capable de réplication *in vitro* dans une variété de cellules de mammifères avec production d'un ECP caractéristique. En particulier, les cellules Vero et les MRC5 sont très permissives à l'infection CHIKV. Les MRC5 sont une lignée cellulaire primaire des fibroblastes, et constituent un modèle intéressant car le virus peut, *in vivo*, se répliquer dans les fibroblastes (*Couderc et al. 2008; Sourisseau et al. 2000*). Dans la présente étude, nous avons utilisé ces deux lignées de cellules afin de démontrer que l'Arbidol HZ2 peut inhiber la réplication du CHIKV lorsqu'il est ajouté avant l'infection. Les valeurs de  $IC_{50}$  obtenues ( $\leq 10 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) indiquent que l'Arbidol HZ2 est actif à des concentrations qui étaient significativement plus faibles que ses concentrations cytotoxiques ( $CC_{50} \geq 200 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), et dans la gamme des  $IC_{50}$  observées, par exemple, pour la s virus grippaux. Nous avons également utilisé les métabolites principaux de la molécule (*Anisimova et al. 1995; Boriskin et al. 2008*), et pu montrer que les deux dérivés HZ1 et HZ3 n'ont pas d'effet significatif sur la réplication du CHIKV. En outre, aucun effet virucide d'ARB HZ2 CHIKV n'a été. Ces résultats en association avec le temps d'exposition utilisé dans nos expériences indiquent que l'Arbidol inhibe la première étape du cycle de réplication du CHIKV (i.e. attachement du virus et/ou l'entrée du virus). Afin de clarifier le mécanisme d'action de l'Arbidol, nous avons sélectionné un mutant du CHIKV résistant à l'Arbidol avec une mutation en position G407R (substitution d'un acide aminé localisé dans la protéine d'enveloppe virale E2). Les alignements de séquences ont révélé que ce résidu G407 n'est pas

été conservé dans le genre Alphavirus, mais cette mutation est localisée dans le domaine A de E2 et plus précisément dans les "wings" d'insertion (*Voss et al. 2010*). Les "wings" de la protéine E2 pourraient être impliqués dans les interactions avec les récepteurs cellulaires, suggérant une relation de la substitution d'acide aminé G407R avec l'adsorption cellulaire CHIKV. L'hypothèse de ce mécanisme présomptif est soutenue par le fait que l'Arbidol inhibe l'héماغglutination par CHIKV, de manière dose dépendante.

En conclusion, l'Arbidol (HZ2) s'est avéré être un puissant inhibiteur contre l'infection in vitro CHIKV. En plus de l'élucidation de son mode d'action cellulaire, cette drogue doit encore être évaluée pour la prévention de l'infection à CHIKV et de la gestion des cas plus graves.

## ARTICLE 2

### AVANT-PROPOS

#### «Chikungunya disease and chloroquine treatment»

Le mécanisme d'action des antimalariques à effet intra-érythrocytaire comme la chloroquine, reste mal élucidé. Ces antimalariques traversent la membrane du globule rouge puis celle du Plasmodium et pénètrent dans la vacuole où ils s'accumulent, leur fonction amine étant ionisée en milieu acide. Des hypothèses parfois contradictoires ont été avancées pour expliquer leur effet toxique sur le Plasmodium : inhibition de l'hème polymérase qui transforme l'hème toxique pour le parasite en hémozoïne atoxique, formation d'un complexe de type chloroquine-hème, élévation du pH intravacuolaire et diminution de la disponibilité de fer à partir de l'hème.

La chloroquine a été utilisée pour le traitement des symptômes associés à la phase aiguë du Chikungunya, et comme un agent anti-inflammatoire pour lutter contre l'arthrite associée aux formes chroniques. Les premières études sur l'effet anti-alphaviral de la chloroquine in vitro ont été faites il ya 40 ans (*Inglot, 1969; Shimizu et al. 1972*).

En réponse à l'article publié en Mai 2010 par Journal of Medical Virology (*Khan et al. 2010*) nous nous sommes sentis obligés d'écrire un review pour remettre ce travail dans un contexte objectif.

En particulier les tests in vitro du CHIKV ont été faits en 2005 pendant l'épidémie en l'Océan Indien (*R.N. Charrel, 16th ECCMID symposium, April 2006, Nice, France; de Lamballerie et al. 2008; de Lamballerie et al. 2009; Gould E.A. et al. 2010*). Après l'épidémie de 2005-2006 la chloroquine a été administré chez 27 patients et 27 autres patients ont reçu un placebo. Les résultats ont montré qu'il n'y a pas d'amélioration clinique ou biologique (*Labadie et al. 2010*). Il nous est apparu nécessaire de montrer que la mise en évidence de l'effet anti-alphaviral de la chloroquine in vitro par Khan et collaborateurs ne constituait pas une découverte originale remettant en cause la stratégie de lutte contre le Chikungunya.

**Review accepted: *Journal of Medical Virology***

## **Chikungunya Disease and Chloroquine Treatment**

Ilenia Delogu<sup>1</sup> and Xavier de Lamballerie<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *Unité des Virus Emergents, UMR190 (Université de la Méditerranée-IRD-EHESP), Marseille, France*

\*Correspondance to: Pr. Xavier de Lamballerie, Unité des Virus Emergents, UMR190, Medical University, 27 Bd Jean Moulin, 13005 Marseille, France.

E-mail: [xavier.de-lamballerie@univmed.fr](mailto:xavier.de-lamballerie@univmed.fr)

In a recent issue of the *Journal of Medical Virology*, Khan and collaborators [2010] presented an "assessment of *in vitro* prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against chikungunya virus in Vero cells". This article mentions the fact that chloroquine, a well known drug developed for the treatment of malaria in the 1930s, was previously considered as a potent antiviral in a number of viral diseases (HIV, HBV, influenza A virus, SARS...) but makes no reference to previous studies of the antiviral activity of chloroquine against Alphaviruses (and more specifically chikungunya virus) suggesting that the authors had identified a new and promising field of investigation. Their presentation is somewhat biased and deserves significant qualification.

First, the *in vitro* antiviral effect of chloroquine is not a recent discovery. It was first reported some forty years ago [Inglot, 1969; Shimizu et al., 1972]. A clinical antiviral application of the molecule has been assessed over time for a number of viral pathogens, and the concrete benefits or risks of such treatment is still debated [Boelaert et al., 1999; Fredericksen et al., 2002; Seth et al., 1999; Savarino et al., 2006].

Regarding Alphaviruses, *in cellulo* inhibition of Sindbis and Semliki Forest virus replication was reported thirty years ago [Coombs et al., 1981; Helenius et al., 1982], but these results were balanced by those obtained from a mouse model, which suggested that chloroquine may enhance viral replication *in vivo* and aggravate the disease [Maheshwari et al., 1991].

Soon after the beginning of the chikungunya outbreak in 2005, in the Indian Ocean, the question of the possible use of chloroquine was raised. It is a matter of fact that, in many tropical areas, chloroquine is used as a symptomatic treatment of febrile illnesses and thus, the health authorities had to face its actual –non-evaluated– use at the acute phase of chikungunya disease. The (confusing) reasons why a part of the local population utilised chloroquine also possibly included the fact that immunomodulatory effects of chloroquine have been used for a long time in auto-immune and rheumatologic diseases [Cooper & Magwere, 2008], including chronic chikungunya arthritis [Brighton, 1984].

Early studies of the emerging Indian Ocean chikungunya virus (CHIKV) variant demonstrated *in vitro* inhibition of the virus replication by chloroquine [R.N. Charrel, 16th ECCMID symposium, April 2006, Nice, France; de Lamballerie et al., 2008; de Lamballerie et al., 2009; Gould E.A. et al., 2010]. Sourisseau et al. (2007) reported

that chloroquine potently inhibited the appearance of CHIKV-positive cells and CHIKV-associated cytopathic effect and noted that the therapeutic (antiviral) index of chloroquine in cell cultures is rather narrow and thus, one should be cautious when proposing the use of chloroquine as an antiviral treatment in infected individuals.

These early results led to the careful design of a clinical trial on the French Reunion Island (Indian Ocean) (CuraChik, <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00391313>), which was performed at the end of the 2006 outbreak [de Lamballerie et al., 2008]. In this double-blind placebo-controlled randomised trial, 27 patients (diagnosed within less than 48 hours) received chloroquine and 27 other patients received a placebo treatment. The chloroquine treatment consisted of 600 mg at day 1, 600 mg at days 2 and 3, and 300 mg at days 4 and 5 (and not 250 mg daily as reported by Savarino et al. [2007]). The results did not provide justification for the use of chloroquine to treat acute chikungunya infections.

In conclusion, the issue of chloroquine treatment of chikungunya virus infection has been examined for years. Whilst *in vitro* inhibition of CHIKV replication is strongly established, the narrow therapeutic index and the absence of obvious biological or clinical improvement during a clinical trial do not argue in favour of a curative use in non-complicated cases. Whether chloroquine may be useful as a prophylactic treatment, or in the case of severe, sustained chikungunya infections deserves further investigations that could take advantage of the availability of a relevant non-human primate animal model [Labadie et al., 2010].

## References

- Boelaert JR, Sperber K, Piette J. 1999. Chloroquine exerts an additive in vitro anti-HIV-1 effect, when associated with didanosine and hydroxyurea. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15:1241–1247.
- Brighton SW. 1984. Chloroquine phosphate treatment of chronic Chikungunya arthritis. An open pilot study. *S Afr Med J* 66(6):217-218.
- Coombs K, Mann E, Edwards J, Brown DT. 1981. Effects of chloroquine and cytochalasin B on the infection of cells by Sindbis virus and vesicular stomatitis virus. *J Virol* 37:1060–1065.
- Cooper RG, Magwere T. 2008. Chloroquine: novel uses & manifestations. *Indian J Med Res.* 127(4):305-316.
- Fredericksen BL, Wei BL, Yao J, Luo T, Garcia JV. 2002. Inhibition of endosomal/lysosomal degradation increases the infectivity of human immunodeficiency virus. *J Virol* 76:11440–11446.
- Helenius A, Marsh M, White J. 1982. Inhibition of Semliki forest virus penetration by lysosomotropic weak bases. *J Gen Virol* 58:47–61.
- Inglot AD. 1969. Comparison of the antiviral activity in vitro of some non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Gen Virol* 4:203–214.
- Khan M, Santhosh SR, Tiwari M, Lakshmana Rao PV, Parida M. 2010. Assessment of in vitro prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against Chikungunya virus in vero cells. *J Med Virol* 82(5):817-824.
- de Lamballerie X, Boisson V, Reynier JC, Enault S, Charrel RN, Flahault A, Roques P, Le Grand R. 2008. On chikungunya acute infection and chloroquine treatment. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8(6):837-839.
- de Lamballerie X, Ninove L, Charrel RN. 2009. Antiviral treatment of chikungunya virus infection. *Infect Disord Drug Targets* 9(2):101-104.
- Gould EA, Coutard B, Malet H, Morin B, Jamal S, Weaver S, Gorbalenya A, Moureau G, Baronti C, Delogu I, Forrester N, Khasnatinov M, Gritsun T, de Lamballerie X, Canard B. 2010. Understanding the Alphaviruses: recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. *Antiviral Res* 87(2):111-124.
- Labadie K, Larcher T, Joubert C, Mannioui A, Delache B, Brochard P, Guigand L, Dubreil L, Lebon P, Verrier B, de Lamballerie X, Suhrbier A, Cherel Y, Le Grand R, Roques P. 2010. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *J Clin Invest* 120(3):894-906.
- Maheshwari RK, Srikantan V, Bhartiya D. 1991. Chloroquine enhances replication of Semliki Forest virus and encephalomyocarditis virus in mice. *J Virol* 65:992–995.
- Savarino A, Di Trani L, Donatelli I, Cauda R, Cassone A. 2006. New insights into the antiviral effects of chloroquine. *Lancet Infect Dis* 6:67–69.
- Savarino A, Cauda R, Cassone A. 2007. On the use of chloroquine for chikungunya. *Lancet Infect Dis* 7:633.
- Seth P, Mani H, Singh AK, Banaudha KK, Madhavan S, Sidhu GS, Gaddipati JP, Vogel SN, Maheshwari RK. Acceleration of viral replication and up-regulation of cytokine levels by antimalarials: implications in malaria-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* 61:180–186.

Shimizu Y, Yamamoto S, Homma M, Ishida N. 1972. Effect of chloroquine on the growth of animal viruses. *Arch Gesamte Virusforsch* 36:93–104.

Sourisseau M, Schilte C, Casartelli N, Trouillet C, Guivel-Benhassine F, Rudnicka D, Sol-Foulon N, Roux KL, Prevost MC, Fsihi H, Frenkel MP, Blanchet F, Afonso PV, Ceccaldi PE, Ozden S, Gessain A, Schuffenecker I, Verhasselt B, Zamborlini A, Saïb A, Rey FA, Arenzana-Seisdedos F, Despres P, Michault A, Albert ML, Schwartz O. 2007. Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog* 3:e89.

## Discussion

En conclusion, les premières études du traitement du Chikungunya ont commencé en (*SW Brighton. 1984*). Bien qu'il y ait des résultats positifs in vitro, avec inhibition de la réplication du CHIKV, (*Inglot, 1969 ; Shimizu et al. 1972*) l'absence d'amélioration clinique ou biologique évidente au cours d'un essai clinique n'est pas en faveur d'une utilisation thérapeutique dans les cas simples. De nouvelles études devraient être effectuées en tant que traitement prophylactique, ou pour les infections graves même avec l'utilisation de modèles animaux (*Labadie et al. 2010*).

## References Bibliographiques

- Adhami J, Reiter P. Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J Am Mosq Control Assoc.* 1998 Sep;14(3):340-3.
- Agaisse H, Perrimon N. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol Rev.* 2004 Apr;198:72-82.
- Ahn A, Klimjack MR, Chatterjee PK, Kielian M. An epitope of the Semliki Forest virus fusion protein exposed during virus-membrane fusion. *J Virol.* 1999 Dec;73(12):10029-39
- Ahn J, Murphy M, Kratowicz S, Wang A, Levine AJ, George DL.(a) Down-regulation of the stathmin/Op18 and FKBP25 genes following p53 induction. *Oncogene.* 1999 Oct 21;18(43):5954-8.
- Ahola T, Lampio A, Auvinen P, Kaariainen L. Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. *EMBO J* 1999 ; 18 : 3164-72.
- Aliperti G, Schlesinger MJ. Evidence for an autoprotease activity of sindbis virus capsid protein. *Virology.* 1978 Oct 15;90(2):366-9.
- Andrei G, De Clercq E. Molecular approaches for the treatment of hemorrhagic fever virus infections. *Antiviral Res.* 1993 Sep;22(1):45-75.
- Andrei G, De Clercq E. Inhibitory effect of selected antiviral compounds on arenavirus replication in vitro. *Antiviral Res.* 1990 Oct-Nov;14(4-5):287-99.
- Angelini P, Finarelli AC, Silvi G, Borrini BM, Frasca G, Mattivi A, Massimiliani E, Po C, Angelini R, Venturelli C, Macini P.(a) Chikungunya emergency in Emilia-Romagna: learning through experience. *Epidemiol Prev.* 2008 Jul-Oct;32(4-5):258-63.
- Angelini P, Macini P, Finarelli AC, Pol C, Venturelli C, Bellini R, Dottori M. (b)Chikungunya epidemic outbreak in Emilia-Romagna (Italy) during summer 2007. *Parassitologia.* 2008 Jun;50(1-2):97-8.
- Basyuk E, Galli T, Mougel M, Blanchard JM, Sitbon M, Bertrand E. Retroviral genomic RNAs are transported to the plasma membrane by endosomal vesicles. *Dev Cell* 2003 ; 5 : 161-74.
- Blackburn NK, Besselaar TG, Gibson G. Antigenic relationship between chikungunya virus strains and o'nyong nyong virus using monoclonal antibodies. *Res Virol.* 1995 Jan-Feb;146(1):69-73.
- Beck CE, Wyckoff RW. VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS. *Science.* 1938 Dec 2;88(2292):530.

- Bonatti S, Migliaccio G, Simons K. Palmylation of viral membrane glycoproteins takes place after exit from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1989 Jul 25;264(21):12590-5.
- Bonatti S, Migliaccio G, Blobel G, Walter P. Role of signal recognition particle in the membrane assembly of Sindbis viral glycoproteins. *Eur J Biochem*. 1984 May 2;140(3):499-502.
- Bowers DF, Abell BA, Brown DT. Replication and tissue tropism of the Alphavirus Sindbis in the mosquito *Aedes albopictus*. *Virology*. 1995 Sep 10;212(1):1-12.
- Breakwell L, Dosenovic P, Karlsson Hedestam GB, D'Amato M, Liljeström P, Fazakerley J, McInerney GM. Semliki Forest virus nonstructural protein 2 is involved in suppression of the type I interferon response. *J Virol*. 2007 Aug;81(16):8677-84. Epub 2007 Jun 6.
- Briolant S, Garin D, Scaramozzino N, Jouan A, Crance JM. In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon-alpha and ribavirin combination. *Antiviral Res*. 2004 Feb;61(2):111-7.
- Briolant S, Parola P, Fusai T, Madamet-Torrentino M, Baret E, Mosnier J, Delmont JP, Parzy D, Minodier P, Rogier C, Pradines B. Influence of oxygen on asexual blood cycle and susceptibility of *Plasmodium falciparum* to chloroquine: requirement of a standardized in vitro assay. *Malar J*. 2007 Apr 16;6:44.
- Byrnes AP, Griffin DE. Binding of Sindbis virus to cell surface heparan sulfate. *J Virol*. 1998 Sep;72(9):7349-56.
- Calisher CH, Fremont HN, Vesely WL, el-Kafrawi AO, Mahmud MI. Relevance of detection of immunoglobulin M antibody response in birds used for arbovirus surveillance. *J Clin Microbiol*. 1986 Nov;24(5):770-4.
- Calisher CH. (a)Antigenic classification and taxonomy of flaviviruses (family Flaviviridae) emphasizing a universal system for the taxonomy of viruses causing tick-borne encephalitis. *Acta Virol*. 1988 Sep;32(5):469-78.
- Calisher CH, Karabatsos N, Laznick JS, Monath TP, Wolff KL. (b)Reevaluation of the western equine encephalitis antigenic complex of Alphaviruses (family Togaviridae) as determined by neutralization tests. *Am J Trop Med Hyg*. 1988 Mar;38(2):447-52.
- Campbell CL, Black WC 4th, Hess AM, Foy BD. Comparative genomics of small RNA regulatory pathway components in vector mosquitoes. *BMC Genomics*. 2008 Sep 18;9:425.
- Carey DE, Myers RM, DeRanitz CM, Jadhav M, Reuben R. The 1964 chikungunya epidemic at Vellore, South India, including observations on concurrent dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1969;63(4):434-45.
- CASALS J, BROWN LV. Hemagglutination with arthropod-borne viruses. *J Exp Med*. 1954 May 1;99(5):429-49.

Cassell S, Edwards J, Brown DT. Effects of lysosomotropic weak bases on infection of BHK-21 cells by Sindbis virus. *J Virol*. 1984 Dec;52(3):857-64.

Charrel RN, de Lamballerie X. Chikungunya virus in north-eastern Italy: a consequence of seasonal synchronicity. *Euro Surveill*. 2008 Jan 3;13(1). pii: 8003; author reply pii: 8004.

CHASTEL C. HUMAN INFECTIONS IN CAMBODIA BY THE CHIKUNGUNYA VIRUS OR A CLOSELY RELATED AGENT. 3. EPIDEMIOLOGY. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*. 1964 Jan-Feb;57:65-82.

Chazal N, Gerlier D. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003 Jun;67(2):226-37, table of contents.

Chazaud B, Chrétien F, Gherardi RK. Macrophages regulate skeletal muscle regeneration *Med Sci (Paris)*. 2007 Oct;23(10):794-5.

Cheng RH, Kuhn RJ, Olson NH, Rossmann MG, Choi HK, Smith TJ, Baker TS. Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus. *Cell*. 1995 Feb 24;80(4):621-30.

Cho B, Jeon BY, Kim J, Noh J, Kim J, Park M, Park S. (a)Expression and evaluation of Chikungunya virus E1 and E2 envelope proteins for serodiagnosis of Chikungunya virus infection. *Yonsei Med J*. 2008 Oct 31;49(5):828-35

Cho B, Kim J, Cho JE, Jeon BY, Park S. (b)Expression of the capsid protein of Chikungunya virus in a baculovirus for serodiagnosis of Chikungunya disease. *J Virol Methods*. 2008 Dec;154(1-2):154-9. Epub 2008 Oct 1.

Choi HK, Tong L, Minor W, Dumas P, Boege U, Rossmann MG, Wengler G. Structure of Sindbis virus core protein reveals a chymotrypsin-like serine proteinase and the organization of the virion. *Nature*. 1991 Nov 7;354(6348):37-43.

Coombs K, Mann E, Edwards J, Brown DT. Effects of chloroquine and cytochalasin B on the infection of cells by Sindbis virus and vesicular stomatitis virus. *Virology*. 1981 Mar;37(3):1060-5.

Cordel H, Quatresous I, Paquet C, Couturier E. Imported cases of chikungunya in metropolitan France, April 2005 - February 2006. *Euro Surveill*. 2006 Apr 20;11(4):E060420.3.

Couderc T, Chrétien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M, Guivel-Benhassine F, Touret Y, Barau G, Cayet N, Schuffenecker I, Desprès P, Arenzana-Seisdedos F, Michault A, Albert ML, Lecuit M. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathog*. 2008 Feb 8;4(2):e29.

Corver J, Moesby L, Erukulla RK, Reddy KC, Bittman R, Wilschut J. Sphingolipid-dependent fusion of Semliki Forest virus with cholesterol-containing liposomes requires both the 3-hydroxyl group and the double bond of the sphingolipid backbone. *J Virol*. 1995 May;69(5):3220-3.

Crotty S, Cameron CE, Andino R. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 5;98(12):6895-900. Epub 2001 May 22.

Dash PK, Parida M, Santhosh SR, Saxena P, Srivastava A, Neeraja M, Lakshmi V, Rao PV. Development and evaluation of a 1-step duplex reverse transcription polymerase chain reaction for differential diagnosis of chikungunya and dengue infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 Sep;62(1):52-7. Epub 2008 Jun 25.

Dalgarno L, Rice CM, Strauss JH. Ross River virus 26 s RNA: complete nucleotide sequence and deduced sequence of the encoded structural proteins. *Virology*. 1983 Aug;129(1):170-87.

Davis NL, Fuller FJ, Dougherty WG, Olmsted RA, Johnston RE. A single nucleotide change in the E2 glycoprotein gene of Sindbis virus affects penetration rate in cell culture and virulence in neonatal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Sep;83(18):6771-5.

De Clercq E, Bernaerts R, Shealy YF, Montgomery JA. Broad-spectrum antiviral activity of carbodine, the carbocyclic analogue of cytidine. *Biochem Pharmacol*. 1990 Jan 15;39(2):319-25.

de Curtis I, Simons K. Dissection of Semliki Forest virus glycoprotein delivery from the trans-Golgi network to the cell surface in permeabilized BHK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Nov;85(21):8052-6.

De Gregorio E, Spellman PT, Tzou P, Rubin GM, Lemaitre B. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO J*. 2002 Jun 3;21(11):2568-79.

de Groot RJ, Hardy WR, Shirako Y, Strauss JH. Cleavage-site preferences of Sindbis virus polyproteins containing the non-structural proteinase. Evidence for temporal regulation of polyprotein processing in vivo. *EMBO J*. 1990 Aug;9(8):2631-8.

de Lamballerie X, Boisson V, Reynier JC, Enault S, Charrel RN, Flahault A, Roques P, Le Grand R. (a)On chikungunya acute infection and chloroquine treatment. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008 Dec;8(6):837-9.

de Lamballerie X, Leroy E, Charrel RN, Ttsetsarkin K, Higgs S, Gould EA. (b)Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *Virology*. 2008 Feb 27;5:33.

de Lamballerie X, Ninove L, Charrel RN. Antiviral treatment of chikungunya virus infection. *Infect Disord Drug Targets*. 2009 Apr;9(2):101-4.

Delatte H, Paupy C, Dehecq JS, Thiria J, Failloux AB, Fontenille D. *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue viruses in Reunion Island: biology and control. *Parasite*. 2008 Mar;15(1):3-13.

Dhileepan K, Azuolas JK, Gibson CA. Evidence of vertical transmission of Ross River and Sindbis viruses (Togaviridae: Alphavirus) by mosquitoes (Diptera: Culicidae) in southeastern Australia. *J Med Entomol*. 1996 Jan;33(1):180-2.

- Diallo M, Thonnon J, Traore-Lamizana M, Fontenille D. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Feb;60(2):281-6.
- Eckels KH, Harrison VR, Hetrick FM. Chikungunya virus vaccine prepared by Tween-ether extraction. *Appl Microbiol.* 1970 Feb;19(2):321-5.
- Edelman R, Tacket CO, Wasserman SS, Bodison SA, Perry JG, Mangiafico JA. Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. *Am J Trop Med Hyg.* 2000 Jun;62(6):681-5.
- Edgerly JS, Willey MS, Livdahl T. Intraguild predation among larval treehole mosquitoes, *Aedes albopictus*, *Ae. aegypti*, and *Ae. triseriatus* (Diptera: Culicidae), in laboratory microcosms. *J Med Entomol.* 1999 May;36(3):394-9.
- Edwards CJ, Welch SR, Chamberlain J, Hewson R, Tolley H, Cane PA, Lloyd G. Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus. *J Clin Virol.* 2007 Aug;39(4):271-5. Epub 2007 Jul 12.
- Enserink M. Infectious diseases. Massive outbreak draws fresh attention to little-known virus. *Science.* 2006 Feb 24;311(5764):1085.
- Fata CL, Sawicki SG, Sawicki DL. Alphavirus minus-strand RNA synthesis: identification of a role for Arg183 of the nsP4 polymerase. *J Virol.* 2002 Sep;76(17):8632-40.
- Fayzulin R, Frolov I. Changes of the secondary structure of the 5' end of the Sindbis virus genome inhibit virus growth in mosquito cells and lead to accumulation of adaptive mutations. *J Virol.* 2004 May;78(10):4953-64.
- Fazakerley JK, Boyd A, Mikkola ML, Kääriäinen L. A single amino acid change in the nuclear localization sequence of the nsP2 protein affects the neurovirulence of Semliki Forest virus. *J Virol.* 2002 Jan;76(1):392-6.
- Field 5<sup>ème</sup> édition
- Flynn DC, Meyer WJ, Mackenzie JM Jr, Johnston RE. A conformational change in Sindbis virus glycoproteins E1 and E2 is detected at the plasma membrane as a consequence of early virus-cell interaction. *J Virol.* 1990 Aug;64(8):3643-53.
- Fontenille D, Mathiot C, Rodhain F, Maleyran D, Rakotoarivony I, Digoutte JP, Coulanges P. Arbovirus diseases in the region of Tsiroanomandidy, Madagascar. Entomological, virological and serological studies *Ann Soc Belg Med Trop.* 1988 Mar;68(1):43-52.
- Fontenille D, Diallo M, Mondo M, Ndiaye M, Thonnon J. First evidence of natural vertical transmission of yellow fever virus in *Aedes aegypti*, its epidemic vector. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997 Sep-Oct;91(5):533-5.
- Forsell K, Griffiths G, Garoff H. Preformed cytoplasmic nucleocapsids are not necessary for alphavirus budding. *EMBO J* 1996 ; 15 : 6495-505.

- Forsell PA, Boie Y, Montalibet J, Collins S, Kennedy BP. Genomic characterization of the human and mouse protein tyrosine phosphatase-1B genes. *Gene*. 2000 Dec 30;260(1-2):145-53.
- Fragkoudis R, Chi Y, Siu RW, Barry G, Attarzadeh-Yazdi G, Merits A, Nash AA, Fazakerley JK, Kohl A. Semliki Forest virus strongly reduces mosquito host defence signaling. *Insect Mol Biol*. 2008 Dec;17(6):647-56. Epub 2008 Sep 22.
- FRIEDMAN RM. ROLE OF INTERFERON IN VIRAL INTERFERENCE. *Nature*. 1964 Feb 22;201:848-9.
- Frolov I, Hardy R, Rice CM. Cis-acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. *RNA*. 2001 Nov;7(11):1638-51.
- Frolova EI, Fayzulin RZ, Cook SH, Griffin DE, Rice CM, Frolov I. Roles of nonstructural protein nsP2 and Alpha/Beta interferons in determining the outcome of Sindbis virus infection. *J Virol*. 2002 Nov;76(22):11254-64.
- Froshauer S, Kartenbeck J, Helenius A. Alphavirus RNA replicase is located on the cytoplasmic surface of endosomes and lysosomes. *J Cell Biol*. 1988 Dec;107(6 Pt 1):2075-86.
- Fuller SD, Argos P. Is Sindbis a simple picornavirus with an envelope. *EMBO J*. 1987 Apr;6(4):1099-105.
- Gaedigk-Nitschko K, Schlesinger MJ. (a)The Sindbis virus 6K protein can be detected in virions and is acylated with fatty acids. *Virology*. 1990 Mar;175(1):274-81.
- Gaedigk-Nitschko K, Ding MX, Levy MA, Schlesinger MJ. (b)Site-directed mutations in the Sindbis virus 6K protein reveal sites for fatty acylation and the underacylated protein affects virus release and virion structure. *Virology*. 1990 Mar;175(1):282-91.
- Galbraith SE, Sheahan BJ, Atkins GJ. Deletions in the hypervariable domain of the nsP3 gene attenuate Semliki Forest virus virulence. *J Gen Virol*. 2006 Apr;87(Pt 4):937-47.
- Garmashova N, Gorchakov R, Frolova E, Frolov I. Sindbis virus nonstructural protein nsP2 is cytotoxic and inhibits cellular transcription. *J Virol*. 2006 Jun;80(12):5686-96.
- Garmashova N, Gorchakov R, Volkova E, Paessler S, Frolova E, Frolov I. The Old World and New World Alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff. *J Virol*. 2007 Mar;81(5):2472-84. Epub 2006 Nov 15.
- Garoff H, Sjöberg M, Cheng RH. Budding of Alphaviruses. *Virus Res*. 2004 Dec;106(2):103-16.
- Garoff H, Simons K, Dobberstein B. Assembly of the Semliki Forest virus membrane glycoproteins in the membrane of the endoplasmic reticulum in vitro. *J Mol Biol*. 1978 Oct 5;124(4):587-600.
- Garoff H, Simons K, Renkonen O. Isolation and characterization of the membrane proteins of Semliki Forest virus. *Virology*. 1974 Oct;61(2):493-504.

Garoff H, Huylebroeck D, Robinson A, Tillman U, Liljeström P. The signal sequence of the p62 protein of Semliki Forest virus is involved in initiation but not in completing chain translocation. *J Cell Biol.* 1990 Sep;111(3):867-76.

George J, Raju R. Alphavirus RNA genome repair and evolution: molecular characterization of infectious sindbis virus isolates lacking a known conserved motif at the 3' end of the genome. *Viol.* 2000 Oct;74(20):9776-85.

Gérardin P, Guernier V, Perrau J, Fianu A, Le Roux K, Grivard P, Michault A, de Lamballerie X, Flahault A, Favier F. Estimating Chikungunya prevalence in La Réunion Island outbreak by serosurveys: two methods for two critical times of the epidemic. *BMC Infect Dis.* 2008 Jul 28;8:99.

Gibbs EP. Equine viral encephalitis. *Equine Vet J.* 1976 Apr;8(2):66-71.

Gibbons DL, Ahn A, Chatterjee PK, Kielian M. Formation and characterization of the trimeric form of the fusion protein of Semliki Forest Virus. *J Virol.* 2000 Sep;74(17):7772-80.

Gibbons DL, Erk I, Reilly B, Navaza J, Kielian M, Rey FA, Lepault J. Visualization of the target-membrane-inserted fusion protein of Semliki Forest virus by combined electron microscopy and crystallography. *Cell.* 2003 Sep 5;114(5):573-83.

Gibbons DL, Vaney MC, Roussel A, Vigouroux A, Reilly B, Lepault J, Kielian M, Rey FA. (a)Conformational change and protein-protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus. *Nature.* 2004 Jan 22;427(6972):320-5.

Gibbons DL, Ahn A, Liao M, Hammar L, Cheng RH, Kielian M. (b)Multistep regulation of membrane insertion of the fusion peptide of Semliki Forest virus. *J Virol.* 2004 Apr;78(7):3312-8.

GIFFORD GE, MUSSETT MV, HELLER E. COMPARATIVE STUDIES ON THE PRODUCTION AND ASSAY OF INTERFERON. *J Gen Microbiol.* 1964 Mar;34:475-81.

Glasgow LA. Leukocytes and interferon in the host response to viral infections. II. Enhanced interferon response of leukocytes from immune animals. *J Bacteriol.* 1966 Jun;91(6):2185-91.

Greiser-Wilke I, Moenning V, Kaaden OR, Figueiredo LT. Most Alphaviruses share a conserved epitopic region on their nucleocapsid protein. *J Gen Virol.* 1989 Mar;70 ( Pt 3):743-8.

Grieder FB, Vogel SN. Role of interferon and interferon regulatory factors in early protection against Venezuelan equine encephalitis virus infection. *Virology.* 1999 Apr 25;257(1):106-18.

Grivard P, Le Roux K, Laurent P, Fianu A, Perrau J, Gigan J, Hoarau G, Grondin N, Staikowsky F, Favier F, Michault A. Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. *Pathol Biol (Paris).* 2007 Dec;55(10):490-4. Epub 2007 Oct 24.

Gould EA, Coutard B, Malet H, Morin B, Jamal S, Weaver S, Gorbalenya A, Moureau G, Baronti C, Delogu I, Forrester N, Khasnatinov M, Gritsun T, de Lamballerie X, Canard B.

Understanding the Alphaviruses: recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. *Antiviral Res.* 2010 Aug;87(2):111-24. Epub 2009 Jul 16.

Gould EA, Higgs S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009 Feb;103(2):109-21. Epub 2008 Sep 16.

Gorbalenya AE, Koonin EV. One more conserved sequence motif in helicases. *Nucleic Acids Res.* 1988 Aug 11;16(15):7734.

Gorbalenya AE, Koonin EV, Lai MM. Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses. *FEBS Lett.* 1991 Aug 19;288(1-2):201-5.

Gorchakov R, Frolova E, Frolov I. Inhibition of transcription and translation in Sindbis virus-infected cells. *J Virol.* 2005 Aug;79(15):9397-409.

Gumina G, Chong Y, Choo H, Song GY, Chu CK. L-nucleosides: antiviral activity and molecular mechanism. *Curr Top Med Chem.* 2002 Oct;2(10):1065-86.

Guillet P, Nathan M. *Aedes albopictus*, a threat to France?. *Med Trop (Mars).* 1999;59(2 Suppl):49-52.

Hahn CS, Lustig S, Strauss EG, Strauss JH. Western equine encephalitis virus is a recombinant virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Aug;85(16):5997-6001

Hahn CS, Strauss EG, Strauss JH. Dideoxy sequencing of RNA using reverse transcriptase. *Methods Enzymol.* 1989;180:121-30.

Hahn CS, Strauss JH. Site-directed mutagenesis of the proposed catalytic amino acids of the Sindbis virus capsid protein autoprotease. *J Virol.* 1990 Jun;64(6):3069-73.

Hammar L, Markarian S, Haag L, Lankinen H, Salmi A, Cheng RH. Prefusion rearrangements resulting in fusion Peptide exposure in Semliki forest virus. *J Biol Chem.* 2003 Feb 28;278(9):7189-98. Epub 2002 Dec 17.

Hardy WR, Strauss JH. Processing the nonstructural polyproteins of sindbis virus: nonstructural proteinase is in the C-terminal half of nsP2 and functions both in cis and in trans. *J Virol.* 1989 Nov;63(11):4653-64.

Harrison VR, Eckels KH, Bartelloni PJ, Hampton C.

Production and evaluation of a formalin-killed Chikungunya vaccine. *J Immunol.* 1971 Sep;107(3):643-7.

Helenius A, Kartenbeck J. The effects of octylglucoside on the Semliki forest virus membrane. Evidence for a spike-protein--nucleocapsid interaction. *Eur J Biochem.* 1980 May;106(2):613-18.

- Helenius A, Marsh M, White J. Inhibition of Semliki forest virus penetration by lysosomotropic weak bases. *J Gen Virol.* 1982 Jan;58 Pt 1:47-61.
- Hertz JM, Huang HV. (a)Evolution of the Sindbis virus subgenomic mRNA promoter in cultured cells. *J Virol.* 1995 Dec;69(12):7768-74.
- Hertz JM, Huang HV. (b)Host-dependent evolution of the Sindbis virus promoter for subgenomic mRNA synthesis. *J Virol.* 1995 Dec;69(12):7775-81.
- Hobbs JH, Hughes EA, Eichold BH 2nd. Replacement of *Aedes aegypti* by *Aedes albopictus* in Mobile, Alabama. *J Am Mosq Control Assoc.* 1991 Sep;7(3):488-9.
- Hochedez P, Jaureguiberry S, Debruyne M, Bossi P, Hausfater P, Brucker G, Bricaire F, Caumes E. Chikungunya infection in travelers. *Emerg Infect Dis.* 2006 Oct;12(10):1565-7.
- Hornby JA, Moore DE, Miller TW Jr. *Aedes albopictus* distribution, abundance, and colonization in Lee County, Florida, and its effect on *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc.* 1994 Sep;10(3):397-402.
- Houk EJ, Arcus YM, Hardy JL, Kramer LD. Binding of western equine encephalomyelitis virus to brush border fragments isolated from mesenteron epithelial cells of mosquitoes. *Virus Res.* 1990 Oct;17(2):105-17.
- Huang YM. A new subgenus of *Aedes* (Diptera, Culicidae) with illustrated key to the subgenera of the Papuan Subregion (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1968 Jun 10;5(2):169-88.
- Hawley WA. The biology of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc Suppl.* 1988 Dec;1:1-39. Ingot AD. Comparison of the antiviral activity in vitro of some non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Gen Virol.* 1969 Mar;4(2):203-14.
- Inoue S, Morita K, Matias RR, Tuplano JV, Resuello RR, Candelario JR, Cruz DJ, Mapua CA, Hasebe F, Igarashi A, Natividad FF. Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines. *J Med Primatol.* 2003 Apr;32(2):89-94.
- InVS 2005.  
[http://www.invs.sante.fr/presse/2005/le\\_point\\_sur/chikungunya\\_190505/index.html](http://www.invs.sante.fr/presse/2005/le_point_sur/chikungunya_190505/index.html)
- InVS2006.  
[http://www.invs.sante.fr/presse/2006/communiqués/chikungunya\\_280406/index.html](http://www.invs.sante.fr/presse/2006/communiqués/chikungunya_280406/index.html)
- Ivanova L, Lustig S, Schlesinger MJ. A pseudo-revertant of a Sindbis virus 6K protein mutant, which corrects for aberrant particle formation, contains two new mutations that map to the ectodomain of the E2 glycoprotein. *Virology.* 1995 Feb 1;206(2):1027-34.
- Ivanova L, Schlesinger MJ. Site-directed mutations in the Sindbis virus E2 glycoprotein identify palmitoylation sites and affect virus budding. *J Virol.* 1993 May;67(5):2546-51.

- Jan JT, Byrnes AP, Griffin DE. Characterization of a Chinese hamster ovary cell line developed by retroviral insertional mutagenesis that is resistant to Sindbis virus infection. *J Virol.* 1999 Jun;73(6):4919-24.
- Julander JG, Bowen RA, Rao JR, Day C, Shafer K, Smee DF, Morrey JD, Chu CK. Treatment of Venezuelan equine encephalitis virus infection with (-)-carbodine. *Antiviral Res.* 2008 Dec;80(3):309-15. Epub 2008 Aug 15.
- Juliano SL. Mapping the sensory mosaic. *Science.* 1998 Mar 13;279(5357):1653-4.
- Kääriäinen L, Sawicki D, Gomatos PJ. Cleavage defect in the non-structural polyprotein of Semliki Forest virus has two separate effects on virus RNA synthesis. *J Gen Virol.* 1978 Jun;39(3):463-73.
- Kail M, Hollinshead M, Ansorge W, Pepperkok R, Frank R, Griffiths G, Vaux D. The cytoplasmic domain of Alphavirus E2 glycoprotein contains a short linear recognition signal required for viral budding. *EMBO J.* 1991 Sep;10(9):2343-51.
- Kamer G, Argos P. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res.* 1984 Sep 25;12(18):7269-82.
- Keene KM, Foy BD, Sanchez-Vargas I, Beaty BJ, Blair CD, Olson KE. RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Dec 7;101(49):17240-5. Epub 2004 Dec 6.
- Keränen S, Ruohonen L. Nonstructural proteins of Semliki Forest virus: synthesis, processing, and stability in infected cells. *J Virol.* 1983 Sep;47(3):505-15.
- Keyaerts E, Vijgen L, Chen L, Maes P, Hedenstierna G, Van Ranst M. Inhibition of SARS-coronavirus infection in vitro by S-nitroso-N-acetylpenicillamine, a nitric oxide donor compound. *Int J Infect Dis.* 2004 Jul;8(4):223-6.
- Khamitov RA, Loginova SI, Shchukina VN, Borisevich SV, Maksimov VA, Shuster AM. Antiviral activity of arbidol and its derivatives against the pathogen of severe acute respiratory syndrome in the cell cultures. *Vopr Virusol.* 2008 Jul-Aug;53(4):9-13.
- Khan AH, Morita K, Parquet Md Mdel C, Hasebe F, Mathenge EG, Igarashi A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J Gen Virol.* 2002 Dec;83(Pt 12):3075-84.
- Kielian MC, Helenius A. Role of cholesterol in fusion of Semliki Forest virus with membranes. *J Virol.* 1984 Oct;52(1):281-3.
- Kielian M. Class II virus membrane fusion proteins. *Virology.* 2006 Jan 5;344(1):38-47. Review.

- Kitchen A, Shackelton LA, Holmes EC. Family level phylogenies reveal modes of macroevolution in RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jan 4;108(1):238-43. Epub 2010 Dec 20.
- Klimstra WB, Ryman KD, Johnston RE. Adaptation of Sindbis virus to BHK cells selects for use of heparan sulfate as an attachment receptor. *J Virol*. 1998 Sep;72(9):7357-66.
- Klimstra WB, Nangle EM, Smith MS, Yurochko AD, Ryman KD. DC-SIGN and L-SIGN can act as attachment receptors for Alphaviruses and distinguish between mosquito cell- and mammalian cell-derived viruses. *J Virol*. 2003 Nov;77(22):12022-32. Erratum in: *J Virol*. 2004 Jul;78(14):7862.
- Klimjack MR, Jeffrey S, Kielian M. Membrane and protein interactions of a soluble form of the Semliki Forest virus fusion protein. *J Virol*. 1994 Nov;68(11):6940-6.
- Koonin EV. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. *J Gen Virol*. 1993 Apr;74 ( Pt 4):733-40.
- Koschinski A, Wengler G, Wengler G, Repp H. The membrane proteins of flaviviruses form ion-permeable pores in the target membrane after fusion: identification of the pores and analysis of their possible role in virus infection. *J Gen Virol*. 2003 Jul;84(Pt 7):1711-21.
- Koschinski A, Wengler G, Wengler G, Repp H. Rare earth ions block the ion pores generated by the class II fusion proteins of Alphaviruses and allow analysis of the biological functions of these pores. *J Gen Virol*. 2005 Dec;86(Pt 12):3311-20.
- Kubes V, Rios FA. Equine Encephalomyelitis in Venezuela: Advance Data Concerning the Causative Agent. *Can J Comp Med*. 1939 Feb;3(2):43-4.
- Kuhn RJ, Hong Z, Strauss JH. Mutagenesis of the 3' nontranslated region of Sindbis virus RNA. *J Virol*. 1990 Apr;64(4):1465-76.
- Kujala P, Ikäheimonen A, Ehsani N, Vihinen H, Auvinen P, Kääriäinen L. Biogenesis of the Semliki Forest virus RNA replication complex. *J Virol*. 2001 Apr;75(8):3873-84.
- Laakkonen P, Ahola T, Kääriäinen L. The effects of palmitoylation on membrane association of Semliki forest virus RNA capping enzyme. *J Biol Chem*. 1996 Nov 8;271(45):28567-71.
- Labadie K, Larcher T, Joubert C, Mannioui A, Delache B, Brochard P, Guigand L, Dubreil L, Lebon P, Verrier B, de Lamballerie X, Suhrbier A, Cherel Y, Le Grand R, Roques P. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *J Clin Invest*. 2010 Mar 1;120(3):894-906. doi: 10.1172/JCI40104. Epub 2010 Feb 22.
- Laine R, Söderlund H, Renkonen O. Chemical composition of Semliki forest virus. *Intervirology*. 1973;1(2):110-8.

- Lanzrein M, Schlegel A, Kempf C. Entry and uncoating of enveloped viruses. *Biochem J*. 1994 Sep 1;302 ( Pt 2):313-20.
- Lee P, Knight R, Smit JM, Wilschut J, Griffin DE. A single mutation in the E2 glycoprotein important for neurovirulence influences binding of sindbis virus to neuroblastoma cells. *J Virol*. 2002 Jun;76(12):6302-10.
- Lee S, Owen KE, Choi HK, Lee H, Lu G, Wengler G, Brown DT, Rossmann MG, Kuhn RJ. Identification of a protein binding site on the surface of the Alphavirus nucleocapsid and its implication in virus assembly. *Structure*. 1996 May 15;4(5):531-41.
- Lemm JA, Rice CM. Assembly of functional Sindbis virus RNA replication complexes: requirement for coexpression of P123 and P34. *J Virol*. 1993 Apr;67(4):1905-15.
- Lemm JA, Rümenapf T, Strauss EG, Strauss JH, Rice CM. Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. *EMBO J*. 1994 Jun 15;13(12):2925-34.
- Lescar J, Roussel A, Wien MW, Navaza J, Fuller SD, Wengler G, Wengler G, Rey FA. The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell*. 2001 Apr 6;105(1):137-48.
- Levitt NH, Ramsburg HH, Hasty SE, Repik PM, Cole FE Jr, Lupton HW. Development of an attenuated strain of chikungunya virus for use in vaccine production. *Vaccine*. 1986 Sep;4(3):157-62.
- Levinson RS, Strauss JH, Strauss EG. Complete sequence of the genomic RNA of O'nyong-nyong virus and its use in the construction of Alphavirus phylogenetic trees. *Virology*. 1990 Mar;175(1):110-23.
- Levis R, Schlesinger S, Huang HV. Promoter for Sindbis virus RNA-dependent subgenomic RNA transcription. *J Virol*. 1990 Apr;64(4):1726-33.
- Leyssen P, Charlier N, Paeshuyse J, De Clercq E, Neyts J. Prospects for antiviral therapy. *Adv Virus Res*. 2003;61:511-53.
- Leyssen P, De Clercq E, Neyts J. The anti-yellow fever virus activity of ribavirin is independent of error-prone replication. *Mol Pharmacol*. 2006 Apr;69(4):1461-7. Epub 2006 Jan 18.
- Li GP, La Starza MW, Hardy WR, Strauss JH, Rice CM. Phosphorylation of Sindbis virus nsP3 in vivo and in vitro. *Virology*. 1990 Nov;179(1):416-27.
- Li GP, Zhao JF, Yang HY, Yang XD, Zhang HB, Li L. Arylglycerol glucosides from *Dracocephalum forrestii*. *J Asian Nat Prod Res*. 2007 Apr-Aug;9(3-5):457-61.
- Liljeström P, Garoff H. (a)Internally located cleavable signal sequences direct the formation of Semliki Forest virus membrane proteins from a polyprotein precursor. *J Virol*. 1991 Jan;65(1):147-54.

- Liljeström P, Lusa S, Huylebroeck D, Garoff H. (b)In vitro mutagenesis of a full-length cDNA clone of Semliki Forest virus: the small 6,000-molecular-weight membrane protein modulates virus release. *J Virol.* 1991 Aug;65(8):4107-13.
- Lindsay MD, Broom AK, Wright AE, Johansen CA, Mackenzie JS. Ross River virus isolations from mosquitoes in arid regions of Western Australia: implication of vertical transmission as a means of persistence of the virus. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 Dec;49(6):686-96.
- Lobigs M, Wahlberg JM, Garoff H. Spike protein oligomerization control of Semliki Forest virus fusion. *J Virol.* 1990 Oct;64(10):5214-8.
- Ludwig GV, Kondig JP, Smith JF. A putative receptor for Venezuelan equine encephalitis virus from mosquito cells. *J Virol.* 1996 Aug;70(8):5592-9.
- LUMSDEN WH. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1955 Jan;49(1):33-57.
- Maheshwari RK, Srikantan V, Bhartiya D. Chloroquine enhances replication of Semliki Forest virus and encephalomyocarditis virus in mice. *J Virol.* 1991 Feb;65(2):992-5.
- Mahmood F, Chiles RE, Fang Y, Barker CM, Reisen WK. Role of nestling mourning doves and house finches as amplifying hosts of St. Louis encephalitis virus. *J Med Entomol.* 2004 Sep;41(5):965-72.
- Marchette NJ, Rudnick A, Garcia R, MacVean DW. Alphaviruses in Peninsular Malaysia: I. Virus isolations and animal serology. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1978 Sep;9(3):317-29.
- Marsh M, Helenius A. Virus entry into animal cells. *Adv Virus Res.* 1989;36:107-51.
- Mayuri, Geders TW, Smith JL, Kuhn RJ. Role for conserved residues of sindbis virus nonstructural protein 2 methyltransferase-like domain in regulation of minus-strand synthesis and development of cytopathic infection. *J Virol.* 2008 Aug;82(15):7284-97. Epub 2008 May 21.
- McClain DJ, Pittman PR, Ramsburg HH, Nelson GO, Rossi CA, Mangiafico JA, Schmaljohn AL, Malinoski FJ. Immunologic interference from sequential administration of live attenuated Alphavirus vaccines. *J Infect Dis.* 1998 Mar;177(3):634-41.
- Ming CK, Thein S, Thaug U, U T, Nwe K, Diwan AR. Serologic survey for certain childhood viral infections in Rangoon in 1971. *J Trop Med Hyg.* 1974 Nov;77(11):260-6.
- Melancon P, Garoff H. Processing of the Semliki Forest virus structural polyprotein: role of the capsid protease. *J Virol.* 1987 May;61(5):1301-9.

- Melton JV, Ewart GD, Weir RC, Board PG, Lee E, Gage PW. Alphavirus 6K proteins form ion channels. *J Biol Chem*. 2002 Dec 6;277(49):46923-31. Epub 2002 Sep 12.
- Merits A, Vasiljeva L, Ahola T, Kääriäinen L, Auvinen P. Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein by nsP2 protease. *J Gen Virol*. 2001 Apr;82(Pt 4):765-73.
- Meyer KF, Haring CM, Howitt B. THE ETIOLOGY OF EPIZOOTIC ENCEPHALOMYELITIS OF HORSES IN THE SAN JOAQUIN VALLEY, 1930. *Science*. 1931 Aug 28;74(1913):227-8.
- Meyer WJ, Johnston RE. Structural rearrangement of infecting Sindbis virions at the cell surface: mapping of newly accessible epitopes. *J Virol*. 1993 Sep;67(9):5117-25.
- Moesby L, Corver J, Erukulla RK, Bittman R, Wilschut J. Sphingolipids activate membrane fusion of Semliki Forest virus in a stereospecific manner. *Biochemistry*. 1995 Aug 22;34(33):10319-24.
- Myers RM, Carey DE, Reuben R, Jesudass ES, De Ranitz C, Jadhav M. The 1964 epidemic of dengue-like fever in South India: isolation of chikungunya virus from human sera and from mosquitoes. *Indian J Med Res*. 1965 Aug;53(8):694-701.
- Myles KM, Kelly CL, Ledermann JP, Powers AM. Effects of an opal termination codon preceding the nsP4 gene sequence in the O'Nyong-Nyong virus genome on *Anopheles gambiae* infectivity. *J Virol*. 2006 May;80(10):4992-7.
- Myles KM, Pierro DJ, Olson KE. Deletions in the putative cell receptor-binding domain of Sindbis virus strain MRE16 E2 glycoprotein reduce midgut infectivity in *Aedes aegypti*. *J Virol*. 2003 Aug;77(16):8872-81.
- Moore DL, Reddy S, Akinkugbe FM, Lee VH, David-West TS, Causey OR, Carey DE. An epidemic of chikungunya fever at Ibadan, Nigeria, 1969. *Ann Trop Med Parasitol*. 1974 Mar;68(1):59-68.
- Moore DL, Causey OR, Carey DE, Reddy S, Cooke AR, Akinkugbe FM, David-West TS, Kemp GE.
- Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964-1970. *Ann Trop Med Parasitol*. 1975 Mar;69(1):49-64.
- Mourya DT, Ranadive SN, Gokhale MD, Barde PV, Padbidri VS, Banerjee K. Putative chikungunya virus-specific receptor proteins on the midgut brush border membrane of *Aedes aegypti* mosquito. *Indian J Med Res*. 1998 Jan;107:10-4.
- Mrkic B, Tetaz T, Kempf C. Cleavage of incoming Semliki Forest virus capsid protein within the endocytotic pathway: a feature common to both invertebrate and mammalian cells. *Arch Virol*. 1997;142(9):1895-902.

- Mukhopadhyay S, Zhang W, Gabler S, Chipman PR, Strauss EG, Strauss JH, Baker TS, Kuhn RJ, Rossmann MG. Mapping the structure and function of the E1 and E2 glycoproteins in Alphaviruses. *Structure*. 2006 Jan;14(1):63-73.
- Muthumani K, Lankaraman KM, Laddy DJ, Sundaram SG, Chung CW, Sako E, Wu L, Khan A, Sardesai N, Kim JJ, Vijayachari P, Weiner DB. Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against Chikungunya virus. *Vaccine*. 2008 Sep 19;26(40):5128-34. Epub 2008 Apr 14.
- Muyembe-Tamfum JJ, Peyrefitte CN, Yogolelo R, Mathina Basisya E, Koyange D, Pukuta E, Mashako M, Tolou H, Durand JP. Epidemic of Chikungunya virus in 1999 and 2000 in the Democratic Republic of the Congo. *Med Trop (Mars)*. 2003;63(6):637-8.
- Nakouné E, Finance C, Le Faou A, Rihn B. The Chikungunya virus *Ann Biol Clin (Paris)*. 2007 Jul-Aug;65(4):349-56.
- Nasci RS, Hare SG, Willis FS. Interspecific mating between Louisiana strains of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the field and laboratory. *J Am Mosq Control Assoc*. 1989 Sep;5(3):416-21.
- Nagy PD, Bujarski JJ. Homologous RNA recombination in brome mosaic virus: AU-rich sequences decrease the accuracy of crossovers. *J Virol*. 1996 Jan;70(1):415-26
- Niesters HG, Strauss JH. (a)Defined mutations in the 5' nontranslated sequence of Sindbis virus RNA. *J Virol*. 1990 Sep;64(9):4162-8.
- Niesters HG, Strauss JH. (b)Mutagenesis of the conserved 51-nucleotide region of Sindbis virus. *J Virol*. 1990 Apr;64(4):1639-47.
- Nieva JL, Sanz MA, Carrasco L. Membrane-permeabilizing motif in Semliki forest virus E1 glycoprotein. *FEBS Lett*. 2004 Oct 22;576(3):417-22.
- Obeyesekere I, Hermon Y. Myocarditis and cardiomyopathy after arbovirus infections (dengue and chikungunya fever). *Br Heart J*. 1972 Aug;34(8):821-7.
- Obrosova-Serova NP, Burtseva EI, Nevskii IM, Karmanova RI, Nazarov VI, Pitkenen AA, Slepshkin AN. The protective action of arbidol during a rise in respiratory diseases in 1990. *Vopr Virusol*. 1991 Sep-Oct;36(5):380-1.
- Olaleye OD, Omilabu SA, Fagbami AH. Igbo-Ora virus (an Alphavirus isolated in Nigeria): a serological survey for haemagglutination inhibiting antibody in humans and domestic animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988;82(6):905-6.
- Omar A, Koblet H. Semliki Forest virus particles containing only the E1 envelope glycoprotein are infectious and can induce cell-cell fusion. *Virology*. 1988 Sep;166(1):17-23.
- O'Meara GF, Evans LF Jr, Gettman AD, Cuda JP. Spread of *Aedes albopictus* and decline of *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) in Florida. *J Med Entomol*. 1995 Jul;32(4):554-62.

- Ou JH, Strauss EG, Strauss JH. Comparative studies of the 3'-terminal sequences of several alpha virus RNAs. *Virology*. 1981 Mar;109(2):281-9.
- Ou JH, Rice CM, Dalgarno L, Strauss EG, Strauss JH. Sequence studies of several Alphavirus genomic RNAs in the region containing the start of the subgenomic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Sep;79(17):5235-9.
- Ou JH, Strauss EG, Strauss JH. The 5'-terminal sequences of the genomic RNAs of several Alphaviruses. *J Mol Biol*. 1983 Jul 25;168(1):1-15.
- Owen KE, Kuhn RJ. Alphavirus budding is dependent on the interaction between the nucleocapsid and hydrophobic amino acids on the cytoplasmic domain of the E2 envelope glycoprotein. *Virology*. 1997 Apr 14;230(2):187-96.
- Ozden S, Lucas-Hourani M, Ceccaldi PE, Basak A, Valentine M, Benjannet S, Hamelin J, Jacob Y, Mamchaoui K, Mouly V, Desprès P, Gessain A, Butler-Browne G, Chrétien M, Tangy F, Vidalain PO, Seidah NG. Inhibition of Chikungunya virus infection in cultured human muscle cells by furin inhibitors: impairment of the maturation of the E2 surface glycoprotein. *J Biol Chem*. 2008 Aug 8;283(32):21899-908. Epub 2008 Jun 17.
- Ozden S, Huerre M, Riviere JP, Coffey LL, Afonso PV, Mouly V, de Monredon J, Roger JC, El Amrani M, Yvin JL, Jaffar MC, Frenkiel MP, Sourisseau M, Schwartz O, Butler-Browne G, Desprès P, Gessain A, Ceccaldi PE. Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection. *PLoS One*. 2007 Jun 13;2(6):e527.
- Padbidri VS, Gnaneswar TT. Epidemiological investigations of chikungunya epidemic at Barsi, Maharashtra state, India. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*. 1979;23(4):445-51.
- Pagès F, Peyrefitte CN, Mve MT, Jarjaval F, Brisse S, Iteman I, Gravier P, Tolou H, Nkoghe D, Grandadam M. *Aedes albopictus* mosquito: the main vector of the 2007 Chikungunya outbreak in Gabon. *PLoS One*. 2009;4(3):e4691. Epub 2009 Mar 4.
- Panning M, Grywna K, van Esbroeck M, Emmerich P, Drosten C. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. *Emerg Infect Dis*. 2008 Mar;14(3):416-22.
- Panning M, Hess M, Fischer W, Grywna K, Pfeffer M, Drosten C. (a)Performance of the RealStar Chikungunya virus real-time reverse transcription-PCR kit. *J Clin Microbiol*. 2009 Sep;47(9):3014-6. Epub 2009 Jul 22.
- Panning M, Charrel RN, Donoso Mantke O, Landt O, Niedrig M, Drosten C. (b)Coordinated implementation of chikungunya virus reverse transcription-PCR. *Emerg Infect Dis*. 2009 Mar;15(3):469-71. Erratum in: *Emerg Infect Dis*. 2009 Aug;15(8):1334.
- Pardigon N, Strauss JH. Cellular proteins bind to the 3' end of Sindbis virus minus-strand RNA. *J Virol*. 1992 Feb;66(2):1007-15.
- Pardigon N, Lenches E, Strauss JH. Multiple binding sites for cellular proteins in the 3' end of Sindbis Alphavirus minus-sense RNA. *J Virol*. 1993 Aug;67(8):5003-11.

- Paredes AM, Brown DT, Rothnagel R, Chiu W, Schoepp RJ, Johnston RE, Prasad BV. Three-dimensional structure of a membrane-containing virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Oct 1;90(19):9095-9.
- Parrott MM, Sitarski SA, Arnold RJ, Picton LK, Hill RB, Mukhopadhyay S. Role of conserved cysteines in the Alphavirus E3 protein. *J Virol*. 2009 Mar;83(6):2584-91. Epub 2008 Dec 24.
- Pastorino B, Muyembe-Tamfum JJ, Bessaud M, Tock F, Tolou H, Durand JP, Peyrefitte CN. Epidemic resurgence of Chikungunya virus in democratic Republic of the Congo: identification of a new central African strain. *J Med Virol*. 2004 Oct;74(2):277-82.
- Pastorino B, Bessaud M, Grandadam M, Murri S, Tolou HJ, Peyrefitte CN. Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. *J Virol Methods*. 2005 Mar;124(1-2):65-71. Epub 2004 Dec 15.
- Pastorino B, Rolland D, Peyrefitte CN, Wurtz N, Almeras L, Bessaud M, Tolou HJ. Improvement of the purification of Saint Louis encephalitis virus NS2B-NS3 recombinant protease expressed in *Escherichia coli*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008 Jun 1;868(1-2):58-63. Epub 2008 May 1.
- Paquet C, Quatresous I, Solet JL, Sissoko D, Renault P, Pierre V, Cordel H, Lassalle C, Thiria J, Zeller H, Schuffnecker I. Chikungunya outbreak in Reunion: epidemiology and surveillance, 2005 to early January 2006. *Euro Surveill*. 2006 Feb 2;11(2):E060202.3.
- Pavlova BG, Loew-Baselli A, Fritsch S, Poellabauer EM, Vartian N, Rinke I, Ehrlich HJ. Tolerability of modified tick-borne encephalitis vaccine FSME-IMMUN "NEW" in children: results of post-marketing surveillance. *Vaccine*. 2003 Jan 30;21(7-8):742-5.
- Pehrson JR, Fuji RN. Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Res*. 1998 Jun 15;26(12):2837-42.
- Peränen J, Laakkonen P, Hyvönen M, Kääriäinen L. The Alphavirus replicase protein nsP1 is membrane-associated and has affinity to endocytic organelles. *Virology*. 1995 Apr 20;208(2):610-20.
- Peränen J, Rikonen M, Liljeström P, Kääriäinen L. Nuclear localization of Semliki Forest virus-specific nonstructural protein nsP2. *J Virol*. 1990 May;64(5):1888-96.
- Peränen J. Localization and phosphorylation of Semliki Forest virus non-structural protein nsP3 expressed in COS cells from a cloned cDNA. *J Gen Virol*. 1991 Jan;72 ( Pt 1):195-9.
- Perera R, Owen KE, Tellinghuisen TL, Gorbalenya AE, Kuhn RJ. Alphavirus nucleocapsid protein contains a putative coiled coil alpha-helix important for core assembly. *J Virol*. 2001 Jan;75(1):1-10.
- Peyrefitte CN, Rousset D, Pastorino BA, Pouillot R, Bessaud M, Tock F, Mansaray H, Merle OL, Pascual AM, Paupy C, Vessiere A, Imbert P, Tchendjou P, Durand JP, Tolou HJ,

- Grandadam M. Chikungunya virus, Cameroon, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2007 May;13(5):768-71.
- Peyrefitte CN, Bessaud M, Pastorino BA, Gravier P, Plumet S, Merle OL, Moltini I, Coppin E, Tock F, Daries W, Ollivier L, Pages F, Martin R, Boniface F, Tolou HJ, Grandadam M. Circulation of Chikungunya virus in Gabon, 2006-2007. *J Med Virol.* 2008 Mar;80(3):430-3.
- Pfeffer M, Kinney RM, Kaaden OR. The Alphavirus 3'-nontranslated region: size heterogeneity and arrangement of repeated sequence elements. *Virology.* 1998 Jan 5;240(1):100-8.
- Pfeffer M, Linszen B, Parke MD, Kinney RM. Specific detection of chikungunya virus using a RT-PCR/nested PCR combination. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2002 Feb;49(1):49-54.
- Pialoux G, Gaüzère BA, Strobel M. Chikungunya virus infection: review through an epidemic. *Med Mal Infect.* 2006 May;36(5):253-63. Epub 2006 May 24.
- Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis.* 2007 May;7(5):319-27.
- Poidinger M, Roy S, Hall RA, Turley PJ, Scherret JH, Lindsay MD, Broom AK, Mackenzie JS. Genetic stability among temporally and geographically diverse isolates of Barmah Forest virus. *Am J Trop Med Hyg.* 1997 Aug;57(2):230-4.
- Porterfield JS. Antibody-dependent enhancement of viral infectivity. *Adv Virus Res.* 1986;31:335-55. Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J Gen Virol.* 2000 Feb;81(Pt 2):471-9.
- Powers AM, Brault AC, Shirako Y, Strauss EG, Kang W, Strauss JH, Weaver SC. Evolutionary relationships and systematics of the Alphaviruses. *J Virol.* 2001 Nov;75(21):10118-31.
- Presely JF, Brown DT. The proteolytic cleavage of PE2 to envelope glycoprotein E2 is not strictly required for the maturation of Sindbis virus. *J Virol.* 1989 May;63(5):1975-80.
- Presley JF, Polo JM, Johnston RE, Brown DT. Proteolytic processing of the Sindbis virus membrane protein precursor PE2 is nonessential for growth in vertebrate cells but is required for efficient growth in invertebrate cells. *J Virol.* 1991 Apr;65(4):1905-9.
- Renaudet J, Jan C, Ridet J, Adam C, Robin Y. A serological survey of arboviruses in the human population of Senegal. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 1978 Mar-Apr;71(2):131-40.
- Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini MG, Majori GC, Cassone A; CHIKV study group. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet.* 2007 Dec 1;370(9602):1840-6.

- Rice CM, Strauss JH. Nucleotide sequence of the 26S mRNA of Sindbis virus and deduced sequence of the encoded virus structural proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Apr;78(4):2062-6.
- Rice CM, Bell JR, Hunkapiller MW, Strauss EG, Strauss JH. Isolation and characterization of the hydrophobic COOH-terminal domains of the sindbis virion glycoproteins. *J Mol Biol*. 1982 Jan 15;154(2):355-78.
- Rikkonen M, Peränen J, Kääriäinen L. ATPase and GTPase activities associated with Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *J Virol*. 1994 Sep;68(9):5804-10.
- Rinaldo CR Jr, Overall JC Jr, Glasgow LA. Viral replication and interferon production in fetal and adult ovine leukocytes and spleen cells. *Infect Immun*. 1975 Nov;12(5):1070-7.
- ROBINSON MC. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1955 Jan;49(1):28-32.
- Roche S, Robin Y. Human infections by Chikungunya virus in Rufisque (Senegal), October-November, 1966. *Bull Soc Med Afr Noire Lang Fr*. 1967;12(3):490-6.
- Romi R, Di Luca M, Majori G. Current status of *Aedes albopictus* and *Aedes atropalpus* in Italy. *J Am Mosq Control Assoc*. 1999 Sep;15(3):425-7.
- Roques, P., Joubert, C., Malleret, B., Delache, B., Brochard, P., Calvo, J., Morin, J., Mannioui, A., Martinon, F., Lebon, P., Verrier, B., Lotteau, V., de Lamballerie, X., Cherel, Y., Larcher, T., Aumont, G., Le Grand, R., 2007. Chikungunya et autres arboviroses émergentes en milieu tropical. Reunion Island  
[http://www.invs.sante.fr/agenda/colloque\\_chikungunya/](http://www.invs.sante.fr/agenda/colloque_chikungunya/).
- Rubach JK, Wasik BR, Rupp JC, Kuhn RJ, Hardy RW, Smith JL. Characterization of purified Sindbis virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase activity in vitro. *Virology*. 2009 Feb 5;384(1):201-8. Epub 2008 Nov 25.
- Rümenapf T, Strauss EG, Strauss JH. Subgenomic mRNA of Aura Alphavirus is packaged into virions. *J Virol*. 1994 Jan;68(1):56-62.
- Russell R.C. Vectors vs. humans in Australia—who is on top down under? An update on vector-borne disease and research on vectors in Australia, *J. Vector Ecol*. 23 (1998), pp. 1–46.
- Russo A.T., M.A. White and S.J. Watowich. The crystal structure of the Venezuelan equine encephalitis Alphavirus nsP2 protease. *Structure* 14 (2006), pp. 1449–1458.
- Saluzzo JF, Cornet M, Digoutte JP. Outbreak of a Chikungunya virus epidemic in western Senegal in 1982. *Dakar Med*. 1983;28(3):497-500.
- Salvan M, Mouchet J. *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* at Ile de la Réunion. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1994 Dec;74(4):323-6.
- Santagati MG, Määttä JA, Itäranta PV, Salmi AA, Hinkkanen AE. The Semliki Forest virus E2 gene as a virulence determinant. *J Gen Virol*. 1995 Jan;76 ( Pt 1):47-52.

Santhosh SR, Parida MM, Dash PK, Pateriya A, Pattnaik B, Pradhan HK, Tripathi NK, Ambuj S, Gupta N, Saxena P, Lakshmana Rao PV. Development and evaluation of SYBR Green I-based one-step real-time RT-PCR assay for detection and quantification of Chikungunya virus. *J Clin Virol*. 2007 Jul;39(3):188-93. Epub 2007 Jun 5.

Sanz MA, Rejas MT, Carrasco L. Individual expression of sindbis virus glycoproteins. E1 alone promotes cell fusion. *Virology*. 2003 Jan 20;305(2):463-72.

SARKAR JK, CHATTERJEE SN, CHAKRAVARTY SK. (b)FURTHER PROGRESS IN THE STUDY OF HAEMORRHAGIC FEVER IN CALCUTTA. *Bull Calcutta Sch Trop Med*. 1964 Jul;12:102-3.

Savage HM. Classification of mosquitoes in tribe Aedini (Diptera: Culicidae): Paraphylyphobia, and classification versus cladistic analysis. *J Med Entomol*. 2005 Nov;42(6):923-7.

Savarino A, Di Trani L, Donatelli I, Cauda R, Cassone A. New insights into the antiviral effects of chloroquine. *Lancet Infect Dis*. 2006 Feb;6(2):67-9.

Savarino A, Cauda R, Cassone A. On the use of chloroquine for chikungunya. *Lancet Infect Dis*. 2007 Oct;7(10):633.

Sawicki DL, Sawicki SG. Short-lived minus-strand polymerase for Semliki Forest virus. *J Virol*. 1980 Apr;34(1):108-18.

Sawicki SG, Sawicki DL. (a)The effect of loss of regulation of minus-strand RNA synthesis on Sindbis virus replication. *Virology*. 1986 Jun;151(2):339-49.

Sawicki SG, Sawicki DL. (b)The effect of overproduction of nonstructural proteins on Alphavirus plus-strand and minus-strand RNA synthesis. *Virology*. 1986 Jul 30;152(2):507-12.

Sawicki D, Barkhimer DB, Sawicki SG, Rice CM, Schlesinger S. Temperature sensitive shut-off of Alphavirus minus strand RNA synthesis maps to a nonstructural protein, nsP4. *Virology*. 1990 Jan;174(1):43-52.

Saxena SK, Singh M, Mishra N, Lakshmi V. Resurgence of chikungunya virus in India: an emerging threat. *Euro Surveill*. 2006 Aug 10;11(8):E060810.2.

SARKAR JK, CHATTERJEE SN, CHAKRAVARTY SK, MITRA AC. (b)BEHAVIOUR OF MICE AFTER INFECTION BY DENGUE AND CHIKUNGUNYA VIRUSES. *Bull Calcutta Sch Trop Med*. 1964 Oct;12:151-2.

Scheidel LM, Durbin RK, Stollar V. Sindbis virus mutants resistant to mycophenolic acid and ribavirin. *Virology*. 1987 May;158(1):1-7.

Scheidel L.M., R. Durbin and V. Stollar. SVLM21, a Sindbis virus mutant resistant to methionine deprivation, encodes an altered methyltransferase, *Virology* 173 (1989), pp. 408–414.

Scheidel L.M. and V. Stollar. Mutations that confer resistance to mycophenolic acid and ribavirin on Sindbis virus map to the nonstructural protein nsP1, *Virology* 181 (1991), pp. 490–499.

Schilte C, Couderc T, Chretien F, Sourisseau M, Gangneux N, Guivel-Benhassine F, Kraxner A, Tschopp J, Higgs S, Michault A, Arenzana-Seisdedos F, Colonna M, Peduto L, Schwartz O, Lecuit M, Albert ML. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. *J Exp Med*. 2010 Feb 15;207(2):429-42. Epub 2010 Feb 1

Schlegel A, Omar A, Jentsch P, Morell A, Kempf C. Semliki Forest virus envelope proteins function as proton channels. *Biosci Rep*. 1991 Oct;11(5):243-55.

Schlegel A, Schaller J, Jentsch P, Kempf C. Semliki Forest virus core protein fragmentation: its possible role in nucleocapsid disassembly. *Biosci Rep*. 1993 Dec;13(6):333-47.

Schlesinger MJ. Function of Sindbis virus 49S and 26S RNAs in in vitro protein synthesizing systems. A summary. *Med Biol*. 1975 Oct;53(5):380-2.

Schlesinger MJ, London SD, Ryan C. An in-frame insertion into the Sindbis virus 6K gene leads to defective proteolytic processing of the virus glycoproteins, a trans-dominant negative inhibition of normal virus formation, and interference in virus shut off of host-cell protein synthesis. *Virology*. 1993 Mar;193(1):424-32.

Schuffenecker I, Itean I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC, Lavenir R, Pardigon N, Reynes JM, Pettinelli F, Biscornet L, Diancourt L, Michel S, Duquerroy S, Guigon G, Frenkiel MP, Bréhin AC, Cubito N, Desprès P, Kunst F, Rey FA, Zeller H, Brisse S. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med*. 2006 Jul;3(7):e263. Epub 2006 May 23.

Scott TW, Weaver SC. Eastern equine encephalomyelitis virus: epidemiology and evolution of mosquito transmission. *Adv Virus Res*. 1989;37:277-328.

Scott TW, Hildreth SW, Beaty BJ. (a)The distribution and development of eastern equine encephalitis virus in its enzootic mosquito vector, *Culiseta melanura*. *Am J Trop Med Hyg*. 1984 Mar;33(2):300-10.

Scott TW, Burrage TG. (b)Rapid infection of salivary glands in *Culiseta melanura* with eastern equine encephalitis virus: an electron microscopic study. *Am J Trop Med Hyg*. 1984 Sep;33(5):961-4.

Scott TW, Lorenz LH. Reduction of *Culiseta melanura* fitness by eastern equine encephalomyelitis virus. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Aug;59(2):341-6.

*Arch Gesamte Virusforsch*. 1972;36(1):93-104. Shimizu Y, Yamamoto S, Homma M, Ishida N. Effect of chloroquine on the growth of animal viruses. PMID: 4335025 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Sefton BM. Immediate glycosylation of Sindbis virus membrane proteins. *Cell*. 1977 Apr;10(4):659-68.

Sergon K, Yahaya AA, Brown J, Bedja SA, Mlindasse M, Agata N, Allaranger Y, Ball MD, Powers AM, Ofula V, Onyango C, Konongoi LS, Sang R, Njenga MK, Breiman RF. Seroprevalence of Chikungunya virus infection on Grande Comore Island, union of the Comoros, 2005. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Jun;76(6):1189-93.

Severson WE, Schmaljohn CS, Javadian A, Jonsson CB. Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication. *J Virol.* 2003 Jan;77(1):481-8.

Seyler T, Rizzo C, Finarelli AC, Po C, Alessio P, Sambri V, Ciofi Degli Atti ML, Salmaso S. Autochthonous chikungunya virus transmission may have occurred in Bologna, Italy, during the summer 2007 outbreak. *Euro Surveill.* 2008 Jan 17;13(3). pii: 8015.

Shirako Y, Strauss JH. Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *J Virol.* 1994 Mar;68(3):1874-85.

Shirako Y, Strauss JH. Cleavage between nsP1 and nsP2 initiates the processing pathway of Sindbis virus nonstructural polyprotein P123. *Virology.* 1990 Jul;177(1):54-64.

Sidenko VP, Jarotskaja NE. Current problems of the epidemiology and prophylaxis in mosquito-induced haemorrhagic fevers in sea transport. *Bull Inst Marit Trop Med Gdynia.* 1982;33(1-2):61-9.

Simizu B, Yamamoto K, Hashimoto K, Ogata T. Structural proteins of Chikungunya virus. *J Virol.* 1984 Jul;51(1):254-8. Simmons DT, Strauss JH.

Replication of Sindbis virus. I. Relative size and genetic content of 26 s and 49 s RNA. *J Mol Biol.* 1972 Nov 28;71(3):599-613.

Singh I, Helenius A. Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. *J Virol.* 1992 Dec;66(12):7049-58.

Sissoko D, Malvy D, Giry C, Delmas G, Paquet C, Gabrie P, Pettinelli F, Sanquer MA, Pierre V. (a)Outbreak of Chikungunya fever in Mayotte, Comoros archipelago, 2005-2006. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008 Aug;102(8):780-6. Epub 2008 Apr 8.

Sissoko D, Moendandze A, Malvy D, Giry C, Ezzedine K, Solet JL, Pierre V. (b)Seroprevalence and risk factors of chikungunya virus infection in Mayotte, Indian Ocean, 2005-2006: a population-based survey. *PLoS One.* 2008 Aug 26;3(8):e3066.

Sissoko D, Ezzedine K, Moendandzé A, Giry C, Renault P, Malvy D. Field evaluation of clinical features during chikungunya outbreak in Mayotte, 2005-2006. *Trop Med Int Health.* 2010 May;15(5):600-7. Epub 2010 Mar 1.

Sixl W, Stünzner D, Withalm H. Serological examinations for antibodies against West Nile virus, Semliki virus and chikungunyavirus in laboratory mice, parasitized by nidicole fauna from swallow's nests. *Geogr Med Suppl.* 1988;1:51-5.

Skoging U, Vihinen M, Nilsson L, Liljeström P. Aromatic interactions define the binding of the Alphavirus spike to its nucleocapsid. *Structure*. 1996 May 15;4(5):519-29.

Skoging-Nyberg U, Liljeström P. M-X-I motif of semliki forest virus capsid protein affects nucleocapsid assembly. *J Virol*. 2001 May;75(10):4625-32.

Stiasny K, Koessl C, Heinz FX Involvement of lipids in different steps of the flavivirus fusion mechanism. *J Virol*. 2003 Jul;77(14):7856-62.

Strauss EG, Rice CM, Strauss JH. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of Sindbis virus. *Virology*. 1984 Feb;133(1):92-110.

Strauss J.H. and Strauss E.G, *The Alphaviruses: gene expression, replication, and evolution*, Microbiol. Rev. 58 (1994), pp. 491–562. Genetically-engineered microorganisms: I. Identification, classification, and strain history.

Strauss H, Hattis D, Page G, Harrison K, Vogel S, Caldart C. Genetically-engineered microorganisms: I. Identification, classification, and strain history. *Recomb DNA Tech Bull*. 1986 Mar;9(1):1-15.

Strauss E.G., R.J. deGroot, R. Levinson and J.H. Strauss, Identification of the active site residues in the nsP2 proteinase of Sindbis virus, *Virology* 191 (1992), pp. 932–940.

Shirako Y, Strauss JH. Cleavage between nsP1 and nsP2 initiates the processing pathway of Sindbis virus nonstructural polyprotein P123. *Virology*. 1990 Jul;177(1):54-64.

Shirako Y, Strauss JH. Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *J Virol*. 1994 Mar;68(3):1874-85.

Sourisseau M, Schilte C, Casartelli N, Trouillet C, Guivel-Benhassine F, Rudnicka D, Sol-Foulon N, Le Roux K, Prevost MC, Fsihi H, Frenkiel MP, Blanchet F, Afonso PV, Ceccaldi PE, Ozden S, Gessain A, Schuffenecker I, Verhasselt B, Zamborlini A, Saïb A, Rey FA, Arenzana-Seisdedos F, Desprès P, Michault A, Albert ML, Schwartz O. Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog*. 2007 Jun;3(6):e89.

Spuul P, Salonen A, Merits A, Jokitalo E, Kääriäinen L, Ahola T. Role of the amphipathic peptide of Semliki forest virus replicase protein nsP1 in membrane association and virus replication. *J Virol*. 2007 Jan;81(2):872-83. Epub 2006 Nov 8.

Suomalainen M, Liljeström P, Garoff H. Spike protein-nucleocapsid interactions drive the budding of Alphaviruses. *J Virol*. 1992 Aug;66(8):4737-47

TAYLOR RM, HURLBUT HS, WORK TH, KINGSTON JR, FROTHINGHAM TE. Sindbis virus: a newly recognized arthropodtransmitted virus. *Am J Trop Med Hyg*. 1955 Sep;4(5):844-62.

- Telles JN, Le Roux K, Grivard P, Vernet G, Michault A. Evaluation of real-time nucleic acid sequence-based amplification for detection of Chikungunya virus in clinical samples. *J Med Microbiol*. 2009 Sep;58(Pt 9):1168-72. Epub 2009 Jun 15.
- Tesh RB, Gubler DJ, Rosen L. Variation among geographic strains of *Aedes albopictus* in susceptibility to infection with chikungunya virus. *Am J Trop Med Hyg*. 1976 Mar;25(2):326-35.
- Tesh RB. Arthritides caused by mosquito-borne viruses. *Annu Rev Med*. 1982;33:31-40.
- Thein S, La Linn M, Aaskov J, Aung MM, Aye M, Zaw A, Myint A. Development of a simple indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of immunoglobulin M antibody in serum from patients following an outbreak of chikungunya virus infection in Yangon, Myanmar. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992 Jul-Aug;86(4):438-42.
- Thiruvengadam KV, Kalyanasundaram V, Rajgopal J. Clinical and pathological studies on chikungunya fever in Madras city. *Indian J Med Res*. 1965 Aug;53(8):729-44.
- Thonnon J, Spiegel A, Diallo M, Diallo A, Fontenille D. Chikungunya virus outbreak in Senegal in 1996 and 1997. *Bull Soc Pathol Exot*. 1999 May;92(2):79-82.
- Tiwari M, Parida M, Santhosh SR, Khan M, Dash PK, Rao PV. Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of Chikungunya virus. *Vaccine*. 2009 Apr 21;27(18):2513-22. Epub 2009 Feb 27.
- Trgovcich J, Aronson JF, Eldridge JC, Johnston RE. TNFalpha, interferon, and stress response induction as a function of age-related susceptibility to fatal Sindbis virus infection of mice. *Virology*. 1999 Oct 25;263(2):339-48.
- Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog*. 2007 Dec;3(12):e201.
- Tsetsarkin K, Higgs S, McGee CE, De Lamballerie X, Charrel RN, Vanlandingham DL. Infectious clones of Chikungunya virus (La Réunion isolate) for vector competence studies. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2006 Winter; 6(4):325-37
- Tucker PC, Lee SH, Bui N, Martinie D, Griffin DE. Amino acid changes in the Sindbis virus E2 glycoprotein that increase neurovirulence improve entry into neuroblastoma cells. *J Virol*. 1997 Aug;71(8):6106-12.
- Turell MJ, Beaman JR. Experimental transmission of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by a strain of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from New Orleans, Louisiana. *J Med Entomol*. 1992 Sep;29(5):802-5.
- Turell MJ. Effect of environmental temperature on the vector competence of *Aedes taeniorhynchus* for Rift Valley fever and Venezuelan equine encephalitis viruses. *Am J Trop Med Hyg*. 1993 Dec;49(6):672-6.

- Tuittila M, Hinkkanen AE. Amino acid mutations in the replicase protein nsP3 of Semliki Forest virus cumulatively affect neurovirulence. *J Gen Virol*. 2003 Jun;84(Pt 6):1525-33.
- Tzou P, De Gregorio E, Lemaitre B. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2002 Feb;5(1):102-10. Review.
- Ubol S, Griffin DE. Identification of a putative Alphavirus receptor on mouse neural cells. *J Virol*. 1991 Dec;65(12):6913-21.
- Ulmanen I, Söderlund H, Kääriäinen L. Semliki Forest virus capsid protein associates with the 60S ribosomal subunit in infected cells. *J Virol*. 1976 Oct;20(1):203-10.
- Ulmanen I, Söderlund H, Kääriäinen L. Role of protein synthesis in the assembly of Semliki forest virus nucleocapsid. *Virology*. 1979 Dec;99(2):265-76.
- Vanlandingham DL, Tsetsarkin K, Hong C, Klingler K, McElroy KL, Lehane MJ, Higgs S. Development and characterization of a double subgenomic chikungunya virus infectious clone to express heterologous genes in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*. 2005 Oct;35(10):1162-70.
- Vashishtha M, Phalen T, Marquardt MT, Ryu JS, Ng AC, Kielian M. A single point mutation controls the cholesterol dependence of Semliki Forest virus entry and exit. *J Cell Biol*. 1998 Jan 12;140(1):91-9.
- Vasiljeva L, Merits A, Auvinen P, Kääriäinen L. Identification of a novel function of the Alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2. *J Biol Chem*. 2000 Jun 9;275(23):17281-7.
- Vasiljeva L, Valmu L, Kääriäinen L, Merits A. Site-specific protease activity of the carboxyl-terminal domain of Semliki Forest virus replicase protein nsP2. *J Biol Chem*. 2001 Aug 17;276(33):30786-93. Epub 2001 Jun 15.
- Vazeille M, Jeannin C, Martin E, Schaffner F, Failloux AB. Chikungunya: a risk for Mediterranean countries? *Acta Trop*. 2008 Feb;105(2):200-2. Epub 2007 Oct 12.
- Vihinen H, Saarinen J. Phosphorylation site analysis of Semliki forest virus nonstructural protein 3. *J Biol Chem*. 2000 Sep 8;275(36):27775-83.
- Vihinen H, Ahola T, Tuittila M, Merits A, Kääriäinen L. Elimination of phosphorylation sites of Semliki Forest virus replicase protein nsP3. *J Biol Chem*. 2001 Feb 23;276(8):5745-52. Epub 2000 Dec 4.
- voir <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00391313>
- von Bonsdorff CH, Harrison SC. Sindbis virus glycoproteins form a regular icosahedral surface lattice. *J Virol*. 1975 Jul;16(1):141-5.

- von Bonsdorff CH, Harrison SC. Hexagonal glycoprotein arrays from Sindbis virus membranes. *J Virol.* 1978 Nov;28(2):578-83.
- Waarts BL, Bittman R, Wilschut J. Sphingolipid and cholesterol dependence of Alphavirus membrane fusion. Lack of correlation with lipid raft formation in target liposomes. *J Biol Chem.* 2002 Oct 11;277(41):38141-7. Epub 2002 Jul 23
- WAGNER RR. Inhibition of intrferon biosynthesis by actinomycin d. *Nature.* 1964 Oct 3;204:49-51.
- Wahlberg JM, Bron R, Wilschut J, Garoff H. (a)Membrane fusion of Semliki Forest virus involves homotrimers of the fusion protein. *J Virol.* 1992 Dec;66(12):7309-18.
- Wahlberg JM, Garoff H. (b)Membrane fusion process of Semliki Forest virus. I: Low pH-induced rearrangement in spike protein quaternary structure precedes virus penetration into cells. *J Cell Biol.* 1992 Jan;116(2):339-48.
- Waite MR, Pfefferkorn ER. (a)Inhibition of Sindbis virus production by media of low ionic strength: intracellular events and requirements for reversal. *J Virol.* 1970 Jan;5(1):60-71.
- Waite MR, Pfefferkorn ER. (b)Phospholipid synthesis in Sindbis virus-infected cells. *J Virol.* 1970 Nov;6(5):637-43.
- Wang KS, Strauss JH. Use of a lambda gt11 expression library to localize a neutralizing antibody-binding site in glycoprotein E2 of Sindbis virus. *J Virol.* 1991 Dec;65(12):7037-40
- Wang KS, Kuhn RJ, Strauss EG, Ou S, Strauss JH. High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. *J Virol.* 1992 Aug;66(8):4992-5001.
- Wang YF, Sawicki SG, Sawicki DL. Alphavirus nsP3 functions to form replication complexes transcribing negative-strand RNA. *J Virol.* 1994 Oct;68(10):6466-75.
- Wang E, Volkova E, Adams AP, Forrester N, Xiao SY, Frolov I, Weaver SC. Chimeric Alphavirus vaccine candidates for chikungunya. *Vaccine.* 2008 Sep 15;26(39):5030-9. Epub 2008 Aug 8.
- Weaver SC, Fashing NJ. Dispersal behavior and vector potential of *Aedes cantator* (Diptera: Culicidae) in southern Maryland. *J Med Entomol.* 1981 Jul;18(4):317-23.
- Weaver SC, Scott TW, Lorenz LH, Lerdthusnee K, Romoser WS. Togavirus-associated pathologic changes in the midgut of a natural mosquito vector. *J Virol.* 1988 Jun;62(6):2083-90.
- Weaver SC, Scott TW. Ultrastructural changes in the abdominal midgut of the mosquito, *Culiseta melanura*, during the gonotrophic cycle. *Tissue Cell.* 1990;22(6):895-909.
- Weaver SC, Hagenbaugh A, Bellew LA, Netesov SV, Volchkov VE, Chang GJ, Clarke DK, Gousset L, Scott TW, Trent DW, et al. A comparison of the nucleotide sequences of eastern and western equine encephalomyelitis viruses with those of other Alphaviruses and related

RNA viruses. *Virology*. 1993 Nov;197(1):375-90. Erratum in: *Virology*. 1994 Aug 1;202(2):1083.

Weaver SC, Kang W, Shirako Y, Rumenapf T, Strauss EG, Strauss JH. Recombinational history and molecular evolution of western equine encephalomyelitis complex Alphaviruses. *J Virol*. 1997 Jan;71(1):613-23.

Weaver SC. Host range, amplification and arboviral disease emergence. *Arch Virol Suppl*. 2005;(19):33-44.

Weiss B, Nitschko H, Ghattas I, Wright R, Schlesinger S. Evidence for specificity in the encapsidation of Sindbis virus RNAs. *J Virol*. 1989 Dec;63(12):5310-8.

Weiss B, Geigenmüller-Gnirke U, Schlesinger S. Interactions between Sindbis virus RNAs and a 68 amino acid derivative of the viral capsid protein further defines the capsid binding site. *Nucleic Acids Res*. 1994 Mar 11;22(5):780-6.

Wengler G, Würkner D, Wengler G. Identification of a sequence element in the Alphavirus core protein which mediates interaction of cores with ribosomes and the disassembly of cores. *Virology*. 1992 Dec;191(2):880-8.

Wengler G, Wengler G, Nowak T, Wahn K. Analysis of the influence of proteolytic cleavage on the structural organization of the surface of the West Nile flavivirus leads to the isolation of a protease-resistant E protein oligomer from the viral surface. *Virology*. 1987 Sep;160(1):210-9.

Wengler G, Wengler G, Boege U, Wahn K. Establishment and analysis of a system which allows assembly and disassembly of Alphavirus core-like particles under physiological conditions in vitro. *Virology*. 1984 Jan 30;132(2):401-12.

Wengler G, Wengler G. In vitro analysis of factors involved in the disassembly of Sindbis virus cores by 60S ribosomal subunits identifies a possible role of low pH. *J Gen Virol*. 2002 Oct;83(Pt 10):2417-26.

Wengler G, Koschinski A, Wengler G, Dreyer F. Entry of Alphaviruses at the plasma membrane converts the viral surface proteins into an ion-permeable pore that can be detected by electrophysiological analyses of whole-cell membrane currents. *J Gen Virol*. 2003 Jan;84(Pt 1):173-81

Wengler G, Koschinski A, Wengler G, Repp H. During entry of Alphaviruses, the E1 glycoprotein molecules probably form two separate populations that generate either a fusion pore or ion-permeable pores. *J Gen Virol*. 2004 Jun;85(Pt 6):1695-701.

Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SYa, Horzinek MC, Igarashi A, Kääriäinen L, Lvov DK, Porterfield JS, Russell PK, Trent DW. *Togaviridae*. *Intervirology*. 1985;24(3):125-39.

West J, Brown DT. Role of a conserved tripeptide in the endodomain of Sindbis virus glycoprotein E2 in virus assembly and function. *J Gen Virol*. 2006 Mar;87(Pt 3):657-64.

White J, Kartenbeck J, Helenius A. Fusion of Semliki forest virus with the plasma membrane can be induced by low pH. *J Cell Biol.* 1980 Oct;87(1):264-72.

Wielgosz MM, Raju R, Huang HV. Sequence requirements for Sindbis virus subgenomic mRNA promoter function in cultured cells. *J Virol.* 2001 Apr;75(8):3509-19.

Wolfe ND, Kilbourn AM, Karesh WB, Rahman HA, Bosi EJ, Cropp BC, Andau M, Spielman A, Gubler DJ. Sylvatic transmission of arboviruses among Bornean orangutans. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 May-Jun;64(5-6):310-6.

Zeller HG. Dengue, arbovirus and migrations in the Indian Ocean. *Bull Soc Pathol Exot.* 1998;91(1):56-60.

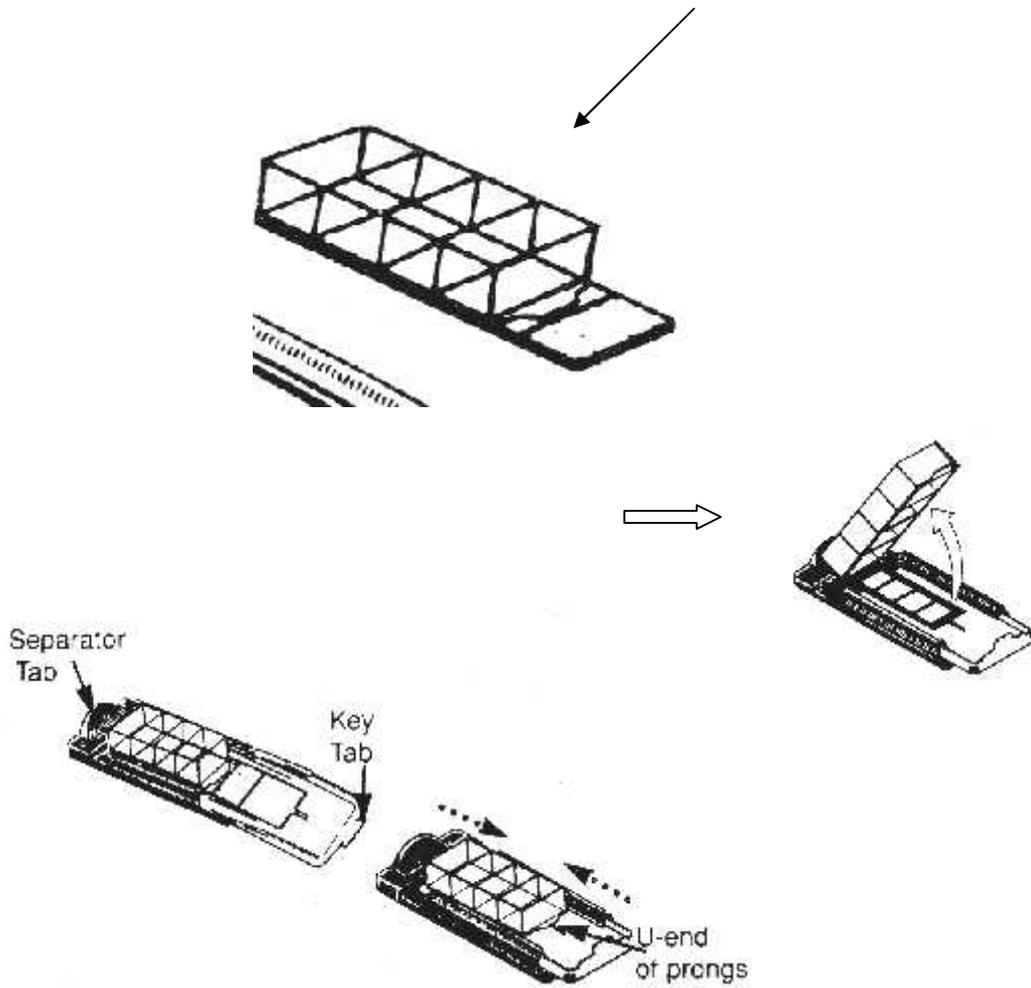
Zhao H, Lindqvist B, Garoff H, von Bonsdorff CH, Liljeström P. A tyrosine-based motif in the cytoplasmic domain of the Alphavirus envelope protein is essential for budding. *EMBO J.* 1994 Sep 15;13(18):4204-11.

Ziemiacki A, Garoff H. Subunit composition of the membrane glycoprotein complex of Semliki Forest virus. *J Mol Biol.* 1978 Jul 5;122(3):259-69.

Ziegler SA, Lu L, da Rosa AP, Xiao SY, Tesh RB. An animal model for studying the pathogenesis of chikungunya virus infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Jul;79(1):133-9.

## Annexe 1

Chambres d'incubation étanches amovibles permettant la culture cellulaire, recouvertes par un couvercle lors de l'incubation.



### **Le système LabTek II Chamber Slide System 8 Wells (Nalge Nunc international).**

Les cellules sont cultivées dans les chambres d'incubation, puis incubées en présence de virus et enfin avec différentes dilutions de CHIK-OPY1. Puis grâce au système décrit ci-dessus, la chambre d'incubation est retirée puis après fixation, les lames révélées par immunofluorescence.

## Annexe 2 Liste amorces utilisé pour séquencé le génome complet du CHIKV

Liste amorces F pour CHIKV		Liste primers R pour CHIKV	
ID-swahili01-F	TGGCTGCGTGAGACACAC	01-R	CAGYACCTGCTCATCNGCCCA
ID-swahili02-F	CCGTTTCATGTAYAATGCnATG	02-R	GCCCA nAGrCArCAGCA
ID-swahili03-F	AAAGGARtGCCGGAAAGAnATG	03-R	CCCTTCATATGCCAAyTCrTGNTA
ID-swahili04-F	CAYGAGTACGTCTAYGAYGTnGA	04-R	GTTGACyTTCATyTGCATCAT
ID-swahili05-F	GTmGACGARgCkTTTGnGTG	05-R	GCCCArCAiACrTTGGCTTT rTtyTGrAA
ID-swahili06-F	CAGAACCCnCCGAAAGGAAyTtyAA nGCA	06-R	GCTiGTGACrCAiGGNGGTTT
ID-swahili07-F	ATymGnGCATAYGgnTACGCAGA 07-R	AGTiACyTCCTTiGCCACTTC	
ID-swahili08-F	ATGTGCGGTACnTAYCCnGT	08-R	AGCrTCCAGGTCTGACGGNNCGGG
ID-swahili09-F	CCnCTCCAAAGTAYAAA	09-R	GTCiGAiGAGAATATrTA
ID-swahili10-F	GTnACnTGyGACGAGAGAGAA	10-R	GGGiGCrTGGTArGmGTGyTGTTTNGG
ID-swahili11-F	TACCAAATnACCGAYGAGTA	11-R	TCiCCGAAiGCAGCCTCTAT
ID-swahili12-F	ATGwsnGCCGAGGAyTtyGA	12-R	TCTTCTrTcITCrTCTTGTTc
ID-swahili13-F	AAAGCCCCnTACTTyTYGyGG	13-R	GTGACiATGTCTTT rTTCCA
ID-swahili14-F	GGTGcNggCAArCCnGGnGAC	14-R	CGGGACCAGAGGGGAGTT rTAYTGCCA
ID-swahili15-F	AAGTgyAAyTGCGGTGGC	15-R	GCTCATiACGGCTAAAAA
ID-swahili16-F	TGGyTnCArGCnCTTAT	16-R	AAiGGiGGGTAGTCCATrTT
ID-swahili17-F	GCnAACGGyGACCAyGCCGT	17-R	TCCCGT dATCTTCTGCACCCA
ID-swahili18-F	TGCCACCCnCCnAAGGACCA	18-R	TAACATCTCCTACGTCCCTG

## Annexe 3 Liste amorces utilisé pour construire IC Tonile-ARB

FAgeI5685	AGGTGGGTATATATTCTCGTCGGACACCGGTCCAGGTcATTtACAACAGAAGTC
RXhol9518	CGGCTCGTTGTTGCCCCACGTGACCTCGAGCCCTTCAGTCGGCACGTTAGCACG
FMut8785	GACGCAGAGAGGGCGAGGCTATTTGTAAGAACATCAG
RMut8785	GTTCTTACAAATAGCCTCGCCCTCTGCGTCTGCTGGCATG

## RESUME

Les Alphavirus ces virus sont des arbovirus, c'est-à dire des virus transmis par des arthropodes hématophages. Dans le cas des Alphavirus, la vectorisation est faite par des moustiques appartenant à plusieurs espèces.

A ce jour, 29 espèces d'Alphavirus ont été identifiés, dont au moins 6 sont pathogènes pour l'Homme. Chez l'Homme, certains Alphavirus sont responsables d'encéphalites, d'arthrites, de fièvres, d'éruptions cutanées et peuvent être fatals (Thiruvengadam et al. 1965; Pialoux et al. 2006).

La mise en évidence de l'existence du CHIKV se fera 1952 en Tanzanie (Robinson 1955) (Lumsden 1955). Ce travail se compose de deux parties : 1 partie sur l'étude phylogénétique du CHIKV et 1 partie sur l'étude des molécules antivirales.

L'étude épidémiologique des épidémies récentes virus Chikungunya, étude de 140 souches, 6 souches ont été isolés par notre unité de recherche :

Les souches : Gabon GABOPY1 2007, Madagascar MADOPY1 2006 , Mayotte OPY4 2006 et deux souches italiennes StVE et StBI 2007. L'analyses phylogénétique as également identifié de nouveaux événements de convergence évolutive qui confirment la capacité de le group ECSA2 virus appartenant à la sous-clade d'acquérir une seule souche (GABOPY1 2007) avec la mutation adaptative A226V offre un avantage sélectif pour la transmission par *Aedes albopictus*. La deuxième partie traite nous avons étudié de possibles molécules antivirales sur le CHIKV.

La deuxième partie traite nous avons étudié de possibles molécules antivirales sur le CHIKV.

L'objectif de cette étude était de caractériser l'efficacité de l'Arbidol (HZ2), sur la réplication virale du CHIKV et de préciser le mécanisme d'action. Nous avons sélectionné un mutant du CHIKV résistant à l'Arbidol avec une mutation en position G407R (substitution d'un acide aminé localisé dans la protéine d'enveloppe virale E2). L'hypothèse de ce mécanisme présomptif est soutenue par le fait que l'Arbidol inhibe l'hémagglutination par CHIKV, de manière dose dépendante.

En conclusion, l'Arbidol (HZ2) s'est avéré être un puissant inhibiteur contre l'infection in vitro CHIKV. En plus de l'élucidation de son mode d'action cellulaire, cette drogue doit encore être évaluée pour la prévention de l'infection à CHIKV et de la gestion des cas plus graves.