



HAL
open science

Mise en place d'un système cellulaire non infectieux pour l'étude de la réplication du virus chikungunya

Alice Blosse

► **To cite this version:**

Alice Blosse. Mise en place d'un système cellulaire non infectieux pour l'étude de la réplication du virus chikungunya. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01528785

HAL Id: dumas-01528785

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01528785>

Submitted on 29 May 2017

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

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

UNIVERSITE DE BORDEAUX
U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2017

N° 20

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement à Bordeaux le Mercredi 1^{er} février 2017 par

Alice BLOSSE
Née le 30 mars 1988 à Cognac (16)

Tient lieu de
MEMOIRE de DIPLOME d'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE

**Mise en place d'un système cellulaire non infectieux pour
l'étude de la réplication du virus chikungunya**

Directeur de thèse

M. VENTURA Michel, Directeur de recherche

Jury

Président : Mme DUBOIS Véronique, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Membres : Mme VILAIN-PARCE Alice, Assistante Hospitalo-Universitaire
M. MALVY Denis, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
M. VENTURA Michel, Directeur de recherche

Université de Bordeaux
U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2017

N° 20

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement à Bordeaux le Mercredi 1^{er} février 2017 par

Alice BLOSSE
Née le 30 mars 1988 à Cognac (16)

Tient lieu de
MEMOIRE de DIPLOME d'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE

**Mise en place d'un système cellulaire non infectieux pour
l'étude de la réplication du virus chikungunya**

Directeur de thèse

M. VENTURA Michel, Directeur de recherche

Jury

Président : Mme DUBOIS Véronique, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Membres : Mme VILAIN-PARCE Alice, Assistante Hospitalo-Universitaire
M. MALVY Denis, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
M. VENTURA Michel, Directeur de recherche

Remerciements

Je tiens à remercier **Madame le Professeur Véronique Dubois** de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse et pour son aide ainsi que ses conseils aussi bien dans certaines étapes de ce travail que dans mon internat de biologie médicale. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

Je remercie chaleureusement **Monsieur Michel Ventura** d'avoir accepté de diriger ma thèse d'exercice et pour son encadrement rigoureux tout au long de ce travail. Merci également pour sa disponibilité et ses multiples conseils. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi et je te souhaite une bonne continuation dans ta très proche « cessation d'activité ».

Je remercie également **Monsieur le Professeur Denis Malvy** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, pour le temps que vous aurez accordé à la lecture critique de ce travail ainsi que pour l'apport de vos riches connaissances dans le domaine des maladies infectieuses tropicales dont fait partie le chikungunya. Merci pour votre présence.

Je remercie **Madame Alice Vilain-Parcé** d'avoir accepté de juger ce travail. Je garde un excellent souvenir de mon passage au laboratoire de virologie où tu as grandement participé à ma formation. Merci pour ton professionnalisme et ta bonne humeur.

Ainsi je tiens à remercier Monsieur le Professeur Hervé Fleury et Madame le Professeur Marie-Edith Lafon pour le rôle majeur qu'ils ont joué dans le bon déroulement de mon parcours recherche. Je vous exprime ma gratitude pour avoir mis à disposition les moyens nécessaires du laboratoire m'ayant permis de mener à bien mon master recherche. Je vous remercie également pour les conseils précieux que vous m'avez donnés et qui m'ont guidés dans cette étape de mon internat.

Je remercie l'équipe « Variabilité, réplication et mobilité des génomes viraux et bactériens » du laboratoire MFP pour leur accueil chaleureux et leur aide dans ce travail et notamment Chloé pour son aide dans la réalisation de mes premières manip.

Je remercie les biologistes du CH de Marmande où je passe actuellement un excellent semestre. J'apprends énormément à vos côtés. Un grand merci pour votre disponibilité, sympathie et professionnalisme. Merci beaucoup à Marie, ma petite maman de la biologie

médicale, tu as joué un grand rôle dans ma formation, en tant qu'interne dans un premier temps puis maintenant en tant que biologiste titulaire au CH de Marmande.

Un grand merci à tous les biologistes qui m'ont transmis leur savoir durant mon internat et permis je l'espère d'exercer ma profession dans les règles de l'art. Je vous adresse à tous mes remerciements les plus sincères.

A mes parents, je ne saurai jamais assez vous remercier pour le soutien indéfectible que vous avez montré à mon égard tout au long de mon cursus et de ma vie. Sans vous je n'en serais bien évidemment pas là. Vous êtes formidables, merci pour tout. Une pensée bien évidemment à mes frangins, Baptiste et Nathan, sans qui je ne serais pas tout à fait la même personne. Merci d'être là.

Ugo... impossible de transcrire tout ce que tu m'as apporté dans cette ultime étape ainsi qu'au cours de mes longues années d'étude. Sans toi je me serais sûrement un peu oubliée dans tout cela. Tout simplement merci de faire partie de ma vie.

A ma choupie pour son amitié à toutes épreuves, pour tes encouragements dans les moments de doutes, de difficultés. Nos petits moments ensemble m'ont beaucoup ressourcé. A mes chiassounettes : les blondes et la brune ! Merci pour ces belles années de fac et pour tous les moments passés et futurs partagés ensemble. Si les distances qui nous séparent sont parfois grandes, je sais que nous restons et resterons proches au fond de nos cœurs.

A mes co-internes devenus maintenant des amis, ils se reconnaîtront. A Julie pour nos séances footing, boxe, natation, badminton et peut être bientôt tennis... A Marine pour ton inconditionnel optimisme. Merci pour votre soutien, votre présence et les moments partagés.

A Manu pour sa re lecture et ses conseils avisés. A Dorine et Gui pour nos « longues » soirées sources d'inspiration et de distraction intellectuelles !

A tous les autres amis, relations et collègues que je ne mentionne pas et qui ont croisés mon chemin et chacun à leur manière contribués à mon épanouissement socioprofessionnel.

Sincèrement Merci à tous !

Table des matières

| | |
|--|----|
| Abréviations | 6 |
| Contexte | 8 |
| Synthèse bibliographique..... | 10 |
| I. Le chikungunya : un problème actuel de santé publique | 10 |
| 1. Distributions spatiales et temporelles du virus chikungunya | 10 |
| 2. Apparition de nouveaux foyers vectoriels..... | 15 |
| 3. Impacts sur la santé humaine et formes cliniques émergentes | 21 |
| II. Le virus chikungunya | 25 |
| 1. Classification | 25 |
| 2. Structure et Organisation génomique..... | 26 |
| 3. Cycle viral | 33 |
| 4. Modèles d'étude de la réplication disponibles | 36 |
| Matériel et Méthodes | 38 |
| I. Matériel | 38 |
| 1. Plasmides utilisés..... | 38 |
| 2. Cellules..... | 40 |
| II. Méthodes..... | 40 |
| 1. Restriction enzymatique..... | 40 |
| 2. Ligation | 40 |
| 3. Transformation bactérienne par choc thermique | 41 |
| 4. Extraction d'ADN plasmidique | 41 |
| 5. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) | 42 |
| 6. Mutagénèse dirigée | 43 |
| 7. Séquençage nucléotidique | 44 |
| 8. Préparation des ARN | 45 |
| 9. Transfection d'ARN..... | 46 |

| | | |
|------|---|----|
| 10. | Dosage de la Gaussia Luciférase | 47 |
| 11. | Cytométrie en flux | 48 |
| 12. | Clonage cellulaire | 48 |
| 13. | Extraction des acides nucléiques cellulaires | 49 |
| | Résultats..... | 50 |
| I. | Stratégie..... | 50 |
| 1. | La production du complexe de réplication..... | 50 |
| 2. | Les minigénomes | 51 |
| II. | Etude de l'activité réplivative après intégration génomique des gènes codant les protéines NS | 52 |
| 1. | Production des ARN minigénomes..... | 52 |
| 2. | Etude de l'activité réplivative par les minigénomes | 53 |
| 3. | Analyse de l'expression des protéines NS | 54 |
| III. | Expression cellulaire des protéines NS par un ARN codant nsP1 à nsP4..... | 57 |
| 1. | Production des ARN codant les protéines NS | 57 |
| 2. | Etude de l'activité réplivative par les minigénomes | 58 |
| IV. | Expression cellulaire des protéines NS par un réplicon du CHIKV | 60 |
| 1. | Construction des réplicons du CHIKV | 60 |
| 2. | Production des ARN réplicons | 68 |
| 3. | Expression des réplicons dans différents types cellulaires | 69 |
| 4. | Sélection d'une lignée cellulaire Bhk-21 exprimant un réplicon du CHIKV | 73 |
| 5. | Isolement de clones cellulaires exprimant un réplicon du CHIKV | 77 |
| | Discussion et Perspectives | 78 |
| | Bibliographie..... | 83 |

ABREVIATIONS

% : pourcentage

2A : autoprotéase du FMDV

A : adénine

Ae. : *Aedes sp*

aa : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

Ala : alanine

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARN(+) : ARN de polarité positive

ARN(-) : ARN de polarité négative

BET: bromure d'éthidium

BFV: virus Barmah Forest

Bhk-21: baby hamster kidney cell

°C: degré Celsius

(C) : protéine de capsid

C: cytosine

Cap: coiffe 7-méthylguanosine

CDC: centers for disease control

cm : centimètre

CMV Pr : promoteur du CytomégaloVirus

CR : complexe de réplication

CSE : conserved sequence element

C-ter : carboxy-terminal

CHIK : chikungunya (maladie)

CHIKV : virus chikungunya

ChikRép : réplicon du CHIKV

ChikRép+ : expression du ChikRép

DEPC: diéthyl pyrocarbonate

DMEM: dulbecco's modified eagle medium

DMRIE-C: 1,2-dimyristyloxy-propyl-3-diméthyl-hydroxy éthyl ammonium bromide

E. coli: *Escherichia coli*

ECP : effet cytopathogène

ECSA : Est/Centre/Sud Afrique

EDTA : éthylène diamine tétracétique

EEEV : virus de l'encéphalite équine de l'Est

EEOV : virus de l'encéphalite équine de l'Ouest

EGFP: enhanced green fluorescent protein

FMDV: foot and mouth disease virus

FU: unité arbitraire de fluorescence

G: guanine

G418: généticine

GLuc: Gaussia Luciférase

Gly: glycine

GTase : guanyltransférase

h : heure

HCl : acide chlorhydrique

Huh7: human hepatocarcinoma cell line

HygroR: hygromycine phosphotransférase

IOL : lignée de l'Océan Indien

(J) : région jonction

J: jour

kb: kilobase

LB: lysogeny broth

m/v : rapport masse/volume

MAYV : virus Mayaro

mg, µg, ng : milligramme, microgramme, nanogramme

min : minute

miniG(+) : minigénome polarité positive

miniG(-) : minigénome polarité négative

ml, µl : millilitre, microlitre

M, mM, µM : molaire, milli molaire, micro molaire

MTase : méthyltransferase

NCT : non cytotoxique

NeoR : aminoglycoside 3'phosphotransférase

NS : non structurale

nsP : protéine non structurale ou gène codant une protéine non structurale

nt : nucléotides
N-ter: amino-terminal
NTPase: nucléoside triphosphatase
ONNV: virus O'Nyong Nyong
Opti-MEM: milieu essential minimum
ORF: open reading frames
pb: paire de bases
PBS: phosphate buffered saline
PCR: réaction de polymérisation en chaine
pH : potentiel hydrogène
poly(A): polyadénylée
Pro: proline
RdRp: ARN polymérase ARN dépendante
RLU: unité arbitraire d'intensité lumineuse
RNase: ribonucléase
RRV : virus Ross River
RT-PCR: PCR réverse transcriptase
s : seconde
S: svedberg
Sg Pr : sous génomique promoteur
SFV : Semliki Forest virus
SINV : Sindbis virus
SVF : sérum de veau fœtal
T : temps ou base azotée thymine
TAE : Tris-HCl acide acétique EDTA
TE : Tris-HCl EDTA
U : base azotée uracile
UTR : région non traduite
Val : valine
VEEV : virus de l'encéphalique équine du Vénézuéla
Vero : lignée de cellules de rein de singe vert
VHC : virus de l'hépatite C
WT : sauvage

CONTEXTE

Depuis ces dernières décennies, les maladies infectieuses émergentes ou ré-émergentes, en particulier celles ayant une étiologie virale, voient leur intérêt augmenter dans le domaine de la santé publique. Les arboviroses, maladies infectieuses résultant de la transmission d'un arbovirus (acronyme de l'anglais « *arthropod-borne virus* ») par un vecteur arthropode hématophage, en sont des exemples flagrants (Devaux 2012). En effet, ces arboviroses, différentes quant à leur symptomatologie et à leur épidémiologie, sont responsables de pathologies parfois sévères chez l'homme et les animaux et peuvent avoir des conséquences sanitaires et économiques importantes faisant des arbovirus un réel problème de santé publique. Parmi les 535 espèces d'arbovirus identifiées, près d'une centaine sont connues comme pathogènes pour l'homme et à l'origine d'épidémies humaines (Gubler 2002; Liang, Gao, et Gould 2015). Ces épidémies ont principalement été causées par des virus supposés être sous contrôle tels que les virus de la dengue, de l'encéphalite japonaise, de la fièvre jaune, ou bien par des virus ayant été introduits dans de nouvelles zones géographiques ou ayant élargi leur répartition territoriale initiale comme en témoigne la nouvelle vague épidémique due au virus zika (LimaCamara 2016). Un des exemples illustrant également ce phénomène est la rapide extension géographique, assez récente, du virus chikungunya (CHIKV) à des pays jusque-là indemnes, témoignant de sa capacité d'implantation et de dissémination et causant des épidémies d'une ampleur sans précédent dont notamment l'épidémie de l'île de La Réunion des années 2005-2006 ou encore l'épidémie sévissant depuis 2013-2014 dans les Caraïbes et les Amériques. C'est d'ailleurs à la suite de la vague épidémique de 2005-2006 que le terme « Chikungunya », utilisé pour désigner à la fois le virus et la maladie, a fait son apparition dans les dictionnaires de la langue française (éditions 2007 du Petit Larousse et du Petit Robert). Ainsi, les récentes épidémies du 21^{ème} siècle ont révélé que, contrairement aux idées antérieures qui en faisaient une maladie infectieuse essentiellement bénigne, le chikungunya (CHIK) est en réalité capable d'entraîner une morbidité sévère, voire une mortalité, ainsi qu'une tendance à la chronicité des symptômes qui prolonge dans le temps son impact sur les populations atteintes (Morrison 2014). Ces données nouvelles ont attiré l'attention des pouvoirs publics et du monde médical, d'une part, sur la capacité du CHIKV à émerger dans de nouveaux territoires et, d'autre part, sur la sévérité de cette arbovirose lors de son émergence au sein de populations non immunes. Le

CHIK est ainsi considéré comme un problème majeur de santé publique aussi bien dans les régions tropicales que dans les régions tempérées, où l'implantation des moustiques vecteurs est en pleine expansion (Rougeron et al. 2015).

Le CHIKV constitue donc un nouveau paradigme de la menace que représentent les arboviroses. En complément des mesures de surveillance entomologique, épidémiologique et de lutte anti-vectorielle, il paraît donc nécessaire de mettre en place des programmes de recherche pour mieux appréhender la physiopathologie de la maladie, pour étudier les étapes du cycle viral et ainsi développer des stratégies antivirales et/ou vaccinales. A ce jour, peu de modèles cellulaires d'étude de la réplication virale du CHIKV sont disponibles, d'où le récent intérêt de l'équipe de recherche « Variabilité, réplication et mobilité des génomes viraux et bactériens » du laboratoire MFP (Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité) pour cette thématique.

Ainsi, cette thèse centrée sur le développement d'un outil d'exploration de la réplication virale du CHIKV, est constituée de deux parties : une synthèse bibliographique et un mémoire expérimental. Dans une première partie, le CHIKV et le contexte général actuel de la maladie du même nom sont exposés dans un résumé bibliographique. Puis dans une seconde partie, les travaux de recherche réalisés visant à mettre en place un modèle cellulaire non infectieux pour l'étude de la réplication du CHIKV sont présentés. L'ensemble des résultats obtenus lors de cette thèse est ensuite discuté dans le contexte des connaissances actuelles disponibles dans la littérature scientifique. Enfin, plusieurs perspectives de suite de ces travaux sont proposées.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE CHIKUNGUNYA : UN PROBLEME ACTUEL DE SANTE PUBLIQUE

1. Distributions spatiales et temporelles du virus chikungunya

Le CHIKV a été décrit par Robinson et isolé par Ross à partir de sérum de patients fébriles, pour la première fois en 1952, à l'occasion d'une épidémie rurale extensive qui sévissait sur le plateau Makondé dans la province de Newala au sud du Tanganyika (actuelle Tanzanie) (Robinson 1955; Lumsden 1955; Ross 1956). Néanmoins, des épidémies antérieures à 1952 peuvent être imputées rétrospectivement au CHIKV aux vues des descriptions cliniques retrouvées dans la littérature décrivant notamment d'importantes douleurs articulaires (Halstead 2015). En particulier, certaines épidémies anciennes de fièvres, tels que les foyers américains des années 1827-1828, erronément étiquetées comme « dengue » sont compatibles avec le CHIK (Carey 1971; Nkoghe et al. 2012; Kuno 2015).

Depuis sa découverte, des cas sporadiques et des épidémies ont été rapportés dans différents pays d'Afrique subsaharienne, dans le sous-continent Indien et en Asie du Sud-Est (Giovanni Rezza 2014). En effet, entre 1960 et le début des années 2000, le virus a émergé ou ré-émergé dans différents pays d'Afrique tropicale : Afrique de l'Est (Tanzanie, Kenya, Ouganda, Burundi et Soudan), Afrique Australe (Zimbabwe, Afrique du Sud et Malawi), Afrique de l'Ouest (Sénégal, Guinée, Côte d'Ivoire, Bénin, Nigéria) et en Afrique Centrale (République Centrafricaine, Gabon et République Démocratique du Congo) (Moore et al. 1974; Pastorino et al. 2004; Powers et Logue 2007). En Asie, le virus a été isolé pour la première fois à Bangkok en Thaïlande en 1958 (Hammon, Rudnick, et Sather 1960) et a sévi par la suite en Asie du Sud-Est (Vietnam, Cambodge, Laos, Birmanie, Malaisie, Indonésie, et Philippines), ainsi que dans le sous-continent Indien (Inde, Bangladesh et Pakistan) (Powers et Logue 2007).

Les épidémies sont, en Asie comme en Afrique, limitées et n'ont jamais atteint l'ampleur de l'épidémie qui s'est déclarée au Kenya en 2004 et qui s'est traduite par une extension du virus en cause aux îles de l'Océan Indien.

Les analyses des séquences partielles du gène E1, codant une glycoprotéine d'enveloppe (Powers et al. 2000; Schuffenecker et al. 2006), ainsi que le séquençage de souches de CHIKV (Volk et al. 2010) ont permis l'identification de deux lignées distinctes de CHIKV au plan génotypique ; une regroupant tous les isolats d'Afrique de l'Ouest d'une part, et la seconde regroupant toutes les souches d'Afrique de l'Est / Centre / Sud (ECSA) ainsi que les souches d'Asie d'autre part. Au sein de cette seconde lignée, les souches asiatiques forment un génotype distinct de celui des souches ECSA (Figure 1) (Tsetsarkin, Chen, et Weaver 2016). Ces analyses phylogénétiques corroborent l'hypothèse que le CHIKV est probablement originaire d'Afrique tropicale et a ensuite été importé en Asie du Sud. Ainsi, trois principaux groupes génétiques ou génotypes du CHIKV existent : (i) le groupe Ouest africain ; (ii) le groupe ECSA ; et (iii) le groupe asiatique. Jusqu'aux récentes épidémies de 2005 et 2013, ces clusters étaient corrélés avec la répartition géographique des souches virales (Figure 1 et 2) (Weaver et Lecuit 2015).

Les années 2005-2007 ont été marquées par une circulation très intense du CHIKV dans la zone de l'Océan Indien et dans le sous-continent Indien (Figure 2) (Powers 2011). L'épidémie a débuté sur la côte Est de l'Afrique, dans les zones côtières du Kenya (Lamu), dès juillet 2004 (Sergon et al. 2008), puis a diffusé aux Comores en janvier 2005 (Sergon et al. 2007) avant de s'étendre vers La Réunion ainsi que vers d'autres îles de l'Océan Indien (Île Maurice, Mayotte, Madagascar et Seychelles) (Philippe Renault et al. 2007; Sissoko et al. 2008; Schuffenecker et al. 2006; Ratsitorahina et al. 2008; P. Renault et al. 2012). L'île de La Réunion a été sévèrement touchée avec près de 270 000 cas soit 1/3 de la population totale de l'île (taux d'attaque de 38%) et 258 décès (P. Renault et al. 2012; Jossieran et al. 2006; Paganin et al. 2006). Les souches isolées lors des épidémies de CHIKV dans les îles de l'Océan Indien, désignées par le terme IOL (lignée de l'Océan Indien), forment un sous-groupe au sein du génotype ECSA (Figure 1). Au cours de l'épidémie de La Réunion, le virus a rapidement subi une mutation : E1 Ala226→Val (Schuffenecker et al. 2006). Elle correspond à une substitution d'un acide aminé Alanine par une Valine en position 226 de la glycoprotéine d'enveloppe E1. Cette microévolution génomique a été responsable de l'adaptation de la souche virale épidémique au principal vecteur local compétent de l'île, *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*), précédemment identifié comme vecteur mineur du CHIKV en raison de sa compétence vectorielle moindre (Tsetsarkin et al. 2007). En effet, il a été montré expérimentalement par différentes études que cette mutation s'accompagne d'une augmentation de l'efficacité de transmission du CHIKV par *Ae. albopictus* (Vazeille et al.

2007; Tsetsarkin et Weaver 2011; Tsetsarkin, Chen, Leal, et al. 2011; Arias-Goeta et al. 2013).

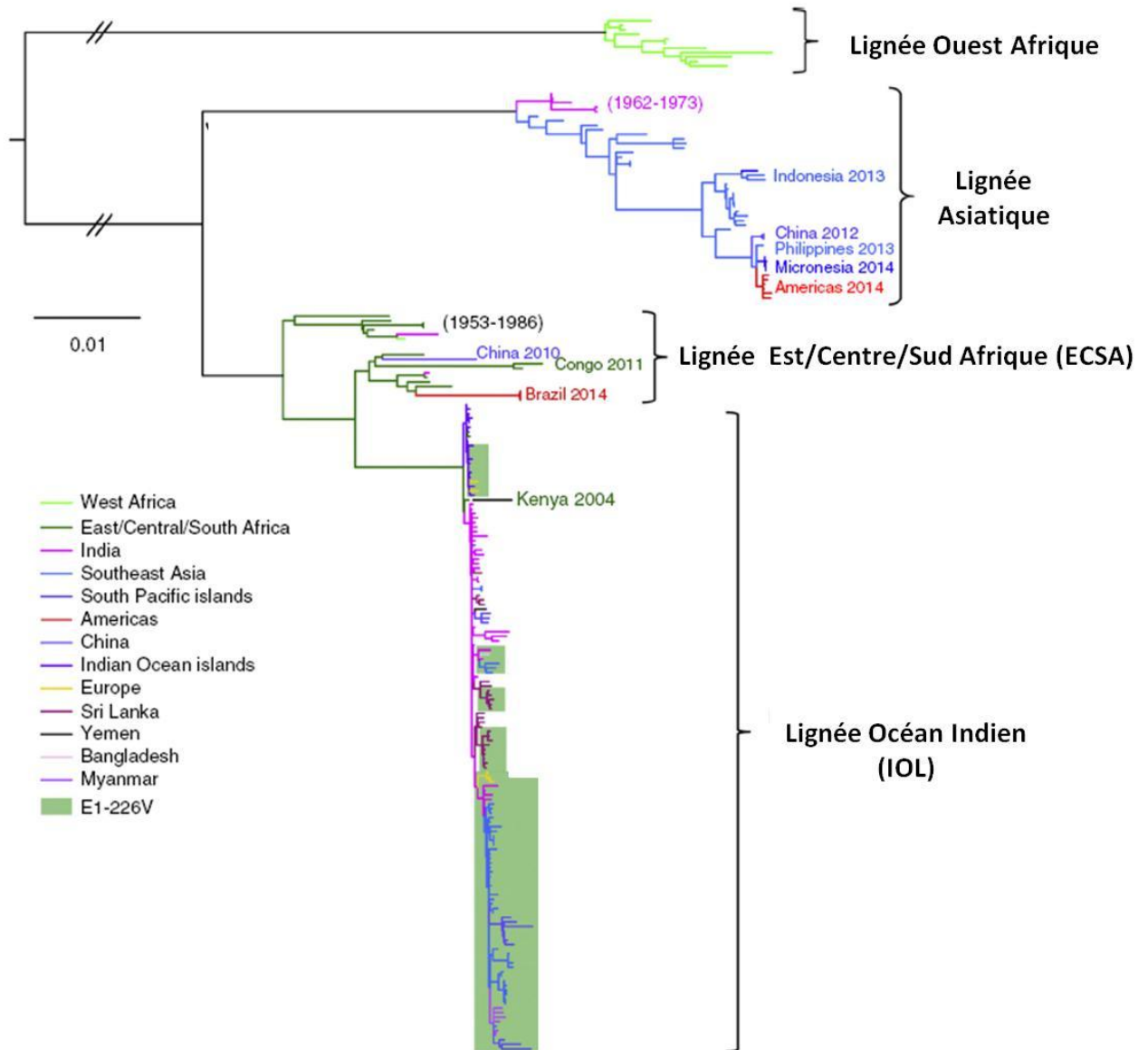


FIGURE 1 : Relations phylogénétiques entre différentes souches du virus chikungunya. Adapté de Tsetsarkin et al (2016).

Les couleurs des branches donnent une indication sur les pays ou régions d'origine des souches du virus chikungunya (CHIKV). L'échelle indique la divergence nucléotidique des séquences analysées. Les souches portant la mutation E1-Ala226→Val sont repérées par une surbrillance verte.

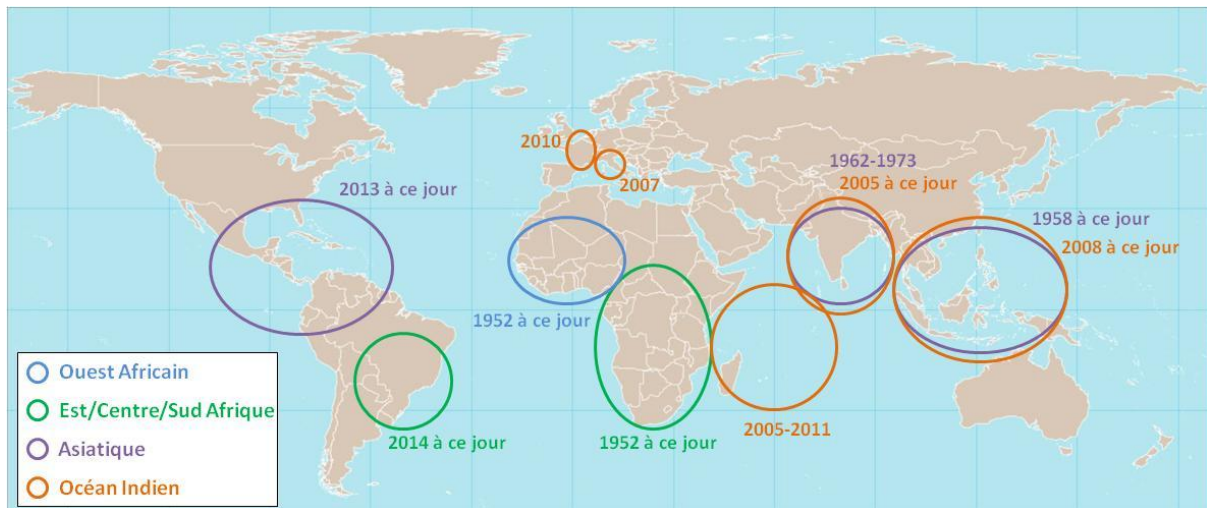


FIGURE 2 : Origine, propagation et distribution actuelle du virus chikungunya dans le monde.
Adapté de *Weaver et Lecuit* (2015).

La carte montre l'origine africaine des souches du virus chikungunya (CHIKV) et les modèles d'émergence et de propagation de la lignée asiatique et de la lignée de l'Océan Indien (appartenant au génotype Est/Centre/Sud Afrique (ECSA)) au cours des vagues épidémiques successives depuis les années 1950.

L'extension rapide de l'aire de répartition de ces souches originaires d'Afrique, baptisées IOL, a ainsi atteint le sous-continent Indien (Inde, Pakistan, Sri Lanka, Birmanie) et l'Asie du Sud-Est (Malaisie, Singapour, Thaïlande, Indonésie, Cambodge) où elles ont été responsables de plusieurs épidémies explosives faisant près de 1,5 million de cas dans le sous-continent Indien (Saxena et al. 2006; Weaver et Forrester 2015; Mavalankar, Shastri, et Raman 2007; Lanciotti et Lambert 2016; Gilles Pialoux et al. 2007). Il semblerait que ces souches de CHIKV ECSA portant la substitution E1-Ala226→Val remplacent progressivement le génotype asiatique dans les régions épidémiques d'Asie (Tsetsarkin, Chen, Sherman, et al. 2011). Quant au génotype asiatique, la circulation récente des souches est plutôt sporadique en Asie, étant responsable des épidémies notamment en Malaisie en 2006, en Nouvelle Calédonie en 2011, en Chine en 2012 et aux Philippines en 2013 (AbuBakar et al. 2007; Dupont-Rouzeyrol et al. 2012; Kawashima et al. 2014).

Enfin, ces vagues épidémiques des années 2005-2007 n'ont pas épargné le continent africain puisqu'une épidémie a sévi au Cameroun (2006) et au Gabon (2007) (Peyrefitte et al. 2007; Leroy et al. 2009). Des analyses phylogénétiques ont montré que les souches de CHIKV issues de ces deux épidémies proviennent de la lignée centrafricaine et sont donc distinctes des isolats des îles de l'Océan Indien. Néanmoins, contrairement aux souches originaires d'Afrique centrale, les souches isolées au Cameroun et au Gabon possèdent la mutation E1-Ala226→Val. Cela implique une mutation adaptative indépendante en réponse à une exigence

similaire de transmission par *Ae. albopictus* (de Lamballerie et al. 2008). Ce phénomène de convergence évolutive illustre l'adaptation rapide du CHIKV à un nouvel environnement écologique afin de perpétuer son cycle évolutif.

De manière concomitante, ces foyers épidémiques de CHIK ont conduit à l'importation du virus en Europe notamment en Belgique, en Italie et en France (Bottieau et al. 2009; Fusco et al. 2006; Receveur et al. 2010; Powers 2011). Ainsi en 2007, un voyageur infecté provenant du Kerala en Inde a été à l'origine de la première épidémie de CHIK en Europe (217 cas confirmés) qui a touché la province de Ravenne en Italie (Seyler et al. 2008; G. Rezza et al. 2007). Cet épisode a mis en évidence le risque de transmission locale du virus, à partir de voyageurs infectés de retour de zones épidémiques, dans de nombreux pays du monde où des vecteurs potentiels du CHIKV sont présents, et ceci même dans des régions tempérées (Sambri et al. 2008; Vega-Rúa et al. 2015).

C'est ainsi que fin 2013 le CHIKV s'est implanté sur le territoire américain jusque-là indemne de circulation locale de ce virus (Figure 2) (Tsetsarkin, Chen, Sherman, et al. 2011; Weaver et Forrester 2015). Depuis le premier cas autochtone de CHIK détecté en novembre 2013 sur l'île de Saint-Martin des Antilles françaises, le CHIKV s'est propagé dans 45 pays ou territoires des Caraïbes et du continent américain (Amérique du Sud, Amérique Centrale, Etats-Unis) (Leparc-Goffart et al. 2014). Fin août 2015, 1.7 million de cas étaient identifiés et 270 décès constatés (<http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>) (Petersen et Powers 2016).

Curieusement, le CHIKV qui circule dans la majorité de la région des Amériques appartient au génotype asiatique (Figure 1) et non pas au génotype qui sévissait dans l'Océan Indien à partir de 2005, suggérant ainsi une importation du virus depuis l'Asie (Leparc-Goffart et al. 2014; Lanciotti et Lambert 2016). Néanmoins, certaines épidémies de CHIK en Amérique du Sud, comme au Brésil, mettent en jeu une souche de CHIKV appartenant au génotype ECSA (Figures 1 et 2) et non pas au génotype asiatique circulant majoritairement sur le continent américain (Teixeira et al. 2015; Nunes et al. 2015).

A ce jour, le CHIKV circule donc en Afrique subsaharienne et en Asie du Sud-Est depuis sa découverte. Il est ensuite apparu dans l'Océan Indien en 2005, puis s'est étendu aux Amériques à la fin 2013 et à l'Océanie en 2014 (Papouasie-Nouvelle-Guinée, Iles Samoa, Iles Cook, Iles Marshall, Polynésie française, Kiribati, ...) (Figure 3) (Aubry et al. 2015; Richard, Paoaafaite, et Cao-Lormeau 2016).

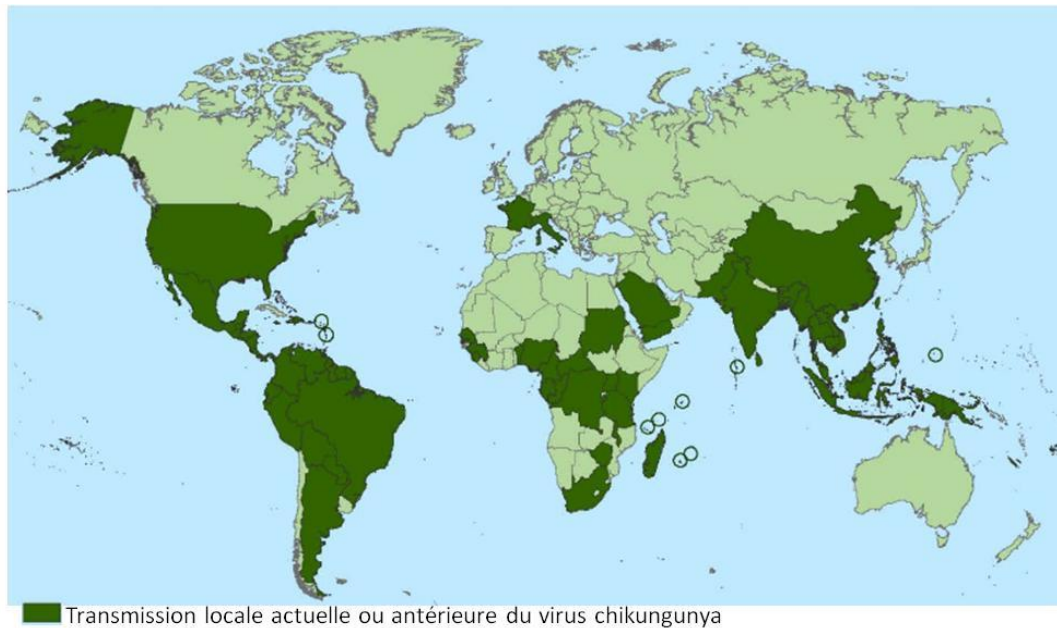


FIGURE 3 : Circulation du virus chikungunya dans le monde, bilan avril 2016.
D'après <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/>

Pays et territoires où des cas de chikungunya (CHIK) ont été rapportés (depuis le 22 avril 2016). Cette représentation ne comprend pas les pays ou territoires où seuls des cas importés ont été documentés.

La circulation récente du CHIKV en Amérique menace également les régions d'Europe où des moustiques vecteurs du CHIKV sont implantés. En effet, le nombre de cas de CHIK importés des Amériques vers l'Europe a augmenté de manière significative et notamment, en France métropolitaine. Le risque pour la France est particulièrement élevé en raison des nombreux échanges avec ses territoires d'Outre Mer, comme en témoignent les 443 cas importés de CHIK recensés en 2014 (contre 2 cas importés recensés en 2013 sur la même période) (<http://www.invs.sante.fr>) (Paty et al. 2014). Le risque d'établissement d'un cycle de transmission autochtone en France métropolitaine comme dans d'autres régions tempérées d'Europe est bel et bien réel, d'autant que des cas récents de transmission locale ont déjà été observés (Dogan, Bunes, et Skarphéðinsson 2013).

2. Apparition de nouveaux foyers vectoriels

Les arbovirus sont, comme leur nom l'indique, des virus transmis d'hôte en hôte par l'intermédiaire d'un vecteur arthropode hématophage. Dans le cas du CHIKV, les vecteurs arthropodes sont majoritairement des moustiques du genre *Aedes* (Thiberville et al. 2013; Lo Presti et al. 2014).

Le CHIKV est endémique dans les régions tropicales et subtropicales d’Afrique et d’Asie du Sud-Est. En Afrique et d’après des études plus récentes en Asie, le virus se maintient principalement au sein d’un cycle selvatique enzootique où il est transmis notamment aux primates non-humains, considérés comme les principaux hôtes réservoir, par des moustiques sylvicoles zoo anthropophiles dont *Ae. furcifer-taylori*, *Ae. luteocephalus* et *Ae. africanus* (Wolfe et al. 2001; Apandi et al. 2009; Inoue et al. 2003; Diallo et al. 1999; Jupp et McIntosh 1990). Cette circulation virale conduit occasionnellement à des infections humaines ainsi qu’à de petites épidémies en zones rurales (Tsetsarkin, Chen, Sherman, et al. 2011). Les migrations humaines sont sûrement à l’origine de l’introduction urbaine du CHIKV où les moustiques anthropophiles, *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*, permettent l’établissement d’un cycle de transmission où l’homme est le principal hôte amplificateur (Figure 4) (Tsetsarkin, Chen, Sherman, et al. 2011; Thiboutot et al. 2010; Madariaga, Ticona, et Resurrecion 2016). Ces vecteurs épidémiques, adaptés aux zones urbaines péri domestiques et piquant préférentiellement les hommes, jouent donc un rôle majeur dans les vagues d’épidémies urbaines sévissant dans diverses régions du monde.

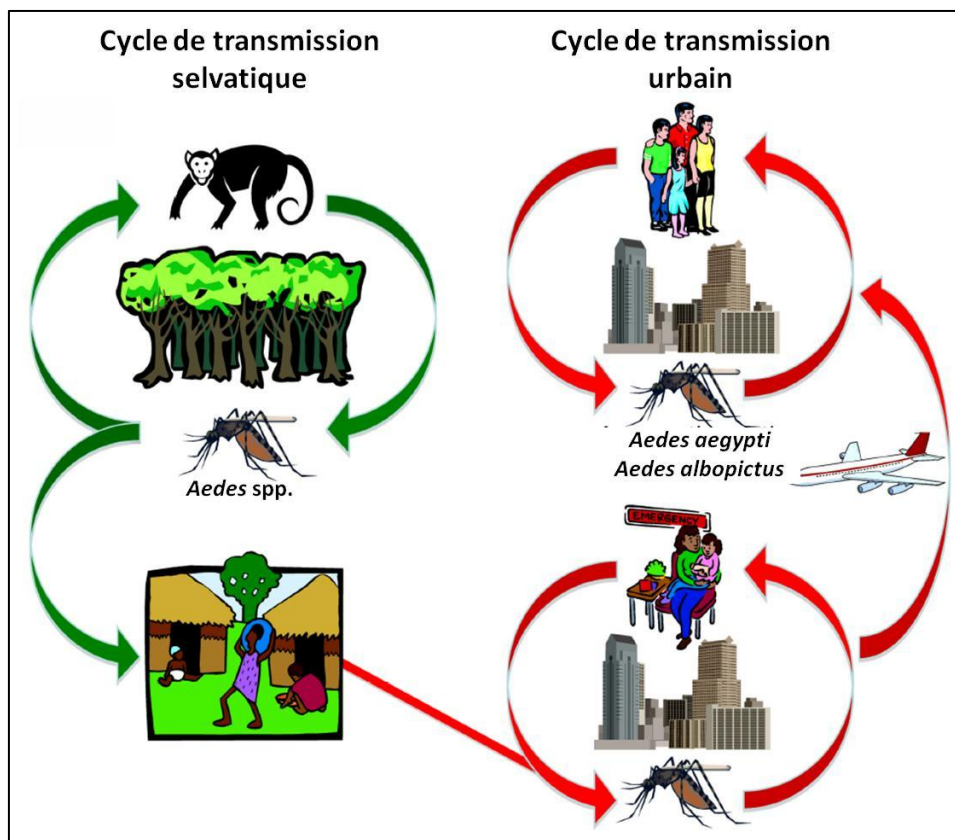


FIGURE 4 : Cycles de transmission du virus chikungunya. Adapté de Tsetsarkin et al (2011).

Représentation schématique du cycle enzootique et du cycle épidémique/endémique de transmission du virus chikungunya (CHIKV).

➤ *Aedes aegypti*

Ae. aegypti est originaire d'Afrique (Powers et Logue 2007). En Afrique, deux formes différenciées par des critères morphologiques et éco-éthologiques y sont présentes : (i) *Ae. aegypti formosus*, forme ancestrale sombre de préférences trophiques diverses (hommes et animaux), vit aussi bien en milieu forestier qu'urbain, les larves se développant dans des gîtes naturels et artificiels ; (ii) *Ae. aegypti aegypti*, forme plus claire dite domestique et strictement anthropophile, vit en milieu urbain, les larves se développant dans des gîtes larvaires artificiels (Christophe Paupy et al. 2010; Coffey, Failloux, et Weaver 2014).

Le début de migration de cette espèce n'est pas connu. Il a été suggéré qu'en migrant du Centre vers les régions du Nord de l'Afrique, la forme *Ae. aegypti formosus* aurait évolué au contact de l'homme et aurait donné *Ae. aegypti aegypti* (Failloux et al. 2002). Du 15^{ème} au 19^{ème} siècle, la traite des esclaves et les échanges maritimes auraient permis à *Ae. aegypti aegypti* d'envahir les Amériques, l'ensemble du bassin méditerranéen, l'Est et l'Ouest de l'Afrique (Tabachnick 1991; Lounibos 2002). Cependant, il aurait disparu du bassin méditerranéen à cause de l'épandage d'un insecticide, le dichloro-diphényl-trichloroéthane (DTT) lors de la lutte contre le paludisme pendant les années 1950-1960 (Gubler 1998). Au cours du 20^{ème} siècle, *Ae. aegypti* a été introduit en Asie depuis les Amériques (Tabachnick 1991; Brown et al. 2014). Le transport humain et de matériel pendant la deuxième guerre mondiale a également contribué à l'expansion de ce vecteur, notamment dans les îles de l'Océan Pacifique (Gubler 1998). Aujourd'hui, *Ae. aegypti* est largement répandu dans le monde mais essentiellement présent dans les régions tropicales et subtropicales africaines, américaines, asiatiques et en Océanie (Figure 5) (Bracco et al. 2007; M. U. G. Kraemer et al. 2015; M. U. Kraemer et al. 2016).



FIGURE 5 : Distribution actuelle du moustique *Aedes aegypti* dans le monde.
D'après Kraemer et al (2015).

➤ *Aedes albopictus*

Ae. albopictus ou « moustique tigre » est originaire d'Asie où il a été décrit pour la première fois à Calcutta en Inde (Chan, Chan, et Ho 1971). Ce moustique a été longtemps négligé en tant que vecteur du CHIKV. Jusqu'aux années 2005-2006, *Ae. aegypti* était considéré comme le vecteur principal du CHIKV compte tenu de sa meilleure adaptabilité à l'environnement domestique en milieu urbain et de son caractère strictement anthropophile (Lambrechts, Scott, et Gubler 2010). Cependant, depuis l'épidémie de CHIKV qui a sévi dans l'Océan Indien, le moustique tigre, a été identifié comme un vecteur majeur du CHIKV dans de nombreuses épidémies sévissant dans des régions où ce dernier est effectivement présent notamment dans des régions tempérées où *Ae. aegypti* n'est à ce jour pas implanté (Gratz 2004; Schuffenecker et al. 2006; Enserink 2006; G. Rezza et al. 2007; Grandadam et al. 2011; Giovanni Rezza 2014). C'est notamment *Ae. albopictus* qui a été responsable de l'épidémie italienne en 2007 et des cas autochtones survenus dans le Sud de la France (Lo Presti et al. 2016). La compétence vectorielle accrue d'*Ae. albopictus* vis-à-vis des souches ECSA du CHIKV ayant acquis la mutation E1 Ala226→Val étant la cause principale de ce changement de statut du vecteur (Schuffenecker et al. 2006; Vazeille et al. 2007; Tsetsarkin et al. 2007).

La répartition de cette espèce se limitait encore au début du 20^{ème} siècle au sous-continent indien, à l'Asie et aux îles de l'Océan Indien (Gratz 2004). Au cours de ces trois dernières décennies, il s'est implanté sur les cinq continents aussi bien dans des zones tropicales que dans des zones tempérées contribuant à augmenter son importance vectorielle et son impact en santé humaine (Figure 6) (C. Paupy et al. 2009; Medlock et al. 2012; Bonizzoni et al. 2013; Waldock et al. 2013). Cette extension mondiale rapide et massive a été favorisée par les activités humaines en particulier les transports transcontinentaux comme l'illustre bien le commerce intercontinental des pneus qui a été notamment responsable de l'introduction d'*Ae. albopictus* aux Etats-Unis en 1985 (Reiter et Sprenger 1987; Lounibos 2002).

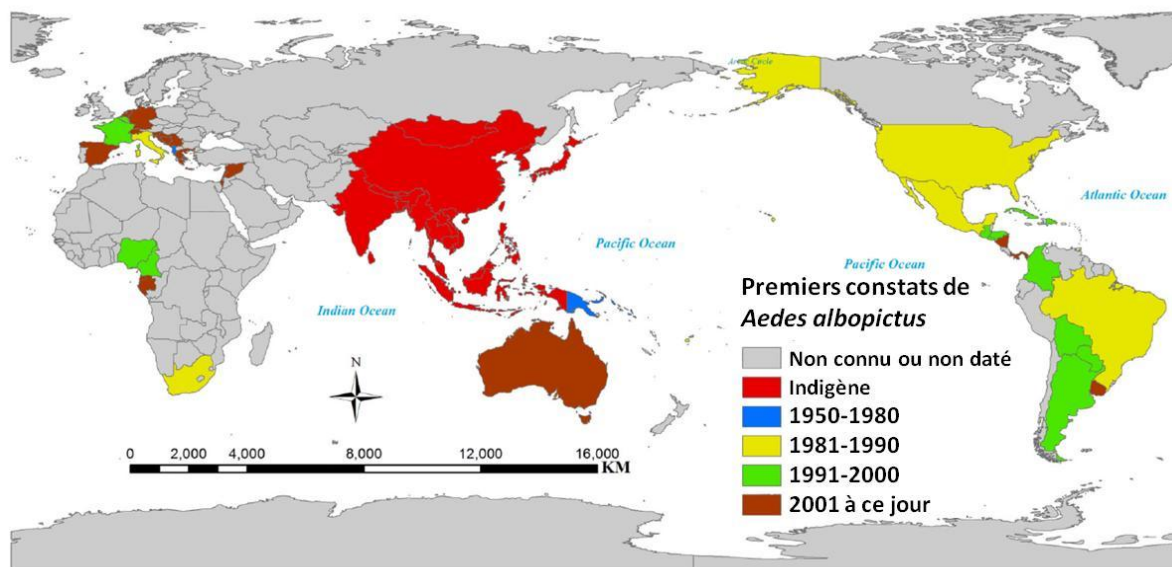


FIGURE 6 : Propagation récente et distribution actuelle du moustique *Aedes albopictus* dans le monde. D'après *Bonizzoni et al* (2014)

Carte indiquant les premiers enregistrements (importations interceptées, captures locales et populations endémiques documentées) d'*Ae. albopictus* par pays. A Madagascar, La Réunion et à Hawaii, *Ae. albopictus* a été introduit au cours des 18^{ème} -19^{ème} siècles ou au début du 20^{ème} siècle.

Ae. albopictus peut coloniser aussi bien des gîtes naturels que des gîtes artificiels (C. Paupy et al. 2009). La diversité de ces habitats larvaires permet d'expliquer l'abondance de cette espèce aussi bien dans les zones rurales que périurbaines. Ce moustique présente également des préférences trophiques diverses, piquant aussi bien l'homme que les animaux avec tout de même, si il a le choix, une préférence pour l'homme (Delatte et al. 2009). L'espèce peut donc établir le lien entre le cycle selvatique et le cycle urbain du CHIKV. Le danger d'établissement d'un cycle forestier existe notamment en Amérique en raison de la forte abondance d'animaux sauvages pouvant jouer le rôle de réservoir viral comme cela est le cas pour la fièvre jaune et la dengue (Coffey, Failloux, et Weaver 2014; Weaver 2014).

Des études ont mis en évidence, au sein de l'espèce « *albopictus* », l'existence d'une forme tropicale et d'une forme tempérée (Hawley et al. 1987). En effet, à la différence d'*Ae. aegypti*, certaines populations d'*Ae. albopictus* sont capables de s'adapter aux températures froides allant jusqu'à -5°C, ses œufs pouvant alors entrer en diapause et ainsi passer la saison hivernale dans cet état de dormance pour ensuite éclore aux premières pluies du printemps (Simon et al. 2007; Manimunda et al. 2010; Thiberville et al. 2013; Shiferaw et al. 2015; Couderc et Lecuit 2015). *Ae. albopictus* peut ainsi coloniser des zones tempérées inaccessibles à *Ae. aegypti*.

La grande plasticité écologique de cette espèce lui confère son caractère invasif aussi bien en régions tropicales qu'en régions tempérées. *Ae. albopictus* a été détecté pour la première fois en Afrique (Nigéria) en 1991 (Savage et al. 1992), en Amérique en 1985 (Reiter et Sprenger 1987), en Océanie en 1990 (Kay et al. 1990) et en Europe (Albanie) en 1979 (Adhami et Reiter 1998). Bien que l'espèce ait été identifiée pour la première fois en France en Normandie en 1999 (Schaffner et Karch 2000), ce n'est que depuis 2004 que le moustique tigre est implanté durablement en France métropolitaine et a commencé une colonisation progressive du pays jusqu'à atteindre actuellement une trentaine de départements (Figure 7) (Roche et al. 2015; Delaunay et al. 2009). Désormais *Ae. albopictus* est présent dans plus de 20 pays d'Europe (Medlock et Leach 2015).

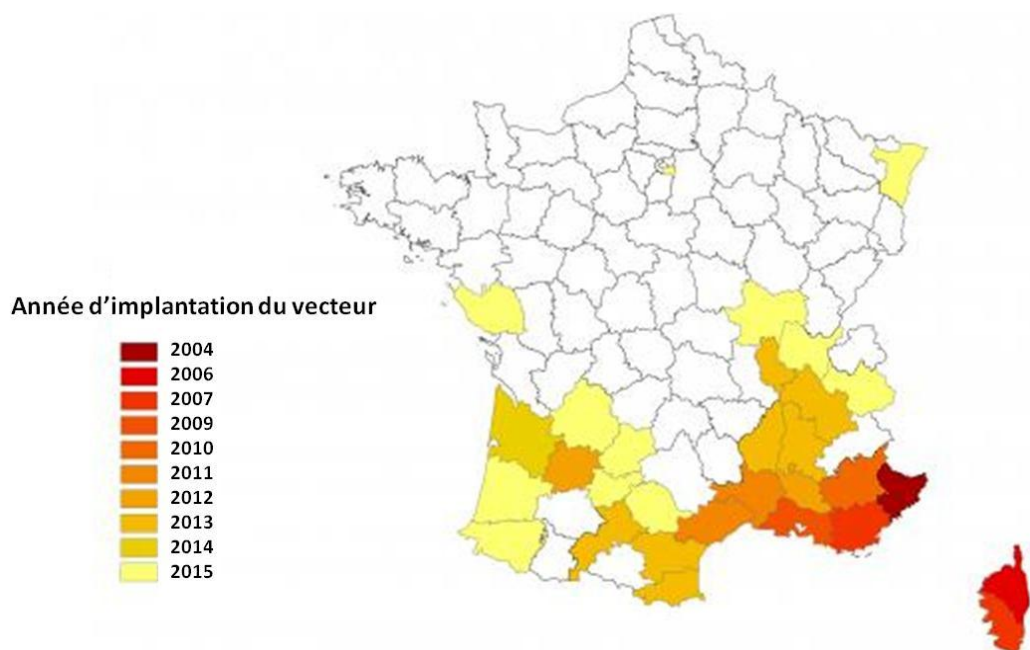


FIGURE 7 : Départements et année d'implantation du vecteur *Aedes albopictus* en France métropolitaine. D'après <http://www.invs.sante.fr>.

Le risque d'importation de cas de CHIK en France métropolitaine est d'autant plus élevé au vu de la situation épidémique dans les Départements Français d'Amérique en raison de l'importance des échanges entre ceux-ci et la France métropolitaine. Les conditions sont réunies pour une transmission autochtone du CHIKV : la population de France métropolitaine est immunologiquement susceptible au virus (Ng et Ojcius 2009); un vecteur compétent existe dans près d'une trentaine de départements, *Ae. albopictus* ; la probabilité d'une introduction du virus par des voyageurs venant de zones affectées est grande. Ce risque de transmission autochtone a été démontré dans le passé récent, dans le Sud de la France, où ont été identifiés

2 cas de CHIK autochtones en 2010 à Fréjus et 11 cas à Montpellier en 2014 (Grandadam et al. 2011; Tomasello et Schlagenhauf 2013; Delisle et al. 2015; Roiz et al. 2015).

L'intensification des transports transcontinentaux de voyageurs et l'expansion de la distribution géographique de ces deux vecteurs ont ainsi favorisé l'émergence et la réémergence du CHIKV dans le monde.

3. Impacts sur la santé humaine et formes cliniques émergentes

Le CHIK est communément décrit comme une maladie infectieuse bénigne, d'évolution aiguë voir parfois chronique, souvent symptomatique (75 à 95% des cas) contrairement à la plupart des autres arboviroses telle que la dengue (25% des cas) (Jeandel, Josse, et Durand 2004; Gérardin et al. 2008; Bhatt et al. 2013; Morrison 2014; Queyriaux et al. 2008). Après une phase d'incubation silencieuse brève de 2 à 7 jours en moyenne (extrêmes : 1 à 12 jours), l'infection est marquée par un début brutal dont les principaux symptômes sont la triade clinique suivante : une fièvre (90 à 100% des cas), des éruptions cutanées (40 à 50% des cas) et des arthralgies (95 à 100% des cas) qui sont classiquement symétriques et touchent principalement les extrémités des membres (poignets, chevilles, phalanges,...) (Simon et al. 2007; Manimunda et al. 2010; Thiberville et al. 2013; Shiferaw et al. 2015; Couderc et Lecuit 2015). Ces douleurs articulaires typiques constituent le symptôme prédominant de la maladie (Waymouth, Zoutman, et Towheed 2013). Pouvant être sévères, elles sont bien souvent invalidantes et sont la cause d'une posture voutée à visée antalgique que prennent les malades. Cette allure est à l'origine même du nom de cette arbovirose : « chikungunya » venant du langage Makondé et signifiant « celui qui marche plié en deux » ou « celui qui marche courbé » (Deller et Russell 1968; Fourie et Morrison 1979). D'autres symptômes tels que des troubles digestifs, des céphalées, des douleurs rétro-orbitales, des photophobies, des myalgies, des nausées ou encore une asthénie peuvent être associés à la maladie, avec des fréquences variables selon les sujets atteints (McGill 1995; Powers et Logue 2007). L'évolution de la maladie est le plus souvent favorable, sans séquelle, avec une guérison qui survient généralement en 1 à 2 semaines (G. Pialoux, Gaüzère, et Strobel 2006; Burt et al. 2012). Néanmoins, la maladie peut évoluer vers une phase chronique marquée par des arthralgies récidivantes et/ou persistantes provoquant une incapacité pendant plusieurs mois voire plusieurs années (Brighton, Prozesky, et de la Harpe 1983; Volpe et al. 2006; Carmona, Shaikh, et Khalidi 2008; Lokireddy, Vemula, et Vadde 2008). Ces atteintes articulaires

chroniques représentent la complication à long terme la plus courante du CHIK (Waymouth, Zoutman, et Towheed 2013). Avant la survenue des récentes épidémies urbaines, ces complications invalidantes ne retenaient que peu l'attention du monde médical puisqu'elles étaient considérées comme anecdotiques compte tenu de leur faible prévalence. Ainsi, depuis son identification dans les années 1950 et jusqu'en 2005, l'infection à CHIKV est restée peu documentée et était considérée par le monde médical comme bénigne et non létale.

L'importante épidémie des années 2005-2006 qui a affecté l'Océan Indien a permis de mettre en évidence des formes cliniques inhabituelles, jusque-là méconnues et a révélé la fréquence et le caractère persistant des séquelles articulaires à distance de l'épisode initial, constituant un problème majeur de santé publique (Borgherini et al. 2008; Sissoko et al. 2009). Confirmant des notions acquises au cours d'épidémies antérieures, ces manifestations articulaires chroniques sont apparues très handicapantes et prolongées dans de nombreux cas (Gilles Pialoux et al. 2007; Simon et al. 2007; Queyriaux et al. 2008). D'après les enquêtes épidémiologiques réalisées lors des récentes épidémies, la fréquence des atteintes articulaires chroniques semble très variable (Rodríguez-morales et al. 2016). Elle oscille entre 10 et 70% des cas après l'infection par le CHIKV avec présence d'une raideur ou d'une douleur articulaire persistante et/ou récidivante sur une période de 1 à 5 ans (Ali Ou Alla et Combe 2011; Pineda et al. 2016). Le nombre d'individus présentant ces manifestations chroniques diminue avec le temps. Ainsi, 88 à 100% des individus seraient affectés au cours des 6 premiers mois post infection contre 57% après 12 à 18 mois et 12% au bout de 3 à 5 ans (Brighton, Prozesky, et de la Harpe 1983; Simon et al. 2007; Sissoko et al. 2009; Win et al. 2010).

De plus, à côté des syndromes arthralgiques fébriles classiques en phase aiguë, de nouvelles formes d'expression de l'infection, jusqu'alors inconnues de la pratique médicale ou peu documentées, ont été décrites au décours de cette épidémie (Schuffenecker et al. 2006; Lemant et al. 2008). Elles surviennent principalement chez des sujets vulnérables (jeunes enfants, personnes âgées, patients présentant des facteurs de co-morbidités). Ces formes graves émergentes correspondent notamment à des manifestations neurologiques (méningo-encéphalites, encéphalites, convulsions généralisées), cardiaques (myocardites, péricardites), hépatiques (hépatites fulminantes), hémorragiques (hémorragies digestives, purpura), cutanées (éruptions vésiculobulleuses) ou encore à des décompensations de pathologies chroniques préexistantes (Gilles Pialoux et al. 2007; Rajapakse, Rodrigo, et Rajapakse 2010). Bien que ces cas atypiques sévères soient rares, incidence estimée à 0.1% lors de l'épidémie

de La Réunion, le taux de létalité dans ces circonstances est élevé et avoisine les 10% (http://www.invs.sante.fr/beh/2008/38_39_40/) (Couderc et Lecuit 2015). Ces formes nouvelles pourraient trouver leur origine dans une modification du virus ou correspondre à des complications passées inaperçues au cours des épidémies antérieures. La comparaison des génomes viraux n'a, à ce jour, pas permis la mise en évidence d'une signature moléculaire associée aux formes sévères de la maladie (Torres et al. 2014).

L'impact socio économique des ces épidémies urbaines massives du 21^{ème} siècle est donc majeur, d'autant qu'en parallèle de ces formes cliniques émergentes, des décès directement associés au CHIKV ont été recensés pour la première fois (Padbidri et Gnaneswar 1979; Philippe Renault et al. 2007; Mavalankar et al. 2008; Soumahoro et al. 2011; Torres et al. 2014). La létalité dans la population générale en situation épidémique est estimée à 1 cas pour 1000, avec une majorité des décès survenant chez des nouveau-nés, des personnes âgées et des sujets fragilisés (http://www.invs.sante.fr/beh/2008/38_39_40/) (Josseran et al. 2006; Morens et Fauci 2014). Le CHIK apparaît donc, au jour d'aujourd'hui, comme une maladie le plus souvent bénigne mais pouvant dans certains cas être associée à des manifestations sévères mettant en jeu le pronostic vital et nécessitant l'admission dans une unité de soins intensifs (Crosby et al. 2016). Ces connaissances nouvelles se sont vues confirmées lors des récentes épidémies sévissant dans les Caraïbes et dans les Amériques (Crosby et al. 2016; Torres et al. 2014).

C'est également durant l'épidémie réunionnaise que la transmission verticale mère-enfant du CHIKV, non encore décrite dans la littérature, a été démontrée (Touret et al. 2006; Robillard et al. 2006). Bien que cette transmission materno-fœtale reste rare (prévalence estimée à 0.25%), le taux d'infection observé des nouveau-nés atteint près de 50% lorsque l'accouchement a lieu au moment du pic virémique maternel (Lenglet et al. 2008; Gérardin et al. 2008). Les nouveau-nés infectés sont asymptomatiques à la naissance et un tableau clinique associant douleur, prostration, fièvre, éruptions cutanées et œdèmes des articulations distales apparaît, après un délai moyen de 4 jours (Mbuyamba et al. 2008). L'infection par le CHIKV à proximité du terme de la grossesse s'accompagne donc d'un risque important de transmission mère-enfant avec une expression clinique grave chez le nouveau-né dans 50% des cas. Les formes néonatales sévères le plus souvent observées correspondent à des encéphalopathies pouvant être convulsives, parfois associées à des complications hémorragiques (http://www.invs.sante.fr/beh/2008/38_39_40/) (Ernould et al. 2008; Torres et al. 2016). Bien que la transmission verticale mère-enfant ait essentiellement été observée dans

un contexte de virémie maternelle *intra-partum*, de rares cas de transmission précoce du CHIKV (avant la 16^{ème} semaine d'aménorrhée) ont été prouvés et l'imputabilité de l'infection virale dans les morts fœtales intra utérines constatées est fortement suspectée (Robillard et al. 2006; Touret et al. 2006).

De même que pour les formes cliniques atypiques, la transmission mère-enfant a été observée lors des récentes épidémies sévissant dans les Caraïbes et dans les Amériques (Lyra et al. 2016; Torres et al. 2016).

Bien que les formes atypiques et l'existence d'une transmission materno-fœtale aient été documentées pour la première fois au cours de l'épidémie réunionnaise, il se pourrait qu'il ne s'agisse pas de formes réellement nouvelles. Les épidémies antérieures, survenues en Afrique et en Asie, où le recours aux soins et la surveillance épidémiologique sont limités, n'ont peut être pas permis de documenter ces manifestations peu spécifiques. En effet, certaines des manifestations atypiques citées ont précédemment été évoquées dans la littérature des années 1960-1970 (Aikat 1966; Sarkar et al. 1965; Sudeep et Parashar 2008).

L'ensemble des données collectées lors de ces récentes épidémies a permis d'alerter le monde médical sur la sévérité de cette arbovirose lors de son émergence dans une nouvelle zone géographique où la population est immunologiquement naïve (Philippe Renault et al. 2007; Ng et Ojcius 2009) d'autant qu'à ce jour il n'existe ni vaccin, ni traitement antiviral efficace disponible contre le CHIKV (Giovanni Rezza 2015; Peper et al. 2015). Ainsi, le traitement contre la maladie reste à ce jour symptomatique avec une utilisation privilégiée des analgésiques et anti-inflammatoires non stéroïdiens (Powers et Logue 2007; Abdelnabi, Neyts, et Delang 2015).

II. LE VIRUS CHIKUNGUNYA

1. Classification

Le CHIKV appartient au genre *Alphavirus* et à la famille des *Togaviridae* (Schmaljohn et McClain 1996; « ICTV Virus Taxonomy » 2016). La famille des *Togaviridae* comprend également le genre *Rubivirus* qui ne compte qu'une seule espèce, le virus de la Rubéole (« ICTV Virus Taxonomy » 2016).

Selon la classification de David Baltimore (1971), basée sur la composition de l'acide nucléique du génome viral ainsi que sur les étapes majeures de la réplication et de l'expression des génomes, les alphavirus appartiennent au groupe IV et possèdent donc un génome constitué d'une molécule d'ARN simple brin à polarité positive (Baltimore 1971; E. G. Strauss, Rice, et Strauss 1984). Bien que la majorité des espèces d'alphavirus ait été isolée à partir de vertébrés et d'arthropodes terrestres, il a été assez récemment identifié des alphavirus infectant des vertébrés aquatiques tels que des poissons (virus de la maladie du pancréas du saumon, virus de la maladie du sommeil de la truite arc-en-ciel) ou des éléphants de mer australe (virus de l'éléphant de mer australe) (Weston et al. 1999; Villoing et al. 2000; La Linn et al. 2001). La présence de ces alphavirus « marins » dans des positions de base lors des études phylogénétiques suggère une origine aquatique pour l'ensemble des membres de ce genre (Forrester et al. 2012).

A ce jour, une quarantaine d'espèces d'alphavirus a été identifiée, certains virus ne sont pas pathogènes pour l'homme alors que d'autres le sont, donnant des tableaux cliniques mineurs à graves (Rupp et al. 2015). Les alphavirus ont une très large distribution géographique, mais ils peuvent être répartis en deux groupes : les alphavirus de l'Ancien Monde et les alphavirus du Nouveau Monde (E. G. Strauss, Rice, et Strauss 1984). A ce jour, il est connu que les alphavirus du Nouveau Monde tels que le virus de l'encéphalite équine de l'Ouest (EEOV), le virus de l'encéphalite équine de l'Est (EEEV) et le virus de l'encéphalite équine du Venezuela (VEEV) provoque généralement une maladie encéphalitique potentiellement mortelle ; tandis que les alphavirus de l'Ancien Monde, comme le CHIKV, le virus Ross River (RRV), le virus Sindbis (SINV), le virus O'Nyong Nyong (ONNV) et le virus Barmah Forest (BFV) sont plutôt associés à des arthrites fébriles pouvant être intenses, débilitantes et parfois chroniques (Suhrbier, Jaffar-Bandjee, et Gasque 2012). Néanmoins, quelques exceptions existent, comme

par exemple le virus Mayaro (MAYV) qui se trouve uniquement dans les Amériques et provoque une maladie typiquement arthritogénique (Tesh et al. 1999). Ainsi, les alphavirus responsables de la plupart des arthralgies humaines sont : le BFV, le RRV, le SINV, le ONNV, le MAYV et le CHIKV (G. Pialoux, Gaüzère, et Strobel 2006). Parmi l'ensemble des alphavirus, le CHIKV est considéré comme le pathogène humain le plus important en termes de morbidité et possiblement en termes de mortalité (Weaver et al. 2012).

La transmission du CHIKV se fait presque essentiellement par l'intermédiaire de moustiques, vecteurs arthropodes, d'où son appartenance au groupe des arbovirus. Les arbovirus représentent un groupe de virus différents d'un point de vue taxonomique mais partageant un cycle de transmission faisant intervenir un hôte vertébré et un vecteur arthropode hématophage (Devaux 2012). Hormis quelques rares exceptions, les arbovirus appartiennent à quatre familles de virus, à savoir *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* et *Reoviridae*, mais tous les virus appartenant à ces familles ne sont pas des arbovirus (Gubler 2002; G. Pialoux, Gaüzère, et Strobel 2006).

2. Structure et Organisation génomique

Le CHIKV est un petit virus enveloppé (toga : toge), sphérique de 60 à 70 nm de diamètre. Il possède une capsidie icosaédrique, composée de 240 copies de la protéine de capsidie (C), contenant une molécule unique d'ARN monocaténaire positif linéaire se composant d'environ 11 800 nucléotides (nt), l'ensemble constitue la nucléocapsidie de 40 nm de diamètre (Khan et al. 2002). Cette dernière est entourée d'une bicouche lipidique issue de la membrane plasmique de la cellule hôte infectée. Cette enveloppe porte 80 trimères formés par l'assemblage d'hétérodimères des protéines E1 et E2, soit 240 copies de chacune de ces glycoprotéines d'enveloppe (Cheng et al. 1995; Zhang et al. 2002).

Le génome du CHIKV a été séquencé pour la première fois en 2002 par des chercheurs japonais à l'université de Nagasaki puis des souches prélevées sur des cas réunionnais et des cas caribéens ont elles aussi été intégralement séquencées (Schuffenecker et al. 2006; Arankalle et al. 2007; Stapleford et al. 2016).

L'ARN génomique 49S (Svedberg) du CHIKV possède une structure type ARN messager (ARNm) eucaryote puisqu'il porte à son extrémité 5' une coiffe (Cap ou 7-méthylguanosine) et une séquence polyadénylée en 3' (queue polyA) (Powers et Logue 2007). Le génome viral

contient deux cadres ouverts de lecture (ORFs : open reading frames) encadrés par deux régions non traduites appelées 5'UTR et 3'UTR (UTR : Un-Translated Regions) (Khan et al. 2002). Le 5' ORF (7425 nt) de l'ARN génomique est directement traduit en une polyprotéine qui sera clivée en quatre protéines non structurales (NS) (nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4), ces dernières formeront le complexe de répllication (CR) du CHIKV. La polyprotéine issue du 3'ORF (3735 nt) est constituée des cinq protéines structurales ((C), E1, E2, E3 et 6k). Cette polyprotéine structurale est traduite à partir d'un ARN sous génomique 26S, ce dernier serait synthétisé à partir d'un promoteur interne situé entre les gènes codant nsP4 et (C) (Levis, Schlesinger, et Huang 1990). L'ORF 5' présente un codon stop (UGA) situé entre les gènes codant nsP3 et nsP4 (en position 5566-5568), il a pour conséquence la synthèse d'une moindre quantité de la protéine nsP4 (ARN polymérase ARN dépendante ou RdRp) par rapport aux autres protéines non structurales (Rupp et al. 2015). Ce phénomène de régulation d'expression de la polymérase virale par un mécanisme de « lecture au travers » (« read-through »), pouvant être appelé mécanisme d'échappement, est également observé chez d'autres alphavirus (Myles et al. 2006; Simpson et al. 1996). Bien que le rôle précis de la présence de ce codon stop dans le 5'ORF ne soit pas encore clairement connu, des études sur d'autres alphavirus semblent montrer sa probable implication dans la virulence et dans la pathogénicité de la souche virale (Tuittila et al. 2000; Myles et al. 2006).

En résumé, l'organisation génomique générale du CHIKV est la suivante (Figure 8) : (i) une coiffe en 5'UTR ; (ii) un premier ORF codant les protéines non structurales nsP1 à nsP4 ; (iii) la région « jonction » (J) entre les deux régions codantes du génome constituée du domaine carboxy-terminal (C-ter) de la séquence codant les protéines NS et du promoteur interne localisé en 5' de la séquence codant les protéines structurales ; (iv) la région subgénomique 26S codant les protéines structurales à savoir les glycoprotéines d'enveloppe (E1, E2, E3 et 6K) et la protéine de capsid (C) ; et pour finir (v) la queue poly(A) en 3'UTR (Solignat et al. 2009; Chevillon et al. 2008).

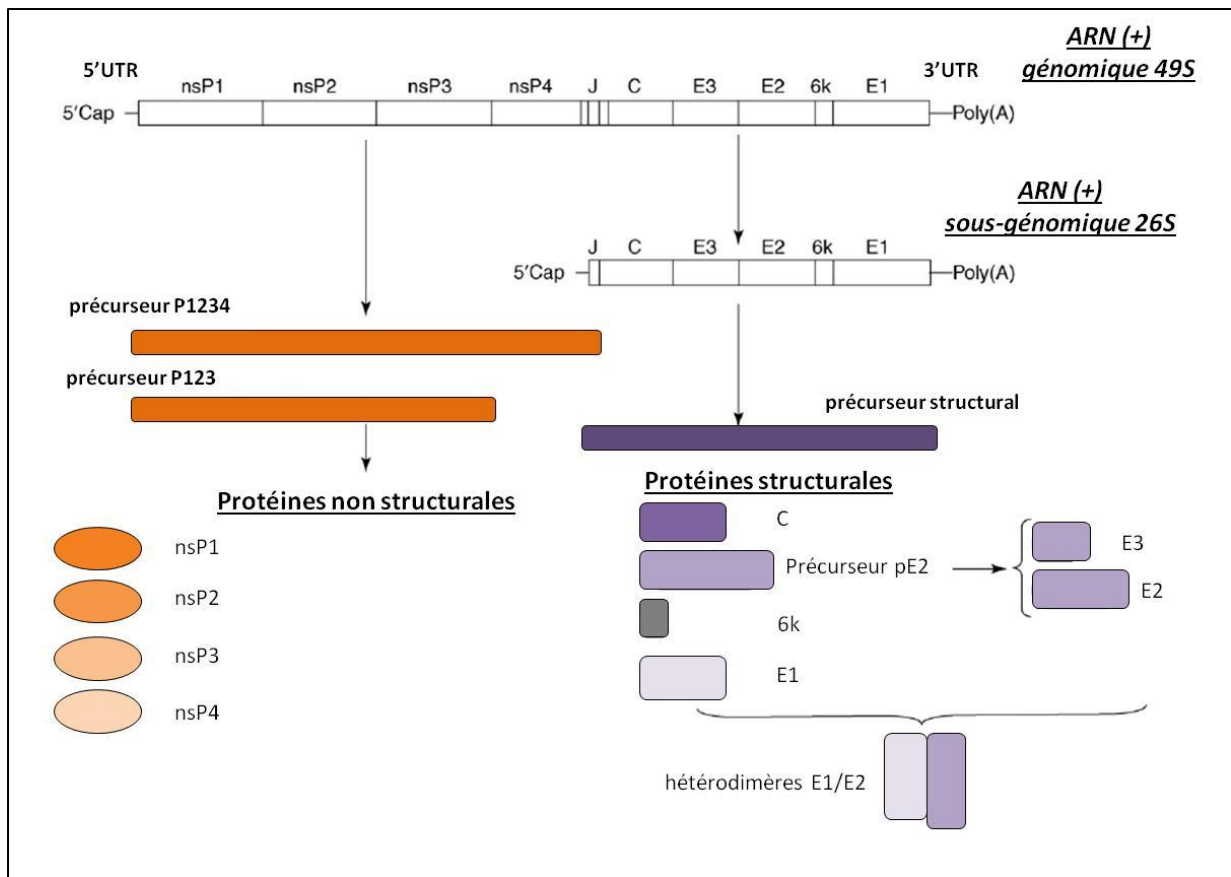


FIGURE 8 - Organisation du génome du virus chikungunya et produits des gènes correspondants. D'après *Chevillon et al.* (2008)

➤ Régions non traduites

Les régions 5'UTR et 3'UTR du génome du CHIKV sont composées respectivement de 76 et de 526 nt (Khan et al. 2002). Ces extrémités non codantes ont des rôles importants et diversifiés dans le cycle de vie du virus et influent notamment sur les aspects clés de la pathogenèse virale. Leurs différentes fonctions sont dues à leurs séquences linéaires et/ou à l'existence de structures secondaires et tertiaires telles que des structures en « épingle à cheveux » (J. H. Strauss et Strauss 1994). Ces éléments structuraux ainsi que la présence de séquences hautement conservées (CSE) semblent impliqués dans des interactions à la fois avec des protéines virales et des protéines de l'hôte favorisant ainsi la réplication et l'assemblage des ARN viraux (Hyde et al. 2015).

La région coiffée 5'UTR contient notamment des CSE promotrices, des séquences régulatrices traductionnelles et des structures impliquées dans des mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire innée (Hyde et al. 2015). Elle serait nécessaire à la fois pour la

synthèse des ARN intermédiaires de polarité négative et pour celle des ARN génomiques de polarité positive (I Frolov, Hardy, et Rice 2001).

En ce qui concerne la région 3' UTR poly(A), elle contient une CSE impliquée dans la réplication du virus ainsi que des sites de liaison jouant un rôle dans les interactions avec la voie des ARN interférents et déterminant le tropisme cellulaire, la gamme d'hôte et la pathogénèse (Hyde et al. 2015). En plus de ces CSE, le 3'UTR présente des séquences répétées permettant notamment l'ancrage de protéines cellulaires influençant la stabilité de l'ARN viral. C'est également au niveau du 3'UTR que le site interne de polyadénylation a été identifié (Khan et al. 2002).

La fonction de certaines séquences conservées présentes au sein des régions non traduites reste encore obscure (Rupp et al. 2015).

Entre les 2 ORF, une troisième région non traduite est présente, il s'agit de la zone de jonction (J) se composant de 68 nt. Cette région J est composée d'une CSE constituant le promoteur interne de l'ARN 26S. Ainsi, le rôle majeur de ce troisième UTR serait de permettre l'initiation de la synthèse de l'ARN sous-génomique 26S (Levis, Schlesinger, et Huang 1990).

➤ Protéines non structurales (NS)

▪ NsP1

La protéine nsP1 est constituée de 535 acides aminés (aa) (Khan et al. 2002). Deux fonctions majeures au cours du cycle réplcatif lui sont attribuées : (i) addition d'une coiffe Cap en 5' des ARN génomiques et sous-génomiques nouvellement synthétisés grâce à ses activités guanyltransférase (GTase) et méthyltransférase (MTase) (Mi et al. 1989; Laakkonen et al. 1994) ; (ii) interaction avec les membranes de l'hôte permettant ainsi l'ancrage du CR à la face cytoplasmique des membranes cellulaires (Ahola et al. 1999; Leung, Ng, et Chu 2011; Reid, Airo, et Hobman 2015). En plus de ces deux fonctions bien connues, il a été montré que nsP1 est nécessaire à l'étape d'initiation de la synthèse du brin d'ARN intermédiaire de polarité négative, le mécanisme d'action mis en jeu restant obscure (Hahn, Strauss, et Strauss 1989; Y. F. Wang, Sawicki, et Sawicki 1991).

- NsP2

Il s'agit de la protéine non structurale ayant la plus grande taille : 798 aa (Khan et al. 2002). La protéine nsP2 possède plusieurs activités enzymatiques et rôles connus dans le cycle viral. Le domaine amino-terminal (N-ter) contient une activité hélicase requise lors du déroulement du duplex d'ARN au cours de la réplication (Gomez de Cedron et al. 1999). Le domaine N-ter contient également une activité nucléoside triphosphatase (NTPase). Cette activité NTPase est une étape préalable à l'action de nsP1 et est donc requise pour l'addition de la coiffe aux ARN viraux (Vasiljeva et al. 2000). En ce qui concerne la région C-ter, elle contient un domaine enzymatique méthyltransférase (MTase) non fonctionnel probablement impliqué dans la régulation de la synthèse de l'ARN sous-génomique d'une part et dans le développement de l'effet cytopathogène (ECP) d'autre part (Mayuri et al. 2008). L'activité protéase de la protéine nsP2, portée par la région C-ter, est indispensable à la maturation de la polyprotéine non structurale initiale P1234 ainsi qu'à celle des formes de clivage intermédiaires successives (Jose, Snyder, et Kuhn 2009). La protéine nsP2 possède un signal de localisation nucléaire responsable de la présence de 50% de cette protéine dans le noyau cellulaire (Rikkonen, Peränen, et Kääriäinen 1992; Fros et al. 2013). Bien que le rôle exact de la localisation nucléaire de nsP2 reste inconnu, son implication dans la virulence des souches virales a précédemment été prouvée chez d'autres alphavirus de l'Ancien Monde (Gorchakov, Frolova, et Frolov 2005; Garmashova et al. 2007; Tamm, Merits, et Sarand 2008).

- NsP3

La protéine nsP3 (530 aa) (Khan et al. 2002) est une phosphoprotéine nécessaire à la synthèse des ARN viraux bien que ses fonctions précises au cours de la réplication restent à ce jour inconnues (Rupp et al. 2015). Elle est constituée de trois domaines distincts. Le domaine N-ter et le deuxième domaine sont des régions conservées au sein des alphavirus alors que le domaine C-ter présente une séquence hypervariable contenant des sites de phosphorylation (Rupp et al. 2015). La phosphorylation de nsP3 chez le SINV serait requise pour la synthèse efficace de l'ARN sous génomique 26S et de l'ARN intermédiaire de polarité négative, ainsi que pour la pathogénicité virale (Y. F. Wang, Sawicki, et Sawicki 1994; Vihinen et al. 2001).

- NsP4

La protéine nsP4 (611 aa) est la protéine virale la plus conservée au sein des alphavirus (Khan et al. 2002). Il s'agit de l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) contenant le site

catalytique (motif GDD) dans sa région C-ter (Hahn, Strauss, et Strauss 1989). Il a également été suggéré que la protéine nsP4 jouerait un rôle clé, via sa région N-ter, dans l'interaction avec les autres protéines non structurales, notamment nsP1, pour la formation du CR ainsi qu'avec des protéines de l'hôte (Yukio Shirako, Strauss, et Strauss 2000).

Chez de nombreux alphavirus, il a été montré la présence d'un codon stop opale (UGA) entre les gènes codant nsP3 et nsP4 (G. P. Li et Rice 1989; Y. Shirako et Strauss 1990). La « translecture » de ce codon, efficace dans 10 à 20% des événements traductionnels, aboutit à la synthèse de la polyprotéine totale P1234 et par conséquent à la formation de la protéine nsP4 après clivage de la polyprotéine (G. Li et Rice 1993; Leung, Ng, et Chu 2011). La présence de ce codon opale régulerait la quantité de nsP4 traduite au cours du cycle répliatif viral bien que son rôle précis ne soit pas complètement élucidé (Myles et al. 2006). Ainsi, la concentration cellulaire de la protéine nsP4 est inférieure à celle des autres protéines NS, ceci étant accentuée par une demi-vie plus faible (Jose, Snyder, et Kuhn 2009).

➤ Protéines structurales

- La protéine de capsid (C)

La protéine (C) (261 aa) est l'unique constituant de la capsid qui est formée de 240 exemplaires s'organisant selon une symétrie icosaédrique (Khan et al. 2002). Elle possède trois domaines : (i) une région N-ter qui jouerait un rôle dans l'assemblage des monomères de capsid ; (ii) une région intermédiaire qui permet la liaison spécifique et l'encapsidation de l'ARN génomique viral ; et (iii) une région C-ter possédant une activité sérine protéase impliquée dans le clivage du précurseur polypeptidique structural (Weiss et al. 1989; J. H. Strauss et Strauss 1994; K E Owen et Kuhn 1996).

- La glycoprotéine E1

La glycoprotéine transmembranaire E1 est une hémagglutinine composée de 435 aa (Khan et al. 2002). Elle intervient dans l'étape de fusion membranaire grâce à son peptide de fusion permettant ainsi la libération de la nucléocapsid dans le cytoplasme de la cellule hôte (Simizu et al. 1984).

- Les glycoprotéines E2 et E3

Le clivage protéolytique du précurseur pE2 libère les glycoprotéines E2 (423 aa) et E3 (64 aa) (Khan et al. 2002).

La protéine transmembranaire E2 porte les sites antigéniques principaux de la neutralisation virale. Sa partie N-ter constitue l'ectodomaine qui est impliquée dans la liaison aux récepteurs des cellules cibles. La partie C-ter porte le domaine d'ancrage dans la bicouche lipidique (Pletnev et al. 2001). En aval du domaine transmembranaire, la protéine E2 possède un endodomaine cytoplasmique dont la fonction principale est la liaison à la nucléocapside permettant l'étape de l'assemblage des nouvelles particules virales (West et Brown 2006). Ce domaine intervient aussi dans l'intégration et la maturation des protéines structurales au niveau du réticulum endoplasmique (Lee, Ricker, et Brown 1994; Katherine E. Owen et Kuhn 1997).

La protéine E3 du CHIKV n'est pas associée aux virions mais est libérée par les cellules infectées (Simizu et al. 1984). On ne connaît pas précisément la fonction de cette protéine, mais comme pour SINV, E3 pourrait être impliquée dans le repliement et la formation des spicules de l'enveloppe virale (Parrott et al. 2009). Il a aussi été rapporté que cette glycoprotéine pourrait protéger les virus en formation lors des étapes d'assemblage et de bourgeonnement (Lum et Ng 2015).

- La protéine 6k

Le polypeptide hydrophobe 6k (61 aa) est associé à la particule virale et pourrait participer, en tant que protéine chaperonne, au repliement de la glycoprotéine E1 lors de la formation de l'hétérodimère E1/E2 (Khan et al. 2002). Cette protéine jouerait un rôle clé dans le processus de bourgeonnement de la particule virale ainsi que dans sa maturation notamment, de part sa capacité à former des canaux cationiques au sein de bicouches lipidiques (Simon et al. 2007; Thiberville et al. 2013).

Les principales fonctions connues de l'ensemble des protéines virales du CHIKV sont récapitulées dans le Tableau 1.

TABLEAU 1 : Activités principales identifiées des protéines virales du CHIKV.

| Protéine | Taille | Activités principales |
|----------|--------|--|
| nsP1 | 535 aa | MTase / GTase Interaction avec les membranes cellulaires |
| nsP2 | 798 aa | Hélicase / NTPase / Protéase |
| nsP3 | 530 aa | ND* |
| nsP4 | 611 aa | RdRp Interaction avec les protéines NS, les protéines hôtes |
| C | 261 aa | Formation de la nucléocapside / Protéase |
| E3 | 64 aa | ND* |
| E2 | 423 aa | Site de reconnaissance des récepteurs cellulaires |
| 6k | 61 aa | Maturation et bourgeonnement |
| E1 | 435 aa | Fusion membranaire |

* ND: Non Déterminé

MTase : Méthyltransférase ; GTase : Guanyltransférase ; NTPase : Nucléoside triphosphatase ; RdRp : ARN polymérase ARN dépendante ; NS : non structurales.

3. Cycle viral

Il est encore incomplètement connu et est déduit de ce que l'on sait des autres alphavirus. Le cycle viral des alphavirus se déroule dans le cytoplasme des cellules de l'hôte vertébré et du vecteur, il est similaire à celui observé au cours de la réplication des virus à ARN de polarité positive (ARN(+)) simple brin.

Les principales étapes sont schématisées en Figure 9 (Schwartz et Albert 2010).

➤ Mécanismes d'entrée dans la cellule hôte

Le CHIKV se fixe à la cellule hôte grâce à la glycoprotéine d'enveloppe E2 au niveau de récepteurs encore non identifiés. En se basant sur la large gamme de types cellulaires susceptibles d'être infectés par le CHIKV, *in vivo* et *in vitro*, le récepteur cellulaire du CHIKV est probablement une molécule dont l'expression est ubiquitaire (van Duijl-Richter et al. 2015). Les laminines, les glycosaminoglycanes et les prohibitines ont été proposées comme récepteurs potentiels des alphavirus chez les hôtes vertébrés (K. S. Wang et al. 1992; Klimstra et al. 2003; Wintachai et al. 2012; Acharya et al. 2015) tandis que la sous-unité bêta

de l'adénosine triphosphate synthase a été proposée comme récepteur potentiel du CHIKV dans les cellules de moustiques (Fongsaran et al. 2014). Ensuite, le virus pénètre dans la cellule cible par endocytose grâce à des vésicules constituées de clathrine (DeTulleo et Kirchhausen 1998). Le pH acide au sein de l'endosome induit des changements de conformation au niveau des hétérodimères E1/E2 présents sur l'enveloppe virale. Cela entraîne l'exposition du peptide de fusion de la glycoprotéine E1 qui forme un pore dans la membrane de l'endosome, libérant ainsi la nucléocapside dans le cytoplasme (Glomb-Reinmund et Kielian 1998; Hammar et al. 2002; van Duijl-Richter et al. 2015).

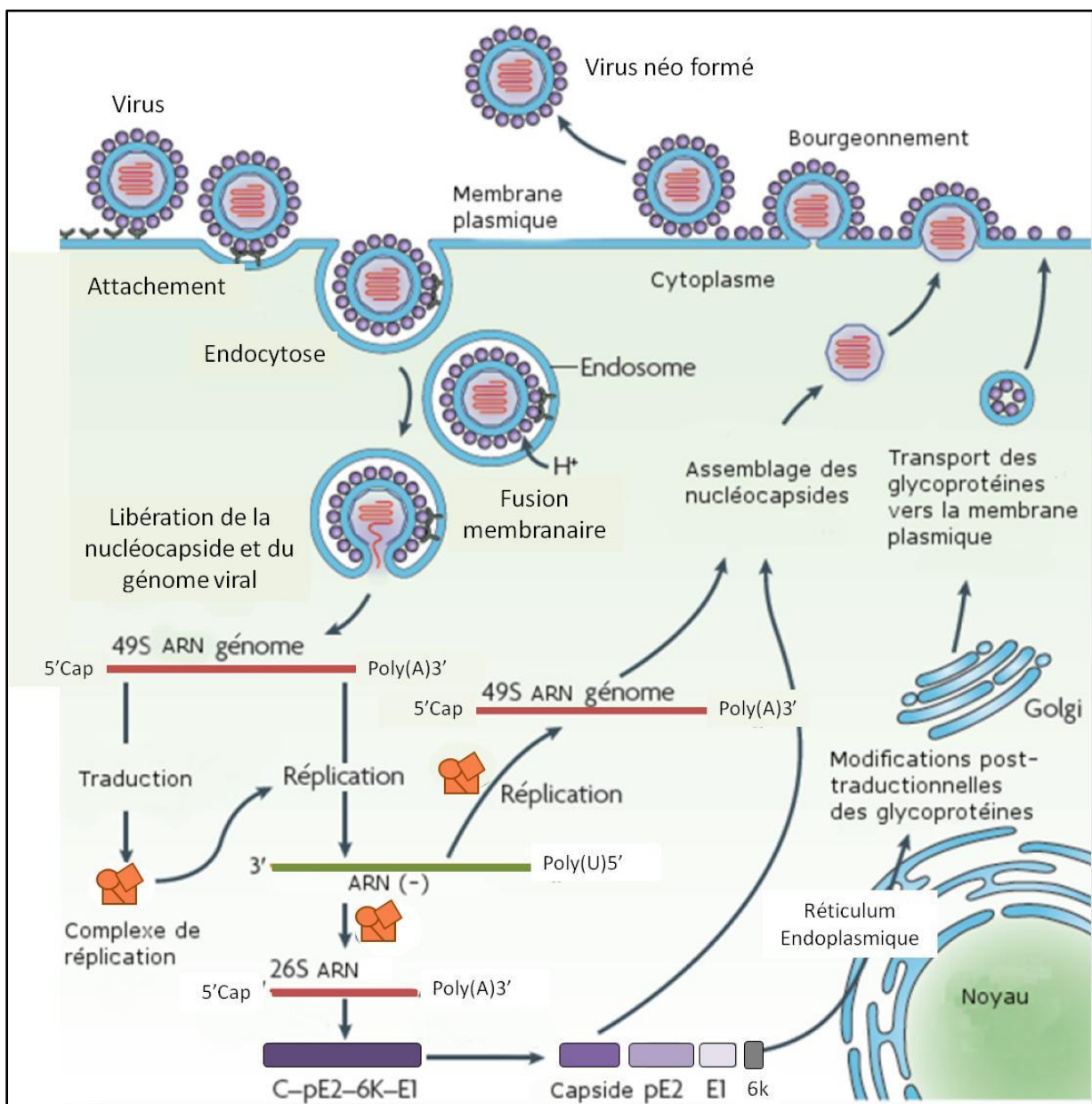


FIGURE 9 - Cycle de réplication du virus chikungunya. Adapté de *Schwartz & Albert* (2010)

➤ Traduction et maturation des protéines virales

Le génome viral est alors libéré dans le cytoplasme de la cellule cible où se déroule l'ensemble des étapes du cycle viral. La machinerie cellulaire traduit précocement l'ARN(+) génomique dont la Cap 5' et la queue poly(A) sont nécessaires au processus traductionnel. Les protéines NS sont traduites majoritairement en un précurseur P123 et minoritairement en un précurseur P1234 par un mécanisme de « lecture au travers » du codon stop (« read-through ») dont l'efficacité de translecture est de 10 à 20% (Leung, Ng, et Chu 2011). Les polyprotéines non structurales sont clivées séquentiellement en 3 ou 4 protéines NS par la protéase virale nsP2 (Jose, Snyder, et Kuhn 2009).

➤ Réplication

Le précurseur P123 s'associe à la protéine mature nsP4 et à des protéines cellulaires pour former un premier CR qui se fixe au niveau du 3'UTR de l'ARN(+) génomique et permet sa réplication en un ARN intermédiaire de polarité opposée ou ARN(-) (J. H. Strauss et Strauss 1994). Les protéines NS matures nsP1 à nsP4 constituent ensuite un second CR qui se fixe au niveau du complémentaire du 5'UTR et probablement au niveau de la région (J) de l'ARN(-) intermédiaire, permettant la synthèse de l'ARN(+) génomique 49S d'une part et celle de l'ARN 26S sous-génomique d'autre part (Ou et al. 1982; Levis, Schlesinger, et Huang 1990; J. H. Strauss et Strauss 1994; Solignat et al. 2009). Les deux extrémités virales non traduites, le 3'UTR sur le brin (+) et le complémentaire du 5'UTR pour le brin (-) servent donc d'ancrage au CR pour la réplication. L'ARN 26S est ensuite traduit en un précurseur polyprotéique structural (C-pE2-6k-E1) (Solignat et al. 2009).

Des études effectuées sur le SINV semblent montrer que les différentes étapes de la réplication de l'ARN viral seraient régulées par les protéolyses séquentielles des précurseurs protéiques non structuraux (Y. Shirako et Strauss 1994).

➤ Assemblage et sortie des particules virales

L'activité auto-protéolytique portée par la région C-ter de la protéine de capsid (C) libère la protéine mature (C) qui s'associe à l'ARN(+) génomique viral pour former les nucléocapsides. Le peptide pE2-6k-E1 migre ensuite dans le réticulum endoplasmique où il subit des modifications post-traductionnelles. Au cours du transport vers la membrane

plasmique, le précurseur pE2 est clivé en E2 et E3 par une furine et l'hétérodimère E1/E2 est formé. La fin du cycle correspond à l'assemblage des virions et au bourgeonnement à travers la membrane plasmique qui devient alors l'enveloppe virale sur laquelle sont ancrés les hétérodimères E2/E3 (Chevillon et al. 2008).

4. Modèles d'étude de la réplication disponibles

Plusieurs années ont été nécessaires entre la découverte du CHIKV et la possibilité d'en étudier son cycle répliatif dans des modèles d'études cellulaires. En effet, il faudra attendre l'émergence de la sévère épidémie de CHIK de 2005-2006, première de cette envergure à frapper le territoire d'un pays économiquement développé, pour que des programmes de recherche visant à faire progresser rapidement les connaissances scientifiques sur le virus et la maladie soient initiés (Morrison 2014).

Ainsi, de nombreux modèles d'étude de la réplication, *in vivo* et *in vitro*, utilisant des souches virales de CHIKV ont vu le jour au cours des années 2007-2008 (Sourisseau et al. 2007; Ozden et al. 2008; Couderc et al. 2008). Un inconvénient majeur à l'utilisation d'une souche virale infectieuse de CHIKV est l'obligation de réaliser les travaux de recherche en laboratoire de confinement de niveau 3. Pour pallier ce problème et étendre les recherches sur ce virus de classe 3 à un plus grand nombre d'équipes, il est possible d'utiliser des virus « bio-sécurisés » c'est-à-dire des virus non infectieux (Sheehy et al. 2007). Ainsi, ce n'est qu'en 2011 que le premier réplicon du CHIKV a été mis au point (Pohjala et al. 2011).

Un réplicon est une molécule d'ARN(+), similaire à l'ARN viral, encadrée par les régions virales non traduites 5'UTR et 3'UTR mais où les gènes codant les protéines structurales sont remplacés par un gène rapporteur pouvant contenir un gène de sélection et/ou de détection (Figure 10-A). Le réplicon du CHIKV (ChikRép) n'est donc pas infectieux ; il est capable de se répliquer de manière autonome dans les cellules dans lesquelles il est transfecté du fait de la traduction des protéines NS permettant la synthèse du CR.

Une autre possibilité, pour étudier la réplication du CHIKV sans utiliser une souche virale infectieuse, est l'utilisation des minigénomes. Ce modèle a été précédemment développé avec succès pour le virus de l'hépatite C (VHC) au laboratoire (Dumas et al. 2007). Un minigénome d'un virus à ARN(+) simple brin est une molécule d'ARN simple brin constituée du 5'UTR et du 3'UTR du génome viral qui encadrent un gène rapporteur (Figure 10-B). Il est ainsi destiné à se répliquer dans des cellules qui expriment le CR. Dans la mesure où

seules les régions 5'UTR et 3'UTR sont nécessaires à la reconnaissance par le CR, ce système est en théorie transposable à un autre virus à ARN(+) tel que le CHIKV.

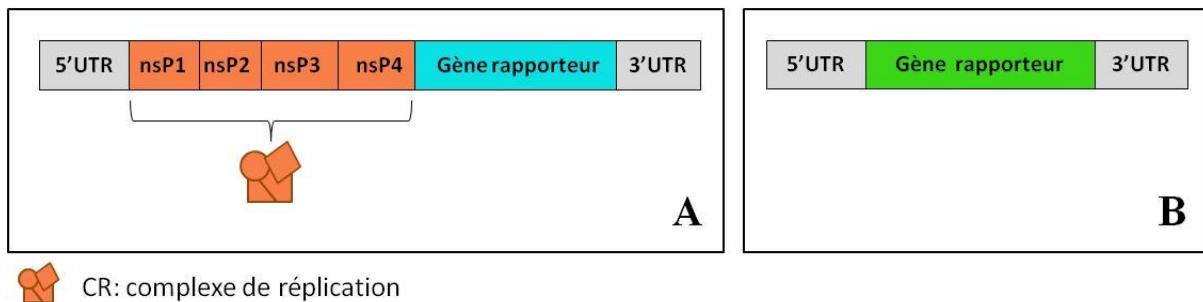


FIGURE 10 : Représentations schématiques des molécules d'ARN du réplicon du CHIKV (A) et du minigénome du CHIKV (B).

UTR : région non traduite ; nsP : gène codant une protéine non structurale.

Ainsi, l'objectif de ce travail est de mettre en place un outil cellulaire non infectieux permettant l'étude de la réplication du CHIKV. Pour cela, la stratégie envisagée est de développer d'une part une lignée cellulaire exprimant le CR du CHIKV, et d'autre part de construire un ARN rapporteur révélateur de l'activité répliquative, à savoir les minigénomes du CHIKV. En effet, le développement de ce modèle nécessite que le CR du CHIKV, indispensable à la réplication des minigénomes, soit présent dans les cellules au sein desquelles l'expression des minigénomes est suivie.

Afin d'établir une lignée cellulaire exprimant le CR du CHIKV, trois approches différentes sont envisagées dans ce travail: (1) Intégration génomique des gènes codant les protéines NS dans une lignée cellulaire en vue d'une expression constitutive du CR ; (2) Expression transitoire du CR dans une lignée cellulaire par transfection d'un ARN subgénomique codant seulement les protéines NS virales ; (3) Expression du CR dans des cellules par un réplicon du CHIKV.

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

1. Plasmides utilisés

Le plasmide pEX-5UTR-H2AE-3UTR contient la matrice ADN du minigénome dont le gène rapporteur (H2AE) est constitué de la séquence codant l'hygromycine phosphotransférase (HygroR, désignée par la lettre H), l'autoprotéase 2A du Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) et l'Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP, désignée par la lettre E).

Les plasmides utilisés pour la construction des plasmides pEX-ChikRép-DelStop, pEX-ChikRép-WT, pEX-ChikRép-DelStop-NCT et pEX-ChikRép-WT-NCT (contenant les matrices ADN des différents réplicons du CHIKV) sont présentés dans le Tableau 2. Les étapes ayant permis leur synthèse sont détaillées dans la partie *Résultats*.

Les séquences initiales des gènes du CHIKV utilisées dans ce travail (NS, Sg Pr, 5'UTR et 3'UTR) ont été obtenues par synthèse de gène (Eurofins). Elles sont basées sur l'isolat LR2006_OPY1 (« Chikungunya Virus Strain LR2006_OPY1, Complete Genome » 2015). Il a néanmoins été effectué deux modifications au sein des séquences issues de cette souche réunionnaise. Premièrement, le codon stop (UGA) situé entre les gènes nsP3 et nsP4 a été initialement délété. Ainsi, la séquence correspondante NS obtenue par synthèse de gène a été désignée par le terme « NS-DelStop ». Deuxièmement, dans le but de réduire la cytotoxicité des réplicons sauvages du CHIKV, une substitution (Pro718→Gly) a été initialement effectuée dans la séquence du gène nsP2. En effet, il a été précédemment montré que cette modification s'accompagnait d'une réduction de la cytotoxicité d'autres alphavirus apparentés au CHIKV tels que le SINV et le SFV (Simliki Forest Virus) (Dryga, Dryga, et Schlesinger 1997; Ilya Frolov et al. 1999; Tamm, Merits, et Sarand 2008). De plus, l'équipe de *Pohjala et al* a montré qu'en l'absence de cette mutation, toutes les cellules transfectées avec les réplicons sauvages (Pro718) mourraient (Pohjala et al. 2011).

TABLEAU 2 : Plasmides utilisés pour la construction des réplicons du virus chikungunya.

| Plasmides | Méthodes d'obtention | Gènes d'intérêt – Produits de gènes | Sites de restriction utilisés |
|--------------------------------|--------------------------------------|---|--|
| pEX-GLuc-2A-NeoR | Synthèse de gène (<i>Eurofins</i>) | Sg Pr : promoteur interne sous génomique GLuc : Gaussia Luciférase 2A : Autoprotéase du FMDV NeoR : Aminoglycoside 3' phosphotransférase | EcoRI – XhoI - SspI |
| pcDNA3-NS-DelStop | Clonage | CMV Pr: promoteur du cytomégalovirus (CMV) NS-DelStop : protéines non structurales nsP1 à nsP4 du CHIKV avec délétion du codon stop TGA situé en 5' de nsP4 AmpR : enzyme de résistance à l'ampicilline | EcoRI – XhoI |
| pcDNA3-NS-DelStop/GLuc-2A-NeoR | Clonage | NS-DelStop Sg Pr-GLuc-2A-NeoR AmpR | BamHI – SpeI (compatible XbaI) - SspI - SacI |
| pEX-Chik-5UTR-3UTR | Synthèse de gène (<i>Eurofins</i>) | Régions non traduites 5'UTR et 3'UTR NeoR | BamHI – XbaI (compatible SpeI) |
| pEX-ChikRép-DelStop | Clonage | 5'UTR et 3'UTR NS-DelStop Sg Pr-GLuc-2A-NeoR NeoR | PshAI – BstXI – SanDI - BamHI – KpnI |
| pcDNA3-NS-WT | Mutagenèse dirigée | NS-WT : nsP1 à nsP4 avec présence du codon stop TGA situé en 5' de nsP4 AmpR | PshAI – BstXI |
| pEX-ChikRép-WT | Clonage | 5'UTR et 3'UTR NS-WT Sg Pr-GLuc-2A-NeoR NeoR | BamHI – BstXI – KpnI |
| pcDNA3-NS-DelStop-NCT | Mutagenèse dirigée | NS-DelStop NCT (Non-CytoToxic): Insertion de 15 nucléotides dans nsP2 (entre les nucléotides 647 et 648) AmpR | BamHI – BstXI - SspI |
| pEX-ChikRép-DelStop-NCT | Clonage | 5'UTR et 3'UTR NS-DelStop-NCT Sg Pr-GLuc-2A-NeoR NeoR | |
| pEX-ChikRép-WT-NCT | Clonage | 5'UTR et 3'UTR NS-WT NCT Sg Pr-GLuc-2A-NeoR NeoR | |

Les plasmides obtenus lors de ce travail apparaissent sur fond blanc. Les plasmides disponibles au laboratoire apparaissent sur fond gris. Les plasmides correspondants sont décrits dans la partie *Résultats*.

2. Cellules

Différents types cellulaires ont été utilisés dans ce travail : (i) les cellules Huh7 issues d'un carcinome hépatocellulaire humain (Solignat et al. 2009) ; (ii) la lignée cellulaire Huh7 hébergeant l'ADN codant les protéines NS, elle a été dénommée lignée Huh7/NS-DelStop ; (iii) les cellules épithéliales Vero issues de reins de singe vert (Higashi et al. 1967) et ; (iv) les cellules fibroblastes Bhk-21 issues de rein de bébé hamster syrien (Davis, Hodge, et Campbell 1971). Ces cellules adhérentes ont été cultivées à 37 degré Celsius (°C) en présence de 5% de CO₂. Le milieu de culture utilisé était constitué de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), de gentamicine (50 µg/ml) et a été supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF).

II. METHODES

1. Restriction enzymatique

Les clivages enzymatiques ont été réalisés, conformément aux recommandations du fournisseur, dans un volume final de 20 µl contenant le tampon recommandé et 1 µl de chaque enzyme spécifiquement choisie en vu de la réalisation d'un clonage ou de la vérification d'un transformant d'intérêt. Après 1 heure (h) d'incubation à 37°C, les produits de digestion ont pu être purifiés et/ou analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (1% masse/volume (m/v)) dans du tampon TAE (Tris HCl 40 mM - acide acétique 20 mM - EDTA 1 mM - pH 8) avec révélation au BET (Bromure d'Ethidium).

2. Ligation

La réaction de ligation permet de lier l'insert et le vecteur. Elle a été réalisée dans un volume final de 20 µl, composé par un tampon de ligation, une quantité d'insert correspondant à un rapport d'un vecteur pour trois inserts et 1 µl de T4-DNA ligase (Promega). Les ligations ont ensuite été incubées une nuit à 16°C.

3. Transformation bactérienne par choc thermique

L'objectif de la transformation bactérienne consiste à introduire le vecteur recombinant dans des bactéries afin de l'amplifier. Les produits de ligation ont donc été transformés dans *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α chimio-compétentes par choc thermique. Un volume de 200 μ l de suspension de *E. coli* DH5 α compétentes préparées au laboratoire a été incubé avec 10 μ l de produit de ligation ou avec 5 μ l de produit issu de la mutagenèse dirigée, pendant 20 minutes (min) dans la glace, puis 90 secondes (s) à 42°C et enfin 2 min dans la glace. Les bactéries ont ensuite été remises en suspension dans 800 μ l de milieu LB liquide (Lysogeny Broth ; yeast extract 0.5% (m/v), tryptone 1% (m/v), NaCl 0.5% (m/v), pH 7.5), puis incubées pour l'expression phénotypique (45 min à 37°C sous agitation). La sélection bactérienne a été effectuée sur boîte de LB Agar contenant de la kanamycine ou de l'ampicilline (50 μ g/ml) selon le gène de sélection présent dans la construction plasmidique à sélectionner. La culture a été incubée pendant 16 à 18 h à 37°C.

4. Extraction d'ADN plasmidique

L'extraction de l'ADN plasmidique a été effectuée après amplification d'un clone d'intérêt dans 5 ml de milieu LB liquide durant la nuit, en présence de l'antibiotique de sélection, avec le kit *NucleoSpin Plasmid*® (Macherey-Nagel) selon les préconisations du fabricant. Les bactéries, sédimentées par centrifugation de la suspension bactérienne initialement préparée, ont été remises en suspension et l'ADN plasmidique a été libéré des cellules bactériennes par une lyse alcaline. Le lysat ainsi obtenu a été neutralisé par ajout d'un tampon créant des conditions propices à la fixation ultérieure de l'ADN plasmidique sur une colonne de silice. Les protéines, l'ADN génomique ainsi que les débris cellulaires ont été précipités par une étape de centrifugation puis ont été éliminés. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique a été déposé sur une colonne. Les impuretés restantes ainsi que les nucléases ont été éliminées grâce à des étapes de lavage. L'ADN d'intérêt a finalement été élué dans du tampon TE (Tris HCl 10 mM – EDTA 1 mM - pH 8) puis conservé à -20°C.

5. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

La PCR permet d'amplifier une région spécifique d'une matrice ADN, grâce à trois étapes (dénaturation, hybridation puis élongation) répétées en boucle, afin d'en obtenir une quantité suffisante. Pour ce faire, l'ADN matrice a été mis en contact avec un couple d'amorces (amorces sens et anti-sens) complémentaire des séquences de l'ADN matrice encadrant la séquence à amplifier spécifiquement. Trois enzymes ADN polymérases « Hot Start » ont été utilisées selon l'objectif de la PCR :

- La Phusion Hot Start Flex (BioLabs): Elle possède une activité exonucléase 3'→5' lui permettant de corriger les erreurs d'appariements de bases, ce qui lui confère un faible taux d'erreur. En raison, d'une part de sa haute fidélité, et d'autre part, de sa capacité à amplifier des fragments de grande taille (≥ 20 kb), elle a été choisie pour la préparation des matrices ADN destinées à être transcrites *in vitro*.
- La PrimeSTAR GXL (Takara) : De même que la Phusion Hot Start Flex, elle possède une activité exonucléase 3'→5' (haute fidélité) et permet l'amplification de fragments de grande taille (≥ 30 kb). Elle a été utilisée pour la synthèse du pcDNA3-NS-WT et du pcDNA3-NS-DelStop-NCT par mutagenèse dirigée.
- La GoTaq Flexi (Promega): Elle permet d'amplifier des fragments d'une taille allant jusqu'à 4 à 5 kb avec une fidélité moindre par rapport aux deux ADN polymérases précédentes car elle est dépourvue d'une activité exonucléase 3'→5'. Cette enzyme n'a donc pas été choisie pour amplifier des séquences de gènes exprimables, mais elle a été utile pour le criblage de gènes d'intérêt.

Les mélanges réactionnels ainsi que les paramètres des réactions d'amplification ont suivi les recommandations du fournisseur de l'ADN polymérase choisie. Les amorces utilisées pour les différentes PCR réalisées dans ce travail sont présentées en Tableau 3. L'amplification a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (1% m/v) dans du tampon TAE suivie d'une révélation au BET.

TABLEAU 3 : Couples d'amorces utilisés pour les différentes réactions de polymérisation en chaîne réalisées.

| Nom de l'amorce | Séquence 5' → 3' | Cible |
|-----------------|--|--------|
| Chik-NS3042_S | TAAGAGCTTGGTCCCTATCC | nsP2 |
| Chik-NS4638_S | GAGATACATACTATGTGGCC | nsP3-4 |
| Chik-NS6220_AS | GTCCAAAGTGGGTAATTC | |
| Chik-NS6306_S | TTTGCTGCCAGCCCTATTAGG | nsP4 |
| Chik-NS6757_AS | ACAGCATCAAAGCAGTAAGCG | |
| T7-Chik-5UTR | TTGAAATATTAA AAACAAAATAACATCTCCTACG | 5UTR |
| 40A-Chik-3UTR | TAATACGACTCACTATAGGGATGGCTGCGTGAGACACACGTAGCCTACC | 3UTR |
| T7-Chik-3UTR | TAATACGACTCACTATAGGGAAATATTA AAAAACAATAACATC | 3UTR |
| 0A-Chik-5UTR | ATGGCTGCGTGAGACACACCTAG | 5UTR |
| T7-nsP1 | TAATACGACTCACTATAGGGAG | nsP1 |
| 40A-nsP4 | TTGGCACAGTCG AGGCTGATCAG | nsP4 |
| STOP-Chik_S | CGACGAGTTA TG ACTAGACAGGGCAGGTGGGTATATATTCTCG | nsP3-4 |
| STOP-Chik_AS | CCTGCCCTGTCTAG TC ATAACTCGTCGTCCTCGTCTGAGCACG | |
| NCT-Chik_S | CACTGCCTACT GGGGAGGAAGGGGAT AAGAGAGTCACTTGGGTAGCG CCG | nsP2 |
| NCT-Chik_AS | CTCTT ACTCCCTTCCTCCCC AGTAGGCAGTAGGCAGTGCAAGGTTATAG CCACTGACC | |

Les amorces utilisées pour la recherche des gènes codant les protéines non structurales sont sur fond bleu. Les amorces utilisées pour la préparation des matrices ADN à transcrire sont sur fond vert, le promoteur T7 et la queue polyadénylée (poly(A)) ajoutés figurent en gras. Les amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée sont sur fond rouge, les mutations insérées figurent en gras souligné.

6. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée consiste à insérer une mutation au sein d'une matrice ADN double brin. Pour cela un couple d'amorces chevauchant a été construit afin que chacune d'elle porte la mutation à introduire (ici une insertion de 3 nt ou bien de 15 nt) et puisse s'apparier spécifiquement à la séquence cible de la matrice ADN. Le succès de la mutagenèse dirigée dépend du choix de ces amorces. En effet, une insertion supérieure à un nucléotide nécessite de longues amorces (> 20 nt). De plus, les nt à insérer, ne s'appariant donc pas à la matrice (mismatches), ne doivent pas se trouver sur les extrémités des amorces. Les couples

d'oligonucléotides utilisés dans ce travail sont présentés en Tableau 3. Ces amorces servent donc de point de départ à une ADN polymérase qui synthétise un ADN double brin portant la mutation présente dans les amorces. Ainsi, 300 ng d'ADN matriciel ont été amplifiés dans un volume final de 25 μ l comprenant : le tampon PrimeSTAR GXL (Takara), les dNTP (0.2 μ M de chaque), les amorces (1 μ M de chaque), l'ADN polymérase PrimeSTAR GXL (0.625 U). Les conditions d'amplification étaient : 30 cycles de 10 s à 98°C, 5 s à 68°C, 13 min à 68°C puis 1 cycle de 13 min à 68°C. La dégradation de l'ADN matrice méthylé, issu de bactéries exprimant une méthylase, a été fait par traitement avec l'enzyme DpnI (10 U) pendant 1 h à 37°C. Le produit (5 μ l) a ensuite été transformé dans *E. coli* DH5 α chimio-compétente par choc thermique. Les principales étapes d'une mutagenèse dirigée sont schématisées en Figure 11.

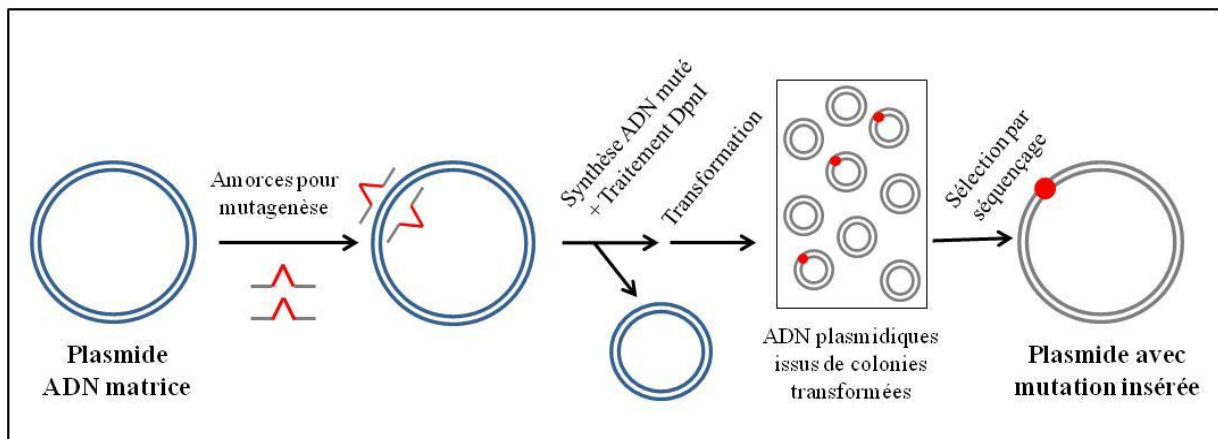


FIGURE 11: Représentation schématique des différentes étapes d'une mutagenèse dirigée.

Le plasmide matriciel est dessiné en bleu. Les plasmides nouvellement synthétisés sont dessinés en gris. La mutation à insérer, présente dans la séquence des amorces utilisées lors de la mutagenèse dirigée, est représentée par un trait de couleur rouge. La mutation insérée dans le plasmide nouvellement synthétisé est ensuite figurée par un rond de la même couleur (rouge).

7. Séquençage nucléotidique

Il a été réalisé à partir de produits de PCR purifiés (10 ng/ μ l) ou d'ADN plasmidique extrait (50-100 ng/ μ l) par la société Eurofins. Les constructions plasmidiques finales ont été vérifiées par un séquençage des régions clonées afin de s'assurer de leur exactitude.

8. Préparation des ARN

➤ Obtention des matrices ADN

Pour produire les ARN codant les protéines NS ainsi que les ARN des minigénomés et des réplicons, le promoteur T7 nécessaire à la transcription *in vitro* et la queue poly(A) (dans le cas de l'ARN codant les protéines NS, du minigénome de polarité positive (miniG(+)) et des réplicons) ont été préalablement introduits par PCR à partir des plasmides correspondants et grâce aux couples d'amorces adéquats (Tableau 3). Les produits de PCR ont été respectivement purifiés sur colonne *Illustra MicroSpin® S-400* puis traités par extraction au phénol/chloroforme pour éliminer les ribonucléases (RNases) avant la transcription. Les matrices ADN ont été conservées à -20°C.

➤ Transcription *in vitro*

La transcription *in vitro* a été réalisée pendant 4 h à partir de 1 à 3 µg d'ADN matrice avec le kit MEGAscript® (Ambion). Les matrices ADN ont ensuite été digérées par la désoxyribonucléase pendant 15 min à 37°C. Après une extraction au phénol/chloroforme, les ARN ont été précipités dans 1 volume d'isopropanol et 1/10 volume d'acétate d'ammonium (5 M). Les ARN ont ensuite été lavés à l'éthanol 70% et repris dans 50 µl d'eau DEPC (eau traitée au DiEthyl PyroCarbonate). Les ARN obtenus ont été conservés à -80°C.

➤ Analyse de la qualité des ARN

La taille, la concentration et l'intégrité des ARN transcrits ont été vérifiées sur puce (RNA 6000 Nano) par électrophorèse capillaire (Agilent 2100 Bioanalyzer). L'électrophorèse est réalisée au sein des micro-canaux d'une puce remplie par un polymère et un intercalant fluorescent. Les molécules fluorescentes s'intercalent dans l'ARN chargé qui migre par gradient de voltage. Les données sont représentées sur un électrophorégramme et permettent d'évaluer la qualité des échantillons analysés (dégradation, quantité) ainsi que leur taille grâce à l'utilisation de marqueurs de tailles connues.

➤ Ajout de la coiffe en 5'

Une coiffe 7-méthylguanosine (Cap) a été ajoutée *in vitro* en 5' triphosphate des ARN codant les protéines NS, des ARN miniG(+) et des ARN réplicons à l'aide du kit ScriptCap®m7G Capping System (Cellscript) selon les préconisations du fabricant. Les trois réactions

enzymatiques successives catalysant l'ajout de la coiffe sont représentées en Figure 12. La coiffe ainsi formée *in vitro* se compose donc d'une guanosine méthylée en position 7, reliée au premier nucléotide transcrit par une liaison 5'-5' triphosphate. Ce procédé dénommé « capping », similaire à celui se déroulant au sein des cellules eucaryotes, améliore la stabilité et l'efficacité de traduction des ARN comparé aux ARN non cappés.

Les ARN cappés ont été extraits au phénol/chloroforme puis précipités dans 2,5 volumes d'éthanol 100% et 1/10 volume de chlorure de sodium (5 M). Les ARN ont ensuite été lavés à l'éthanol 70% et repris dans 50 µl d'eau DEPC. La conservation des ARN se fait à -80°C.

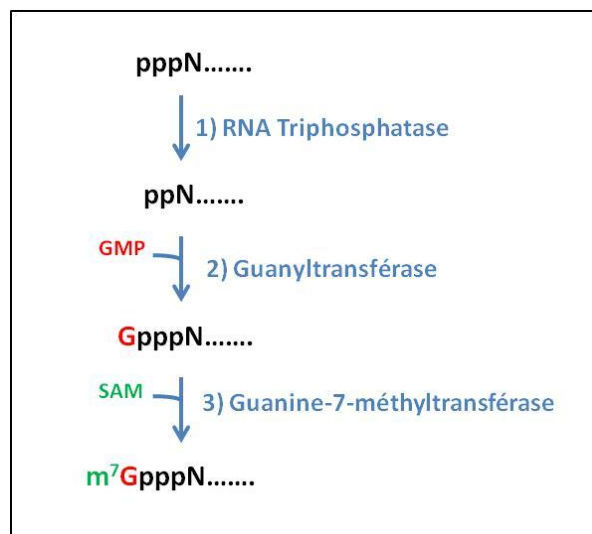


FIGURE 12 : Système enzymatique séquentiel ScriptCap®m7G.

L'ajout *in vitro* de la coiffe Cap en 5' des ARN transcrits est catalysé par trois réactions enzymatiques successives : 1) L'ARN triphosphatase clive l'extrémité 5' triphosphate du nucléotide situé en position 5' de l'ARN ($pppN$) formant ainsi une extrémité diphosphate (pp) ; 2) L'ARN guanyltransférase ajoute un GMP (guanosine monophosphate) à l'extrémité diphosphate du nucléotide en position 5' de l'ARN ; 3) La guanine-7-méthyltransférase catalyse la méthylation de l'azote en position 7 de la guanine en présence du cofacteur SAM (S-adénosyl-méthionine).

9. Transfection d'ARN

La veille de la transfection, les cellules ont étéensemencées soit dans une plaque de 24 puits à raison de 80 000 cellules par puits dans un volume final de 1 ml de milieu de culture, soit dans une flasque de 25 cm² à raison de 1 500 000 cellules dans un volume final de 5 ml de milieu de culture. Pour la transfection des cellules en plaque de 24 puits, 1 µg d'ARN a été incubé avec 2,5 µl de DMRIE-C dans 500 µl d'Opti-MEM (milieu essentiel minimum) pendant 30 min. Pour la transfection des cellules en flasque de 25 cm², 11 µg d'ARN ont été

incubés avec 20,1 µl de DMRIE-C dans 2 500 µl d'Opti-MEM pendant 30 min. Dans les deux conditions de transfection, les pseudo-liposomes ainsi formés ont ensuite été déposés sur les cellules (confluence d'environ 70 à 80%) préalablement lavées par du PBS (Phosphate Buffer Saline) et ont ainsi pu interagir avec les membranes cellulaires pour y faire pénétrer l'ARN. Après 4 h d'incubation, 500 µl ou 2500 µl de DMEM supplémentés avec 20% de SVF ont été ajoutés respectivement dans chaque puits, ou dans chaque flasque transfectés. Une sélection a ensuite été effectuée à 24 h ou à 48 h post transfection par l'agent de sélection adéquat à savoir la généticine (G418) à la concentration de 500 ng/mL (De Tomassi et al. 2002; Gonzalez et al. 2007; Chang et al. 2006).

Le DMRIE-C, agent de transfection utilisé dans ce travail, est composé par un lipide cationique DMRIE (1,2-dimyristyloxy-propyl-3-dimethyl-hydroxy ethyl ammonium bromide) et du cholestérol. Pour un résultat optimal, la transfection a été réalisée dans un milieu de culture dépourvu de SVF, à savoir l'Opti-MEM.

10. Dosage de la Gaussia Luciférase

L'activité de la Gaussia Luciférase (GLuc) présente dans les surnageants de culture a été dosée par luminométrie sur 40 µl de surnageant auxquels ont été ajoutés 30 µl de substrat BioLux® GLuc dilué au 1/100. La luminescence a été mesurée grâce au Varioskan Flash (Thermo Scientific).

La GLuc, luciférase présente chez un copépode marin (*Gaussia princeps*), catalyse une réaction de bioluminescence (Verhaegen et Christopoulos 2002; Tannous et al. 2005). Ainsi par décarboxylation oxydative de son substrat, le coelenterazine, la GLuc produit le coelenteramide ainsi qu'un signal lumineux (Figure 13) (Verhaegen et Christopoulos 2002; Wiles et al. 2005). La GLuc étant très majoritairement sécrétée, la luminescence mesurée dans le surnageant de culture cellulaire est proportionnelle à la quantité d'enzyme produite et par conséquent au niveau d'expression du gène correspondant.

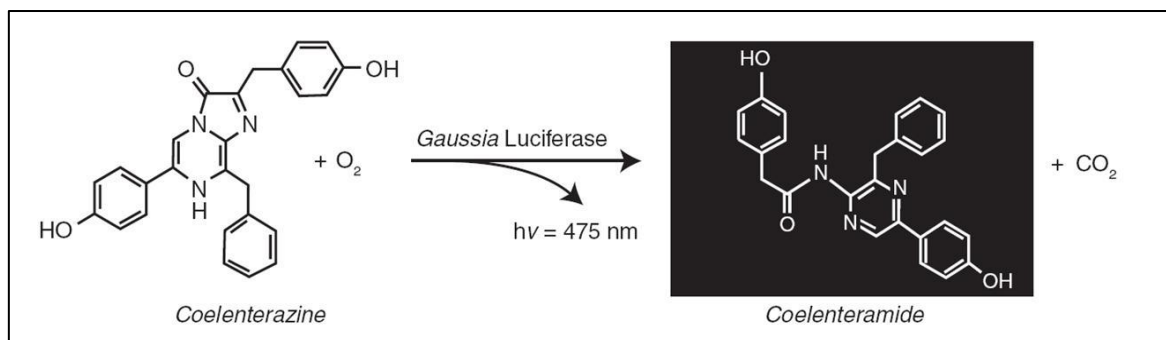


FIGURE 13 : Réaction enzymatique catalysée par la Gaussia Luciférase.
Adapté de *Hadoock et al* (2010)

11. Cytométrie en flux

Les cellules à analyser ont préalablement été lavées au PBS puis décollées avec une solution de trypsine pendant 3 min à 37°C. Cette dernière a ensuite été neutralisée par l'ajout de PBS/EDTA 2 mM/SVF 0.5%. L'analyse de chaque puits a finalement été réalisée grâce au cytomètre BD LSR Fortessa. Chaque cellule est analysée individuellement lors de son passage au sein de faisceaux lasers qui renseignent sur sa taille, sa forme, sa structure interne, sa granulométrie et son intensité de fluorescence émise par une protéine intracellulaire cytoplasmique, l'EGFP.

12. Clonage cellulaire

Les cellules à trier ont préalablement été lavées au PBS puis dissociées par ajout d'une solution de trypsine (incubation pendant 3 min à 37°C). La suspension cellulaire obtenue additionnée de 20 ml de PBS a été centrifugée. Après élimination du surnageant, le culot a été repris dans un mélange PBS/EDTA 2 mM/SVF 0,5%. Afin d'isoler physiquement les cellules les unes des autres, un tri cellulaire a été réalisé grâce au cytomètre en flux BD FACSAria afin que chaque cellule soit déposée dans un puits d'une plaque 96 puits contenant 200 µL de milieu de culture. Les cellules sont injectées dans un courant continu de tampon PBS. Une onde de vibration est appliquée sur le jet permettant ainsi la formation de gouttelettes, le débit étant réglé de façon à ce que chaque gouttelette ne contienne qu'une seule cellule.

13. Extraction des acides nucléiques cellulaires

➤ ADN

L'extraction de l'ADN total cellulaire a été réalisée avec le kit DNeasy® Tissue (Qiagen) en présence de RNase afin de n'extraire que l'ADN et selon les recommandations du fournisseur. L'échantillon cellulaire à extraire a initialement été lysé par la protéinase K puis l'ajout de tampons a permis d'obtenir des conditions optimales à la fixation de l'ADN total. Le lysat obtenu a été chargé sur la colonne d'extraction composée de silice. Une étape de centrifugation a permis la fixation sélective de l'ADN à la membrane tandis que les contaminants n'ont pas été retenus. Les contaminants résiduels ont été éliminés grâce à des étapes de lavage. L'ADN total extrait a finalement été élué dans du tampon TE puis conservé à -20°C. Les ADN extraits ont été quantifiés par mesure de la densité optique au NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

➤ ARN

Les ARN totaux cellulaires ont été extraits à l'aide du Tri Reagent® (Molecular Research Center), mélange composé de phénol et de thiocyanate de guanidine. Après l'élimination du milieu de culture et un rinçage au PBS, 2,5 ml de Tri Reagent® ont été ajoutés aux cellules en culture (flasque de 25 cm²). La suspension cellulaire obtenue a ensuite été répartie dans deux tubes eppendorf. Après 5 min d'incubation à température ambiante, 200 µl de chloroforme ont été ajoutés dans chacun des tubes. Ces derniers ont été agités vigoureusement puis incubés pendant 3 min à température ambiante. L'étape de centrifugation a ensuite permis la séparation de la phase aqueuse contenant les ARN cellulaires. La phase supérieure a finalement été précipitée dans 1 volume d'isopropanol. Les ARN ont ensuite été lavés à l'éthanol 70% et repris dans 50 µl d'eau DEPC. Les ARN obtenus ont été conservés à -80°C. Une analyse de la qualité des ARN extraits a été réalisée grâce à une électrophorèse capillaire (Agilent 2100 Bioanalyzer).

RESULTATS

I. STRATEGIE

L'objectif de ce travail vise à développer un modèle d'étude de la réplication du CHIKV. Il nécessite d'une part, l'obtention de cellules capables d'exprimer le CR (complexe de réplication), et d'autre part, le développement d'un ARN permettant de révéler l'activité répllicative : le minigénome.

1. La production du complexe de réplication

Récemment, notre équipe a créé une lignée cellulaire Huh7/NS-DelStop destinée à l'expression du CR. Elle a été obtenue par transfection de la séquence ADN des gènes codant nsP1 à nsP4 dans des cellules Huh7. Cette séquence, obtenue par synthèse de gène, est mutée du fait de la délétion du codon stop situé entre nsP3 et nsP4. En effet, l'objectif initial était d'obtenir une lignée cellulaire Huh7/NS-DelStop exprimant de façon constitutive le CR et d'optimiser la traduction de la polymérase virale du CHIKV, la nsP4.

Afin de produire du CR viral, une deuxième stratégie a conjointement été conçue. Elle consiste à produire transitoirement le CR. Pour cela un ARN subgénomique, constitué des gènes nsP1 à nsP4 et donc codant les protéines NS, a été transfecté dans des cellules choisies.

Enfin, une troisième approche visant à exprimer constitutivement le CR du CHIKV au sein de cellules a en parallèle été testée dans ce travail. Pour cela un réplicon du CHIKV (ChikRép), ARN à réplication autonome, a été construit puis transfecté dans des cellules afin d'obtenir une lignée cellulaire (type cellulaire/ChikRép+) produisant les protéines NS virales et donc le CR.

2. Les minigénomes

Afin de révéler l'activité répliquative, des minigénomes ont été développés. Les minigénomes sont des ARN qui codent ici l'EGFP, ce gène étant encadré par les séquences que l'on suppose être reconnues par le CR du CHIKV : le 5'UTR et le 3'UTR. Le minigénome, molécule d'ARN simple brin, peut être de polarité positive (miniG(+)) ou bien de polarité négative (miniG(-)) (Figure 14). Lors de la transfection d'un miniG(+), l'EGFP produite est issue de la traduction directe du miniG(+) transfecté. En présence du CR, le minigénome doit être répliqué, augmentant ainsi la quantité d'ARN et le niveau de traduction de l'EGFP. Pour mettre en évidence une activité répliquative, il est donc nécessaire d'identifier la part de fluorescence liée à cette répllication. La transfection de cellules sauvages permet d'évaluer le niveau de traduction lié à l'ARN transfecté. La transfection de cellules modifiée dans le but d'exprimer le CR viral, permet d'évaluer la traduction liée à l'ARN répliqué par différence. Or en pratique, l'augmentation d'un signal est plus aisément détectée lorsque que celui-ci est initialement faible voire nul. Ainsi, l'utilisation d'un ARN miniG(-) doit permettre de détecter, avec une sensibilité accrue, cette activité répliquative. En effet, pour que le gène rapporteur soit traduit et donc que l'EGFP soit produite, le miniG(-) doit être répliqué en un brin positif, via le CR, ce dernier pouvant alors être traduit par la machinerie de la cellule. Ainsi, lors de la transfection d'un miniG(-) en présence du CR, la détection d'une fluorescence significative met en évidence la répllication des minigénomes.

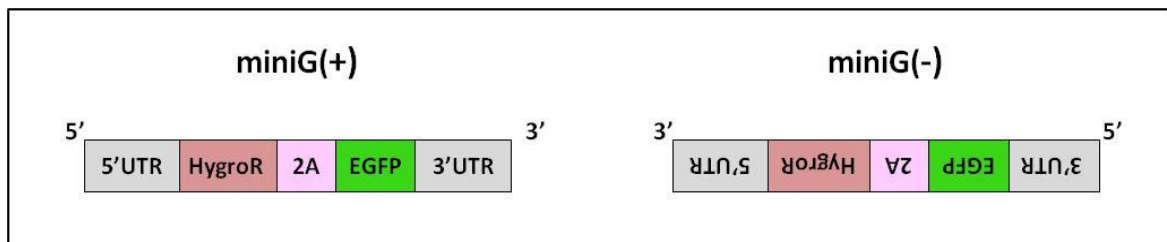


FIGURE 14 : Représentations schématiques des ARN miniG(+) et miniG(-).

Le gène rapporteur, encadré par les régions virales non traduites (UTR), est constitué de la séquence codant l'hygromycine phosphotransférase (HygroR), l'autoprotéase 2A du FMDV (Foot and Mouth Disease Virus) et l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein).

II. ETUDE DE L'ACTIVITE REPLICATIVE APRES INTEGRATION GENOMIQUE DES GENES CODANT LES PROTEINES NS

Concernant cette première approche, l'objectif consiste à déceler une activité répliquative au sein de la lignée Huh7/NS-DelStop déjà disponible au laboratoire. Dans la mesure où il n'était pas possible de détecter la présence du CR viral, du fait de l'absence d'anticorps anti-nsP4 disponibles sur le marché, l'activité répliquative a été recherchée en utilisant les minigénomes.

1. Production des ARN minigénomes

Les 2 matrices ADN, miniG(+) et miniG(-), ont été produites par PCR selon les conditions décrites dans le *Matériel et Méthodes (section II-8)* à partir du plasmide pEX-5UTR-H2AE-3UTR dont la composition a été précédemment décrite (*Matériel et Méthode, section I-1*). Après transcription *in vitro*, la séquence ARN du miniG(-), à la différence de celle du miniG(+), n'a été ni 3' polyadénylée ni 5' coiffée étant donné que le miniG(-) ne sera pas directement traduit par la machinerie cellulaire. Néanmoins, après sa répliquative en brin positif par le CR, il subira les modifications post transcriptionnelles *in cellulo* nécessaires à sa traduction, le « coiffage » étant assuré par les protéines nsP1 et nsP2 (Hyde et al. 2015). Les minigénomes ont ensuite été quantifiés puis la qualité des ARN a été vérifiée grâce au Bioanalyzer 2100 Agilent. Les électrophorégrammes des ARN miniG(+) et miniG(-), représentés en Figure 15, montrent un pic unique aux alentours de 2500 nt qui correspond à la taille attendue des minigénomes et montre l'absence de dégradation.

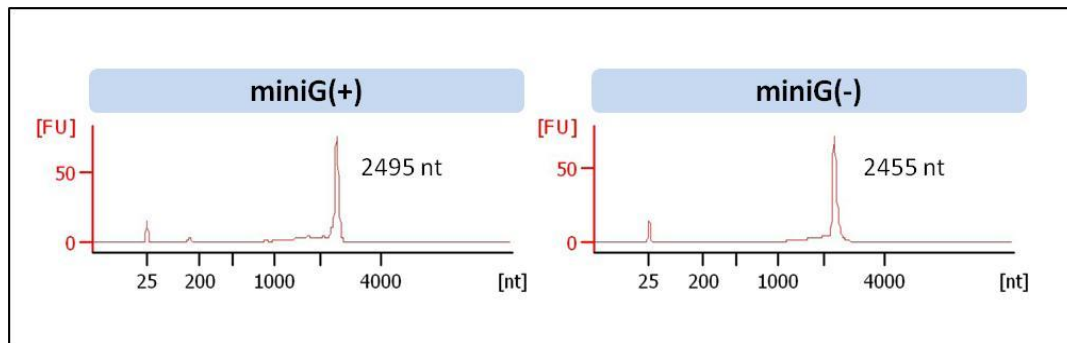


FIGURE 15 : Vérification de l'intégrité des ARN minigénomes.

Electrophorégrammes des ARN des minigénomes de polarité positive (+) et de polarité négative (-) issus de l'analyse de 100 ng d'ARN par le Bioanalyzer 2100 Agilent. L'axe des abscisses correspond à la taille des ARN en nucléotides (nt) et l'axe des ordonnées à l'intensité de fluorescence en unité arbitraire (FU). Le niveau de fluorescence est directement proportionnel à la quantité d'ARN détectée. Le pic détecté à la taille de 25 nt correspond au contrôle interne et permet la validation de chaque puits analytique.

2. Etude de l'activité répliquative par les minigénomes

La lignée Huh7/NS-DelStop, sélectionnée au laboratoire pour avoir intégré les gènes codant les protéines NS, a été utilisée dans ce travail. En parallèle les cellules Huh7, dans lesquelles seule une activité traductionnelle du miniG(+) est possible, ont été utilisées comme témoins. Les cellules Huh7 et la lignée Huh7/NS-DelStop ont été transfectées d'une part avec le miniG(+) et, d'autre part, avec le miniG(-) puis elles ont été analysées par cytométrie en flux après 24 h et 72 h de culture.

Concernant les cellules Huh7, la fluorescence issue de l'EGFP reflète le niveau de traduction de l'ARN des minigénomes. Les résultats obtenus concordent avec ce qui était attendu, le miniG(+) a été initialement traduit, alors que le miniG(-) ne l'a pas été (Figure 16-A). En effet, le pourcentage de cellules Huh7 fluorescentes, transfectées avec le miniG(+), a atteint 49,8% à 24 h et 34,8% à 72 h alors que les cellules Huh7 transfectées avec le miniG(-) ne fluoresçaient ni à 24 h ni à 72 h (Figure 16-A). Ces premiers résultats ont permis de valider, d'une part la construction plasmidique pEX-5UTR-H2AE-3UTR à partir de laquelle les minigénomes ont été obtenus, et d'autre part, les différentes étapes de l'expérimentation (transcription *in-vitro* et transfection cellulaire). Pour les cellules Huh7 transfectées avec le miniG(+), une diminution du pourcentage de cellules fluorescentes a été observée entre 24 et 72 h (Figure 16-A). L'ARN miniG(+) a en effet dû être dégradé par la cellule entre 24 et 72 h

post-transfection conduisant à une baisse globale de la fluorescence, proportionnellement liée à la quantité d'ARN disponible pour la traduction.

Concernant les cellules Huh7/NS-DelStop (Figure 16-B), les résultats obtenus ont été similaires à ceux observés pour les cellules Huh7 (pourcentage de cellules fluorescentes mesuré à 43,5% à 24 h et à 33.9 % à 72 h) avec le miniG(+), indiquant qu'aucune réplication n'est décelable. Les cellules Huh7/NS-DelStop transfectées avec le miniG(-) n'ont pas semblées émettre de fluorescence (pourcentage de cellules fluorescentes < 1), comme dans le cas des cellules Huh7. L'ARN miniG(-) n'a donc vraisemblablement pas été répliqué dans la lignée Huh7/NS-DelStop. Ce résultat devrait néanmoins être confirmé par la répétition de cette expérimentation.

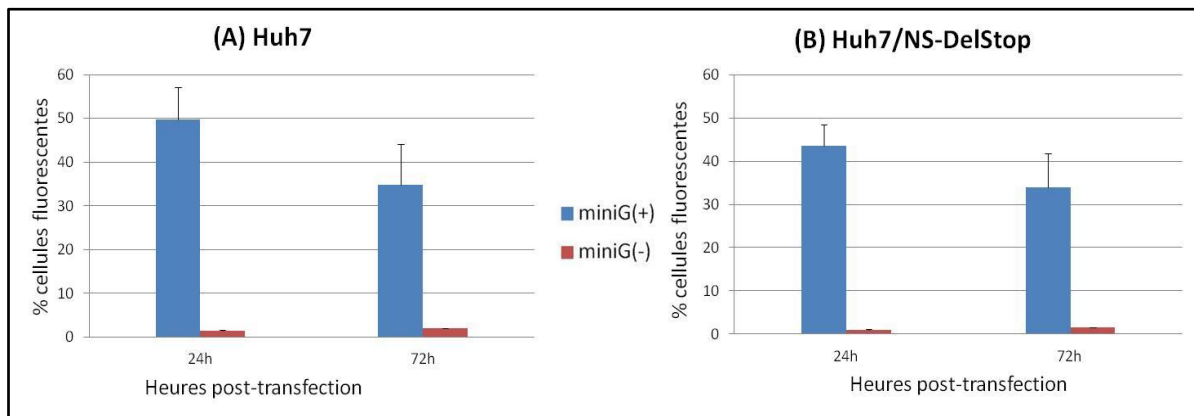


Figure 16 : Analyse en cytométrie en flux des cellules transfectées par les ARN minigénomes.

Quatre vingt milles cellules Huh7 (A) ou Huh7/NS-DelStop (B) ont été transfectées (plaque 24 puits) avec 1 µg de miniG(+) (en bleu) ou de miniG(-) (en rouge). Le pourcentage de fluorescence a été calculé à partir de trois transfections indépendantes pour le miniG(+). Seule une transfection en duplicate a été réalisée pour le miniG(-).

3. Analyse de l'expression des protéines NS

Les résultats précédents pouvant être dus à un défaut d'expression du CR, nous avons vérifié que l'intégration des gènes codant la polyprotéine NS (nsP1 à nsP4) était effective dans cette lignée cellulaire. En effet les anticorps permettant la détection de l'expression du CR viral dans la lignée Huh7/NS-DelStop n'étant pas disponibles, seule la vérification de l'intégration de la séquence était possible. Nous avons donc analysé: (1) La séquence des gènes codant les protéines NS; (2) L'expression de ces gènes dans la lignée cellulaire étudiée.

Le point (1) a en partie été vérifié à l'aide d'une PCR effectuée sur un extrait d'ADN cellulaire total (Huh7/NS-DelStop) et ciblant la région nsP4 (amorces Chik-NS4638_S et

Chik-NS6220_AS)). L'analyse des produits de PCR (Figure 17) a montré, qu'à minima, la fin de la séquence NS a effectivement été intégrée dans le génome cellulaire Huh7/NS-DelStop. Une PCR ciblant la totalité de la séquence NS a été réalisée mais n'a pas permis à ce jour l'amplification de la totalité de la séquence.

Concernant le point (2), une PCR reverse transcriptase (RT-PCR) ciblant une partie du gène nsP4 (amorces Chik-NS6306_S et Chik-NS6757_AS) a été réalisée au laboratoire sur un extrait ARN de cette même lignée cellulaire. Les résultats ont montré la présence, au sein des cellules Huh7/NS-DelStop, d'un transcrit ARN nsP4 (Figure 18). Le promoteur CMV qui pilote l'expression des protéines nsP1 à nsP4 dans le plasmide transfecté (Tableau 2, *pcDNA3-NS-DelStop*) est donc vraisemblablement présent. D'après ces données les parties 5' et 3' de la séquence transfectée ont été intégrées, suggérant que l'intégralité des gènes nsP1 à nsP4 l'a également été. Il serait néanmoins pertinent de vérifier que la totalité de la séquence codant les protéines NS n'a subi ni délétion ni mutation.

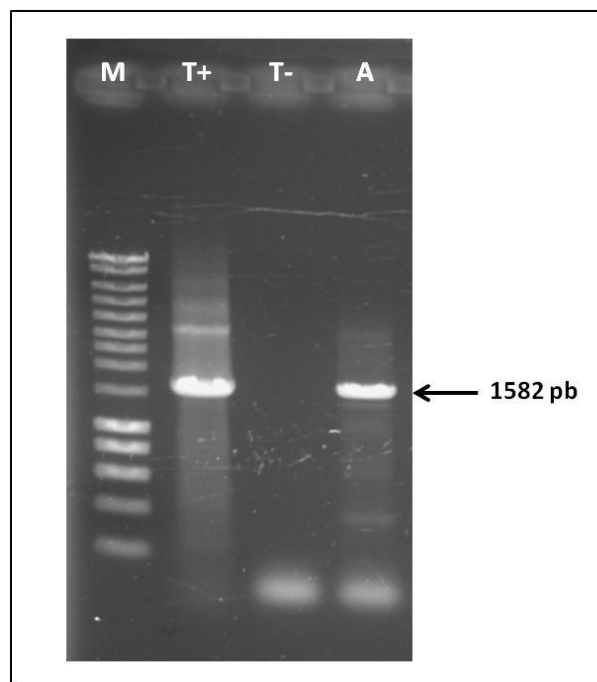


FIGURE 17 : Mise en évidence de l'intégration de l'extrémité 3' de la séquence NS au sein de la lignée Huh7/NS-DelStop.

Cinq μ l du produit de PCR réalisée sur un extrait d'ADN total des cellules Huh7/NS-DelStop avec les amorces Chik-NS4638_S et Chik-NS6220_AS ont été déposés sur gel d'agarose (1% m/v) (puits A). La taille attendue de l'amplicon spécifique est de 1582 pb. Un témoin positif (T+) correspondant au *pcDNA3-NS-DelStop* et un témoin négatif (T-) correspondant à de l'eau ont parallèlement été amplifiés selon les mêmes conditions de PCR. Un marqueur de taille connue a été déposé en puits M.

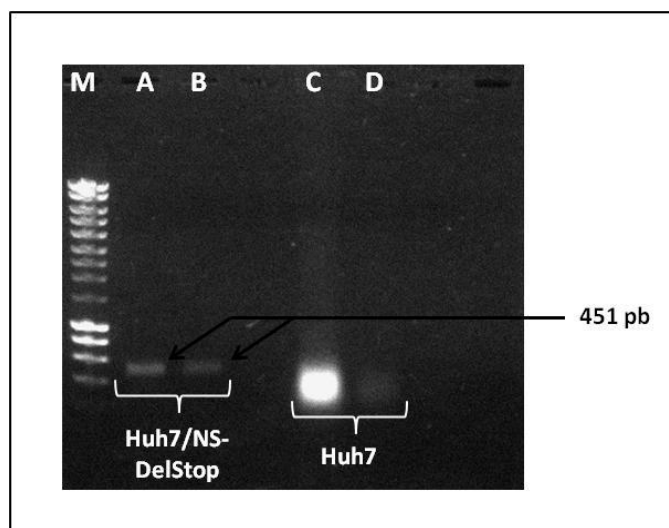


Figure 18 : Mise en évidence d'un transcrit ARN nsP4 au sein de la lignée Huh7/NS-DelStop.

Cinq μL des produits de la RT-PCR (amorces Chik-NS6306_S et Chik-NS6757_AS), réalisée en duplicate, sur un extrait ARN des cellules Huh7/NS-DelStop ont été déposés sur un gel d'agarose (1% m/v) (puits A et B). La taille attendue de l'amplicon spécifique est de 451 pb. Un témoin négatif, correspondant à la même RT-PCR réalisée sur un extrait ARN des cellules Huh7 non modifiées, a en parallèle été effectué en duplicate (puits C et D). Un marqueur de taille connue a été déposé en puits M.

N'ayant pas pu démontrer la présence d'une activité répliquative dans la lignée cellulaire Huh7/NS-DelStop, une deuxième approche, visant à produire transitoirement *in cellulo* le CR du CHIKV, a donc été envisagée dans ce travail afin de poursuivre le développement d'un modèle répliquatif non infectieux du CHIKV.

III. EXPRESSION CELLULAIRE DES PROTEINES NS PAR UN ARN CODANT NSP1 A NSP4

1. Production des ARN codant les protéines NS

La matrice ADN codant les protéines NS a été obtenue par PCR à partir du plasmide pcDNA3-NS-DelStop (Tableau 2) et selon les conditions décrites dans le *Matériel et Méthodes (section II-8)*. Ainsi, de même que son plasmide initial, la séquence NS obtenue présente la substitution Pro718→Gly dans le gène nsP2 et est également dépourvue du codon stop situé entre nsP3 et nsP4. Après l'étape de transcription *in vitro*, la séquence ARN NS 3'poly(A) obtenue a été 5' coiffée. Elle peut ainsi être directement traduite par la machinerie cellulaire hôte. Les ARN NS synthétisés, dénommés ARN NS-DelStop, ont ensuite été quantifiés puis leur qualité a été vérifiée par électrophorèse capillaire grâce au Bioanalyzer 2100 Agilent. L'électrophorégramme correspondant, représenté en Figure 19, montre un pic unique aux alentours de 7500 nt correspondant à la taille attendue de la séquence codant les protéines NS et atteste de l'absence de dégradation des ARN obtenus. Ce pic est conforme à ce qui est attendu pour des ARN de plus de 6 000 nt, limite de séparation de la puce Nano 6 000.

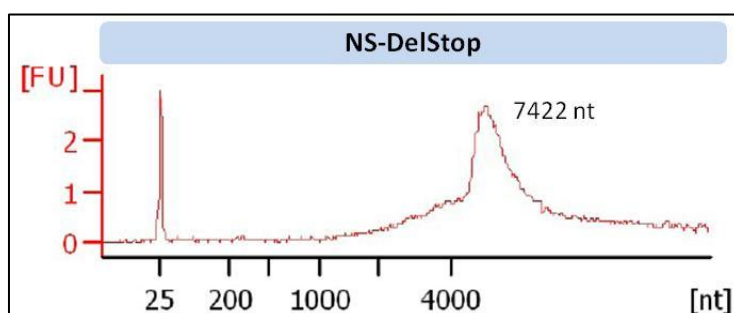


FIGURE 19 : Vérification de l'intégrité de l'ARN NS-DelStop.

Electrophorégramme de l'ARN NS-DelStop issu de l'analyse de 100 ng d'ARN par le Bioanalyzer 2100 Agilent. L'axe des abscisses correspond à la taille des ARN en nucléotides (nt) et l'axe des ordonnées à l'intensité de fluorescence en unité arbitraire (FU). Le niveau de fluorescence est directement proportionnel à la quantité d'ARN détecté. Le pic détecté à la taille de 25 nt correspond au contrôle interne et permet la validation de chaque puits analytique.

2. Etude de l'activité répliquative par les minigénomés

Les cellules Huh7 et les cellules Bhk-21 ont été utilisées dans cette approche.

Lors d'une même transfection, ces deux types cellulaires ont été transfectés avec l'ARN subgénomique codant les protéines NS et avec l'ARN miniG(-). L'objectif consistait à détecter une activité répliquative dans les cellules ayant subi cette double transfection simultanée. Cette approche est basée sur le principe suivant : étant cappé et polyadénylé, l'ARN NS-DelStop transfecté peut, en théorie, être traduit par la machinerie cellulaire conduisant ainsi à la production de CR viral au sein des cellules doublement transfectées. Le CR viral ainsi produit pourrait alors assurer la réplication du miniG(-) et donc la production d'EGFP mise en évidence en cytométrie en flux. En parallèle à cette double transfection cellulaire, les cellules Huh7 et Bhk-21 ont été transfectées d'une part avec le miniG(+) et d'autre part avec le miniG(-). Trois conditions de transfusions (ARN NS-DelStop associé au miniG(-) ; miniG(+) seul ou miniG(-) seul) ont donc été réalisées pour les deux types cellulaires étudiés. Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux après un temps (T) de 24 h et de 72 h de culture. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 20.

Dans le cas où seulement le miniG(+) ou seulement le miniG(-) a été transfecté, la fluorescence cellulaire reflète le niveau de traduction de l'ARN minigénome. Les résultats obtenus pour les deux types cellulaires concordent avec ce qui était attendu. Le miniG(+) a initialement été traduit (pourcentage de cellules Huh7 fluorescentes : 42% (T 24 h), 29% (T 72 h) ; pourcentage de cellules Bhk-21 fluorescentes : 94% (T 24 h), 77% (T 72 h)) alors que le miniG(-) ne l'a pas été (pourcentage de cellules Huh7 et Bhk-21 fluorescentes ≤ 1) (Figure 20). Ces données, en accord avec les résultats précédents présentés en Figure 16-A, ont permis de valider les conditions de l'expérimentation.

De plus concernant les transfusions réalisées avec le miniG(+), le pourcentage de cellules fluorescentes mesuré au T 24 h reflète le pourcentage de cellules efficacement transfectées. Le marqueur mesuré, l'EGFP, est codé par le gène correspondant présent dans la construction des miniG(+). Si une cellule fluoresce cela signifie qu'elle produit de l'EGFP et par conséquent qu'elle a été correctement transfectée par l'ARN miniG(+). Ainsi les résultats obtenus ont montré que le type cellulaire Bhk-21 semblait plus efficacement transfecté que les cellules Huh7, ceci dans les conditions expérimentales décrites. En effet, le pourcentage de cellules Bhk-21 fluorescentes, transfectées avec le miniG(+), a atteint 94% à 24 h alors que celui des cellules Huh7 n'a atteint que 42%.

Dans le cas où l'ARN NS-DelStop a simultanément été transfecté avec le miniG(-), la fluorescence cellulaire reflète la présence d'une activité répliquative des miniG(-). Les résultats obtenus, similaires quel que soit le type cellulaire transfecté, ont montré une absence de fluorescence (pourcentage de cellules fluorescentes ≤ 1) (Figure 20). Ainsi, l'ARN miniG(-) transfecté simultanément avec l'ARN codant les protéines NS n'a vraisemblablement pas été répliqué.

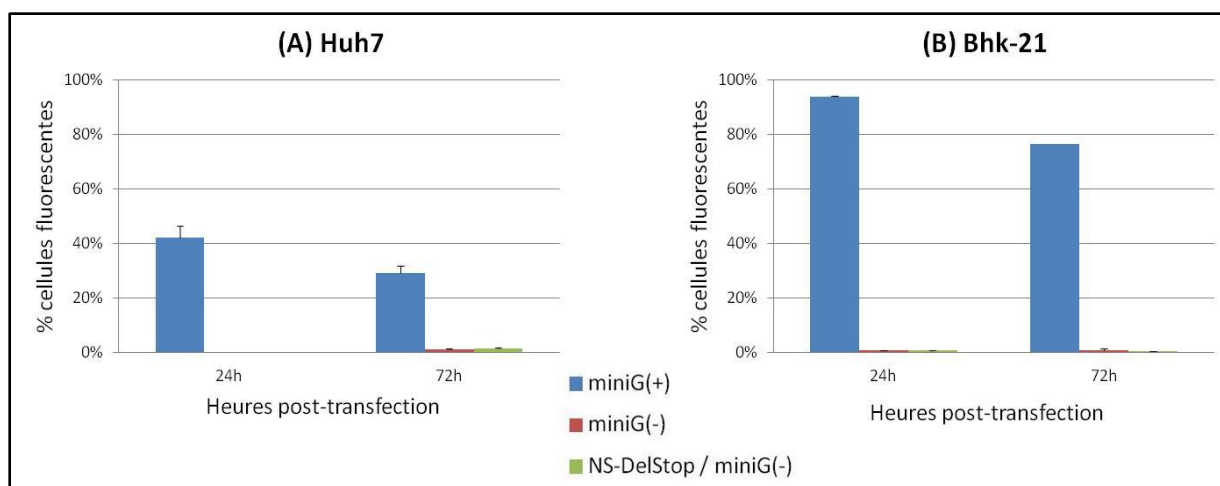


FIGURE 20 : Analyse en cytométrie en flux des cellules transfectées.

Quatre vingt mille cellules Huh7 (A) ou Bhk-21 (B) ont été transfectées (plaque 24 puits) par 0.5 μg de miniG(+) (bleu) ou de miniG(-) (en rouge) ou bien par 0.5 μg d'ARN NS-DelStop associé à 0.5 μg de miniG(-) (en vert). Le pourcentage de cellules fluorescentes a été calculé à partir d'une transfection réalisée en duplicate pour les trois conditions précédemment décrites.

Cette deuxième approche n'étant a priori pas concluante nous avons donc développé une troisième stratégie visant à exprimer le CR viral par l'intermédiaire d'un réplicon du CHIKV.

IV. EXPRESSION CELLULAIRE DES PROTEINES NS PAR UN REPLICON DU CHIKV

1. Construction des réplicons du CHIKV

➤ Construction du réplicon dépourvu du codon stop : ChikRép-DelStop

La première étape de ce clonage a consisté à construire le plasmide pcDNA3-NS-DelStop/GLuc-2A-NeoR à partir du pcDNA3-NS-DelStop et du pEX-GLuc-2A-NeoR (Tableau 2, Figure 21-A). Pour ce faire, un clivage de ces deux plasmides a été réalisé par les enzymes EcoRI et XhoI. Une troisième enzyme, SspI, a été ajoutée au mélange de restriction du pEX-GLuc-2A-NeoR afin de cliver la partie restante du pEX en un plus grand nombre de fragments et ainsi augmenter la probabilité de ligation de l'insert (GLuc-2A-NeoR) dans le plasmide vecteur pcDNA3-NS-DelStop. Cette approche a permis de se dispenser d'une étape de purification des fragments de restriction sur gel d'agarose. Après les étapes de restriction, de ligation et de transformation (réalisées conformément au *Matériel et Méthodes, section II 1 à 3*), 18 clones bactériens ont été obtenus. Parmi ceux-là, 12 ont été testés par double restriction enzymatique (EcoRI + XhoI) afin de séparer l'insert GLuc-2A-NeoR (1 500 pb) du vecteur pcDNA3-NS-DelStop (12 786 pb) dans lequel il doit avoir été cloné. L'analyse des 12 produits de restriction, représentée en Figure 22, montre que les clones 2 et 9 contiennent le plasmide d'intérêt pcDNA3-NS-DelStop/GLuc-2A-NeoR. Le clone 2 a été choisi pour la suite de ce travail.

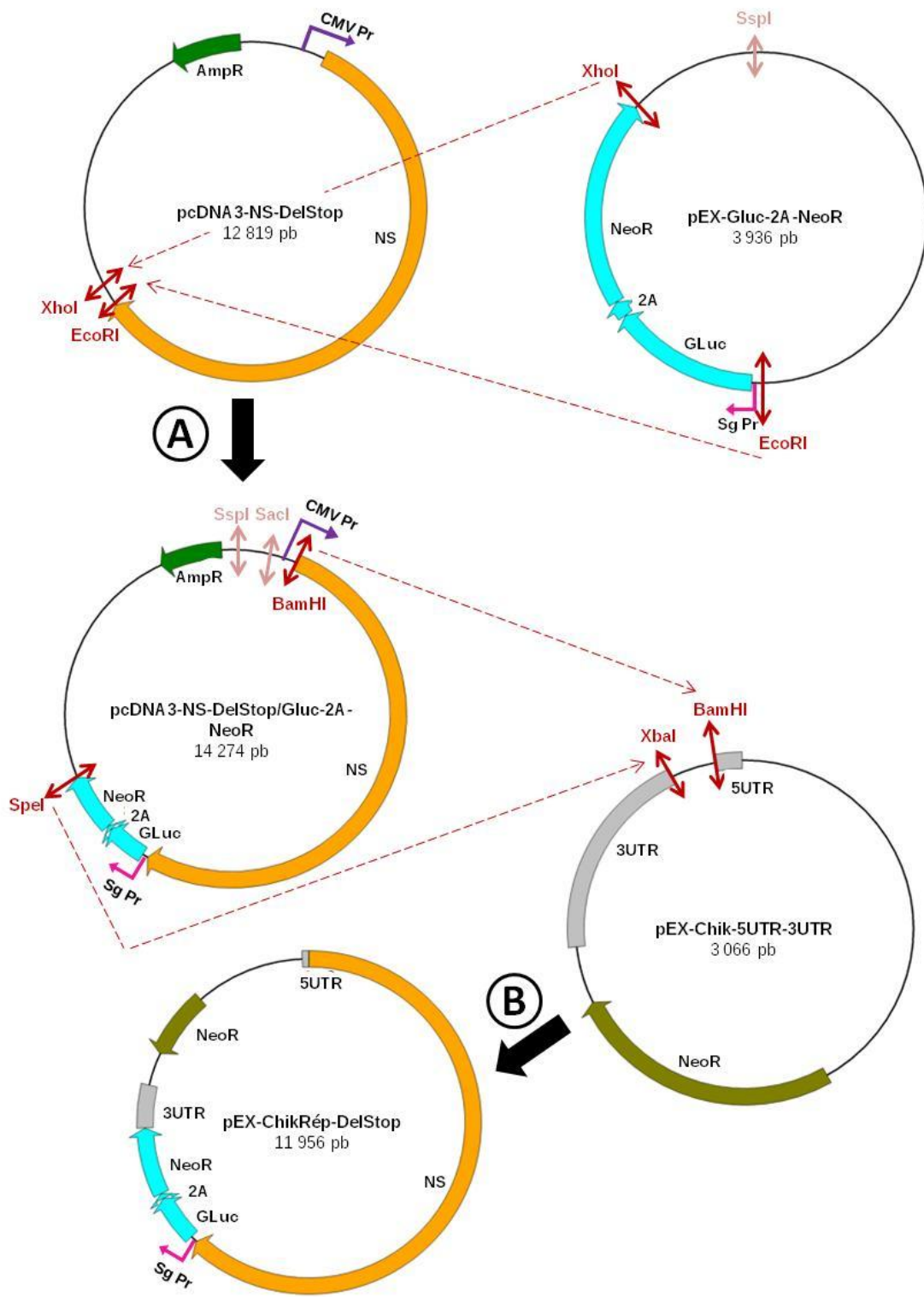


FIGURE 21 : Représentation schématique des réactions de clonage réalisées pour la construction du pEX-ChikRep-DelStop.

Les plasmides utilisés et obtenus dans ce travail sont représentés sous forme de cartes plasmidiques. Les sites de restrictions représentés ici correspondent à ceux utilisés pour les différents clonages. Les abréviations utilisées pour désigner les gènes d'intérêt sont définies dans le Tableau 2 de la partie *Matériel et Méthodes* (section I-1).

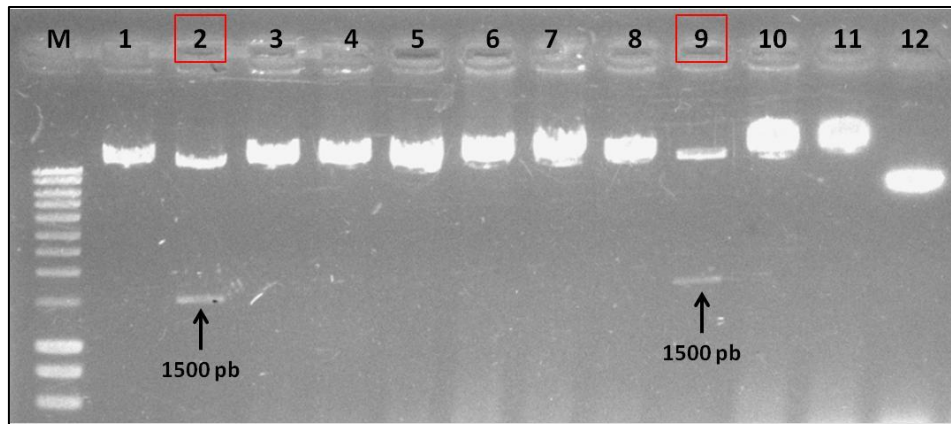


FIGURE 22 : Vérification de 12 clones obtenus lors du clonage du gène rapporteur Gluc-2A-NeoR dans le pcDNA3-NS-DelStop.

Dix μ l de chaque produit de restriction ont été déposés dans chaque puits (numéroté de 1 à 12) sur gel d'agarose 1% (m/v). Les puits 2 et 9 correspondent aux transformants d'intérêt. Le puits M correspondant au marqueur de taille.

La seconde étape a consisté à cloner la séquence NS-DelStop/GLuc-2A-NeoR (issu du clone 2) dans le pEX-Chik-5UTR-3UTR (Tableau 2, Figure 21-B). Le plasmide pEX-Chik-5UTR-3UTR a été clivé par les enzymes BamHI et XbaI. En plus d'être clivé par les enzymes d'intérêt BamHI et SpeI (compatible avec XbaI), le plasmide pcDNA3-NS-DelStop/GLuc-2A-NeoR a également été restreint par les enzymes SacI et SspI afin de limiter la probabilité de clonage dans le vecteur pEX d'un fragment autre que l'insert d'intérêt. La sélection des transformants d'intérêt a été effectuée par PCR sur 12 des 50 colonies obtenues en utilisant les amorces *Chik-NS6306_S* et *Chik-NS6757_AS* (ciblant nsP4). L'analyse des produits de PCR, représentée en Figure 23, montrent que 10 des clones testés contiennent le vecteur transformés (pEX-ChikRép-DelStop). Le clone 4 a été choisi pour la suite de ce travail.

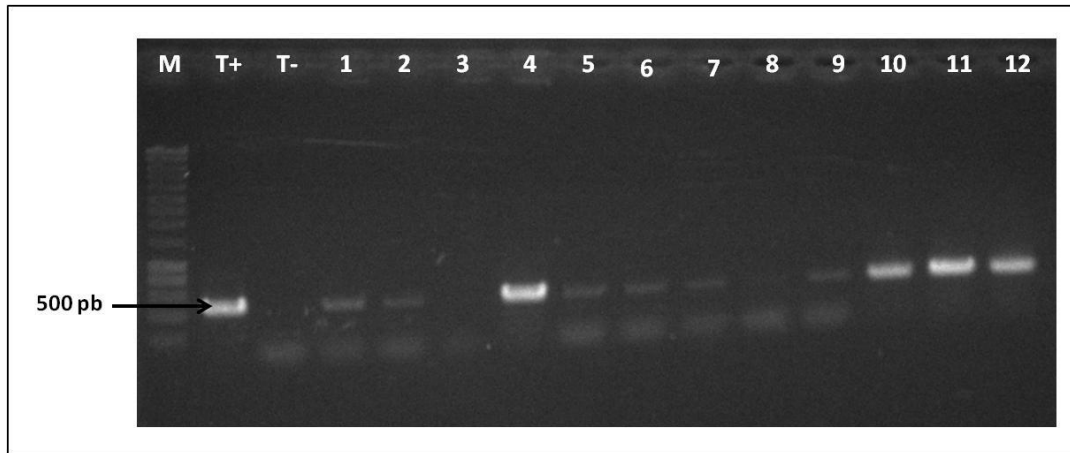


FIGURE 23: Vérification de 12 clones obtenus lors du clonage de l'insert NS-DelStop/Gluc-2A-NeoR dans le pEX-Chik-5UTR-3UTR.

Dix μ l des produits de PCR (amorces *Chik-NS6306_S* et *Chik-NS6757_AS*) ont été déposés par puits (numéroté de 1 à 12) sur gel d'agarose (1% m/v). La taille attendue de l'amplicon spécifique est de 500 pb. Un témoin positif (T+) correspondant au pcDNA3-NS-DelStop et un témoin négatif (T-) correspondant à de l'eau ont en parallèle été amplifiés selon les mêmes conditions de PCR.

➤ Construction du réplicon contenant le codon stop : ChikRép-WT

Puisqu'il a été obtenu à partir du pcDNA3-NS-DelStop, le réplicon initialement construit dans ce travail (ChikRép-DelStop) est dépourvu du codon stop situé entre nsP3 et nsP4, normalement présent dans le génome viral sauvage (WT). Afin de se rapprocher de la séquence du génome sauvage, le codon STOP a été réintroduit dans la séquence ADN du réplicon ChikRép-DelStop. Dans un premier temps, le codon stop a été inséré par mutagenèse dirigée dans le pcDNA3-NS-DelStop entre les nt 5565 et 5566. Après les différentes étapes, détaillées dans le *Matériel et Méthodes (section II-6)*, la région correspondant aux nt 4638-6220 de la région NS (comprenant la mutation) a été amplifiée par PCR sur colonie (amorces *Chik-NS4638_S* et *Chik-NS6220_AS*), puis séquencée, sur 6 des clones obtenus. Le séquençage a montré qu'un tiers des clones était positif (2/6) puisqu'ils contenaient le codon stop TGA. L'ADN plasmidique pcDNA3-NS-WT d'un transformant d'intérêt a été extrait. Dans un second temps, la région NS correspondant aux nt 4203-5608 du pcDNA3-NS-WT a été clonée dans le pEX-ChikRép-DelStop à la place de la région analogue. Pour ce faire, ces plasmides ont été clivés par les enzymes PshAI et BstXI. Le plamide pEX-ChikRép-DelStop a également été restreint par SanDI afin d'augmenter la probabilité de ligation de l'insert d'intérêt dans le vecteur (Figure 24). Au final, 8 clones ont été choisis afin de vérifier, de la

même manière que précédemment, qu'ils contenaient bien la mutation recherchée. Les résultats du séquençage ont montré que 7 des 8 clones étaient positifs (87.5%). Un transformant d'intérêt a finalement été retenu afin d'en extraire l'ADN plasmidique pEX-ChikRép-WT.

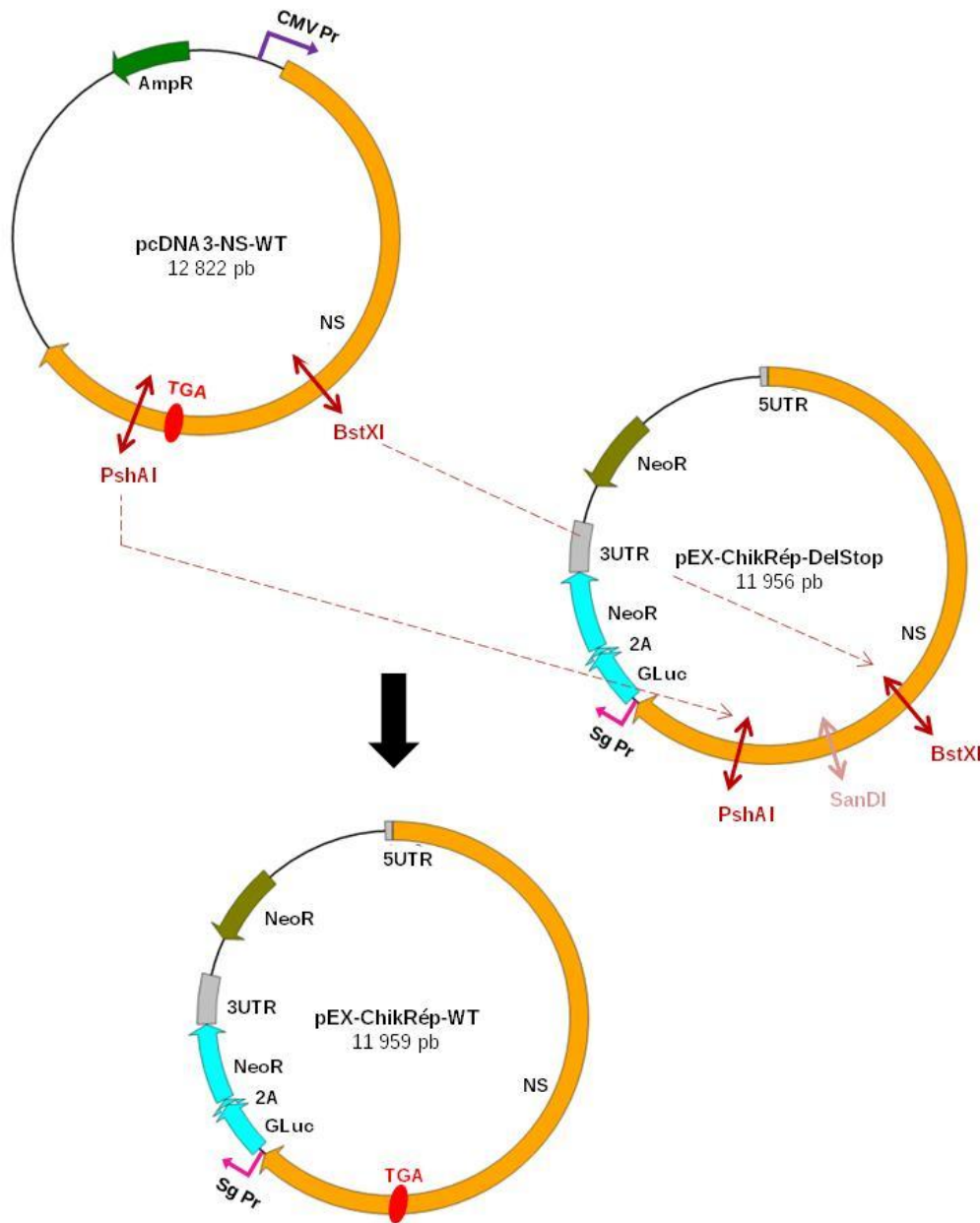


FIGURE 24 : Représentation schématique de la réaction de clonage réalisée pour la construction du pEX-ChikRép-WT.

Les plasmides utilisés et obtenus dans ce travail sont représentés sous forme de cartes plasmidiques. Les sites de restrictions représentés ici correspondent à ceux utilisés pour la réaction de clonage. L'insertion du codon stop (TGA) effectuée par mutagenèse dirigée est représentée par un ovale rouge. Les abréviations utilisées pour désigner les gènes d'intérêt sont définies dans le Tableau 2 de la partie *Matériel et Méthodes (section I-1)*.

➤ Construction des réplicons non cytotoxiques : ChikRép-NCT

En plus des deux réplicons précédemment construits, deux autres réplicons du CHIKV ont été synthétisés. En effet, conformément aux travaux réalisés par l'équipe *Pohjala et al*, une insertion de 15 nt (GGG GAG GAA GGG AGU), soit 5 aa, a été effectuée au sein du gène nsP2 (entre les nt 647 et 648) afin de réduire l'ECP décrits pour les réplicons sauvages du CHIKV. Les réplicons portant cette modification sont désignés par le terme NCT pour « non-cytotoxique ». Ainsi les deux réplicons suivants ont été construits : le ChikRép-DelStop-NCT et le ChikRép-WT-NCT (Tableau 2).

Dans un premier temps, les 15 nt ont été insérés par mutagenèse dirigée dans le pcDNA3-NS-DelStop, entre les nt 647 et 648, conformément aux différentes étapes détaillées dans le *Matériel et Méthodes (section II-6)*. La région correspondant aux nt 3042-6220 de la séquence NS (comprenant la mutation NCT) a ensuite été amplifiée par PCR sur colonies (amorces *Chik-NS3042_S* et *Chik-NS6220_AS*) puis séquencée, sur 10 des clones obtenus. Les résultats du séquençage ont montré que 2 des 10 clones testés étaient positifs puisqu'ils contenaient l'insertion de 15 nt. L'ADN plasmidique pcDNA3-NS-DelStop-NCT d'un des deux transformants d'intérêt a été extrait.

Dans un second temps, la région NS correspondant aux nt 919-5135 du pcDNA3-NS-DelStop-NCT (contenant la mutation NCT) a été clonée d'une part dans le pEX-ChikRép-DelStop et d'autre part dans le pEX-ChikRép-WT, à la place des régions correspondantes dans les deux cas (Figures 25 et 26). L'objectif était l'obtention des deux réplicons analogues dits NCT car contenant chacun l'insertion de 15 nt.

▪ Réplicon ChikRép-DelStop-NCT

Le plasmide pcDNA3-NS-DelStop-NCT a été clivé par les enzymes BamHI et BstXI mais également par l'enzyme SspI afin d'augmenter la spécificité du clonage. Pour cette même raison, en plus d'être restreint par BamHI et BstXI, le plasmide pEX-ChikRép-DelStop a été restreint par une troisième enzyme, KpnI (Figure 25). Après les étapes de ligation et de transformation bactérienne, 10 clones ont été choisis afin de vérifier de la même façon que précédemment (étapes de PCR sur colonie (*Chik-NS3042_S*, *Chik-NS6220_AS*) puis de séquençage) qu'ils contenaient bien la mutation NCT recherchée. Les résultats obtenus ont

montré que la moitié des clones choisis était positive (5/10). Un transformant d'intérêt a finalement été retenu afin d'en extraire l'ADN plasmidique pEX-ChikRép-DelStop-NCT.

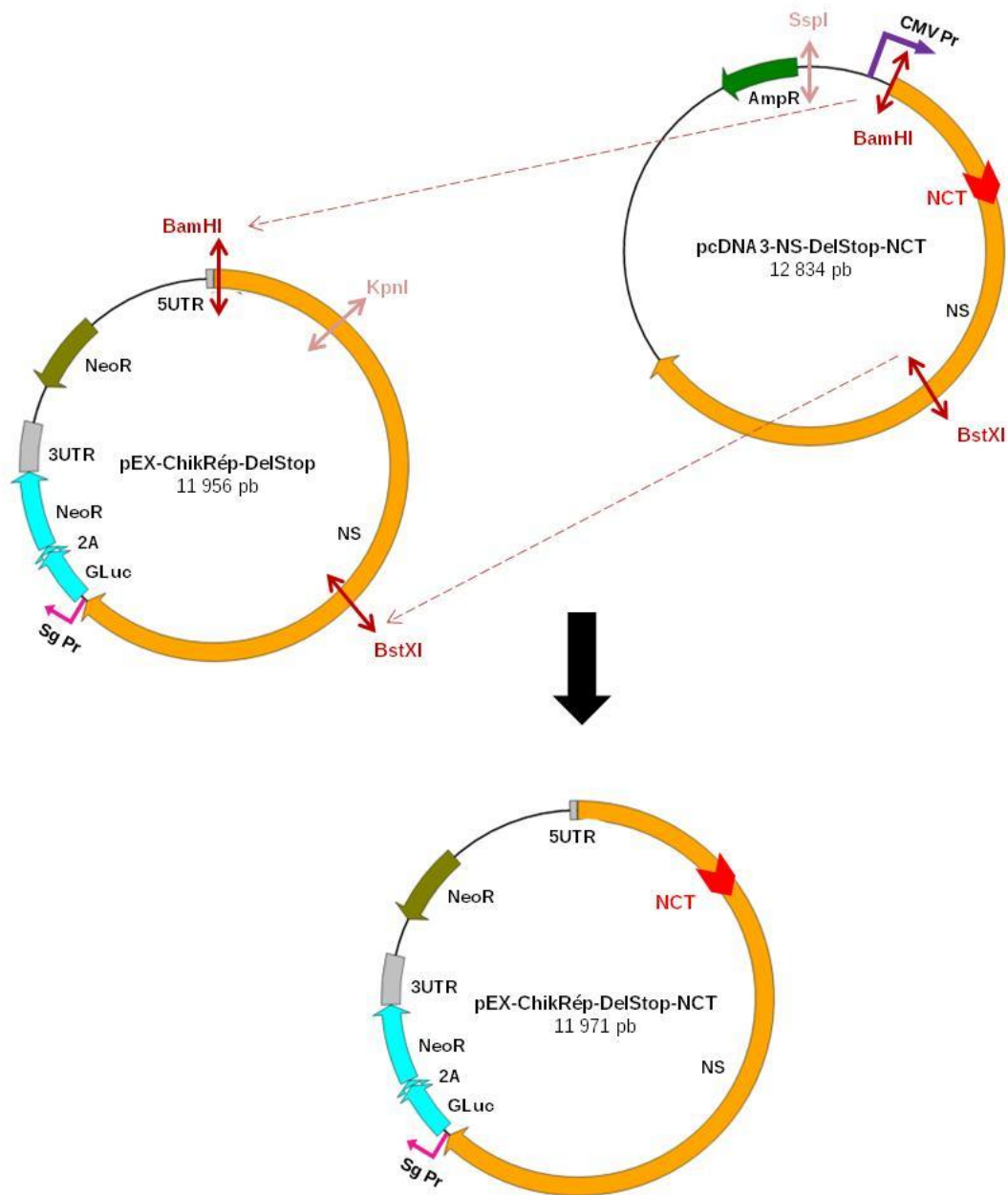


FIGURE 25 : Représentation schématique de la réaction de clonage réalisée pour la construction du pEX-ChikRép-DelStop-NCT.

Les plasmides utilisés et obtenus dans ce travail sont représentés sous forme de cartes plasmidiques. Les sites de restrictions représentés ici correspondent à ceux utilisés pour la réaction de clonage. La mutation NCT (non cytotoxique) insérée dans le gène nsP2 par mutagenèse dirigée est représentée par une flèche épaisse de couleur rouge. Les abréviations utilisées pour désigner les gènes d'intérêt sont définies dans le Tableau 2 de la partie *Matériel et Méthodes* (section I-1).

- Réplicon ChikRép-WT-NCT

De façon similaire, les plasmides pcDNA3-NS-DelStop-NCT et pEX-ChikRép-WT ont été restreints par les enzymes BamHI et BstXI. Ils ont également été clivés par une troisième enzyme, SspI pour le pcDNA3-NS-DelStop-NCT et KpnI pour le pEX-ChikRép-WT afin d'augmenter la probabilité de ligation de l'insert d'intérêt dans le vecteur (Figure 26). Au final, 10 clones ont été sélectionnés pour contrôler de façon identique que ci-avant qu'ils possédaient effectivement la mutation NCT. Les résultats obtenus indiquaient également que la moitié des clones choisis était positive (5/10). Un transformant d'intérêt a alors été réservé pour l'étape d'extraction plasmidique pEX-ChikRép-WT-NCT.

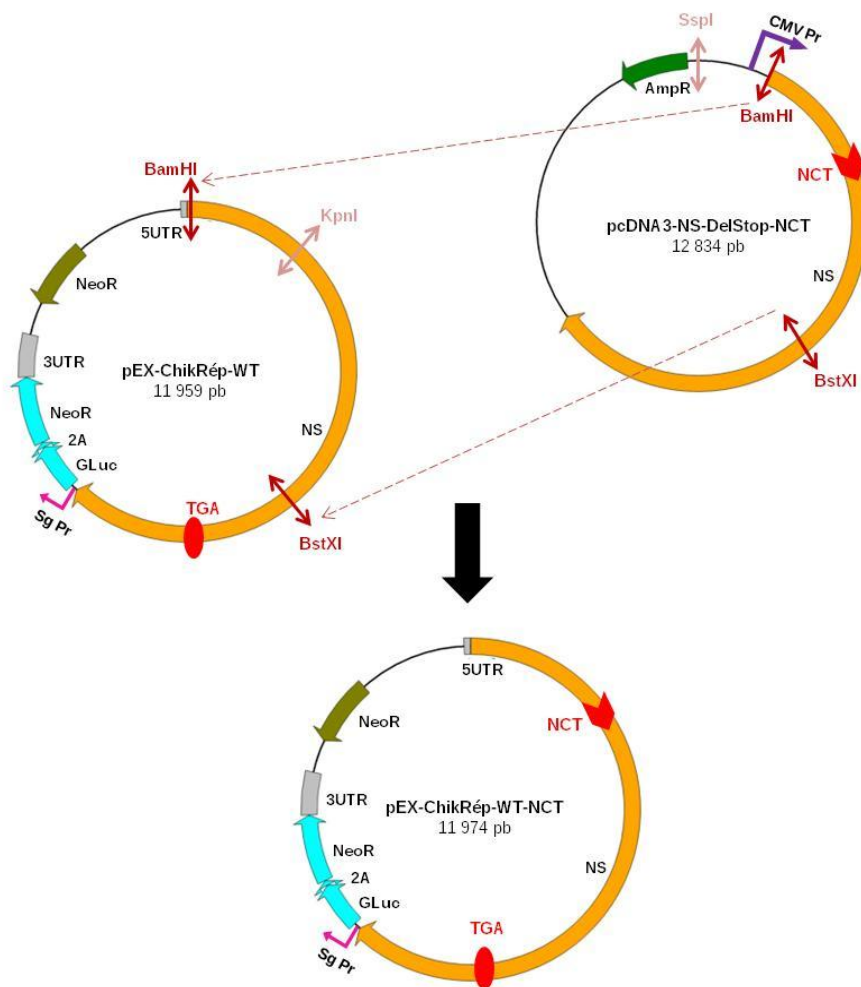


FIGURE 26 : Représentation schématique de la réaction de clonage réalisée pour la construction pEX-ChikRép-WT-NCT.

Les plasmides utilisés et obtenus dans ce travail sont représentés sous forme de cartes plasmidiques. Les sites de restrictions représentés ici correspondent à ceux utilisés pour la réaction de clonage. Le codon stop (TGA) est matérialisé par un ovale rouge. La mutation NCT (non cytotoxique) insérée dans le gène nsP2 par mutagenèse dirigée est représentée par une flèche épaisse de couleur rouge. Les abréviations utilisées pour désigner les gènes d'intérêt sont définies dans le Tableau 2 de la partie *Matériel et Méthodes (section I-1)*.

2. Production des ARN réplicons

Les matrices ADN des quatre réplicons ont été produites par PCR puis transcrites (à partir de 1 µg d'ADN matrice) selon les conditions décrites dans le *Matériel et Méthodes* (section II-8). La qualité des ARN correspondants a été vérifiée grâce au Bioanalyzer 2100 Agilent. Les électrophorégrammes, représentés en Figure 27, montrent un pic centré sur les tailles attendues de 9 410 nt pour le ChikRép-DelStop, de 9 413 nt pour le ChikRép-WT., de 9 425 nt pour le ChikRép-DelStop-NCT et de 9 428 nt pour le ChikRép-WT-NCT. Ces pics sont conformes à ce qui est attendu pour des ARN de plus de 6 000 nt, limite de séparation de la puce Nano 6 000.

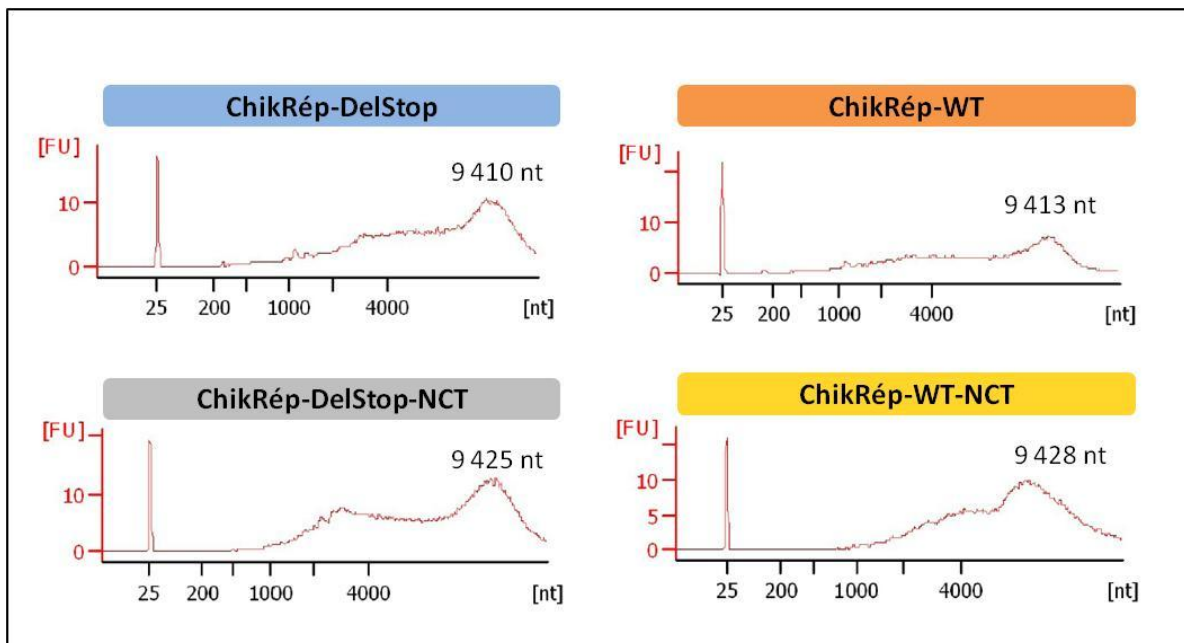


FIGURE 27: Vérification de l'intégrité des ARN réplicons.

Electrophorégrammes des ARN des réplicons ChikRép-DelStop, ChikRép-WT, ChikRép-DelStop-NCT et ChikRép-WT-NCT issus de l'analyse de 100 ng d'ARN par le Bioanalyzer 2100 Agilent. L'axe des abscisses correspond à la taille des ARN en nucléotides (nt) et l'axe des ordonnées à l'intensité de fluorescence en unité arbitraire (FU). Le niveau de fluorescence est directement proportionnel à la quantité d'ARN détectée. Le pic détecté à la taille de 25 nt correspond au contrôle interne et permet la validation de chaque puits analytique.

3. Expression des réplicons dans différents types cellulaires

Afin d'obtenir une lignée cellulaire qui réplique constitutivement un réplicon du CHIKV, des cellules ont été transfectées avec un ARN réplicon. Les réplicons synthétisés contiennent dans leur structure le gène codant la Gaussia Luciférase (GLuc) (Figure 28). Il s'agit d'une enzyme catalysant une réaction de bioluminescence. Après traduction de la polyprotéine (GLuc-2A-NeoR), la GLuc est clivée grâce à l'autoprotéase 2A du FMDV. Elle est ainsi sécrétée dans le surnageant de culture, les mesures de sa luminescence indiquent le niveau d'expression des réplicons. Trois différents types cellulaires, disponibles au laboratoire et permissifs au CHIKV, ont été étudiés. Il s'agit des cellules Huh7, des cellules Vero et des cellules Bhk-21. Lors de deux expérimentations indépendantes, ces trois types cellulaires ont été transfectés, en duplicate pour chacun des quatre ARN réplicons, dans une plaque 24 puits.

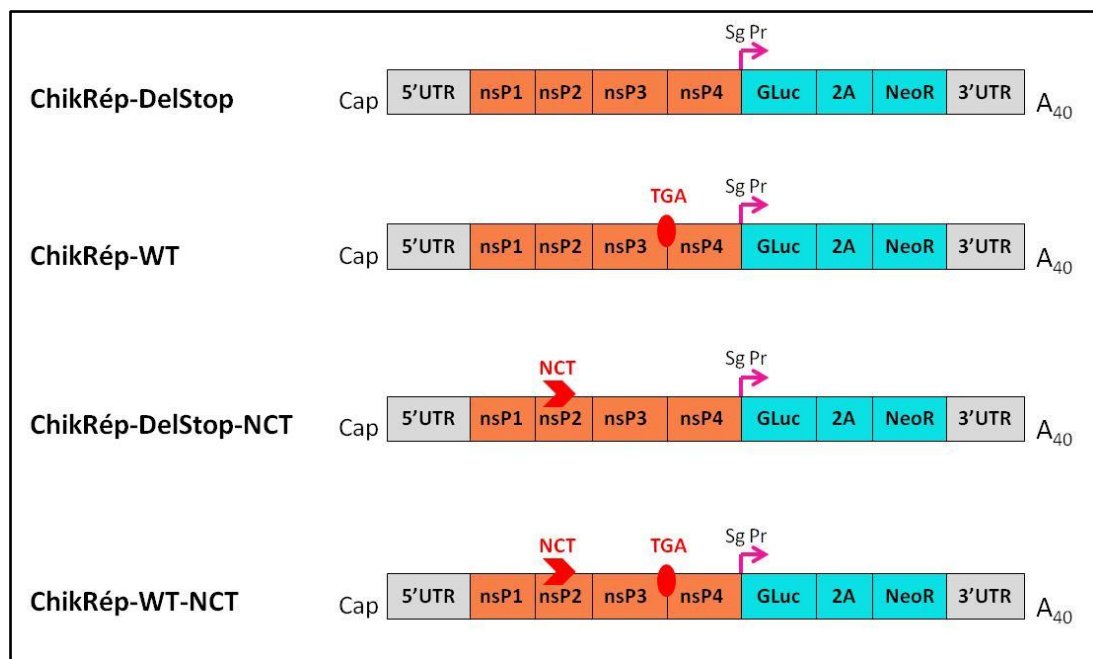


FIGURE 28 : Représentations schématiques des quatre réplicons construits.

Les abréviations utilisées pour désigner les gènes d'intérêt sont définies dans le Tableau 2 de la partie *Matériel et Méthodes* (section I-1).

Afin d'évaluer la fonctionnalité des constructions des réplicons, la production de GLuc a été mesurée dans les surnageants de culture au cours des trois premiers jours faisant suite aux transfections, c'est-à-dire à 24 h, 48 h et à 72 h post transfection. Les résultats obtenus pour l'ensemble des deux expérimentations ont montré que les quatre réplicons synthétisés ont

correctement été exprimés. En effet, une bioluminescence, et par conséquent de la GLuc, a été détectée dans les surnageants de culture, à minima à 24 h post transfection selon le type cellulaire transfecté (Figure 29). En effet, il a été défini qu'une intensité lumineuse supérieure à 6 000 RLU était considérée comme significative (les résultats de cette expérience ne sont pas présentés dans cette thèse). Ce constat nous a ainsi permis de valider les constructions réplicons effectuées.

Des différences d'expression de la GLuc et, par conséquent des différences de réplication réplicons, ont néanmoins été observées en fonction du type cellulaire transfecté.

Pour les cellules Huh7 et les cellules Vero, les cinétiques d'expression de la GLuc étaient semblables quel que soit le réplicon transfecté. L'expression de GLuc a été maximale à 24 h. Puis, après une stabilisation entre 24 et 48 h, elle a diminué à 72 h (Figures 29-A et 29-B). La diminution de la production de GLuc après 48 h pourrait correspondre à la dégradation des ARN réplicons dans les cellules transfectées non encore compensée par leur réplication.

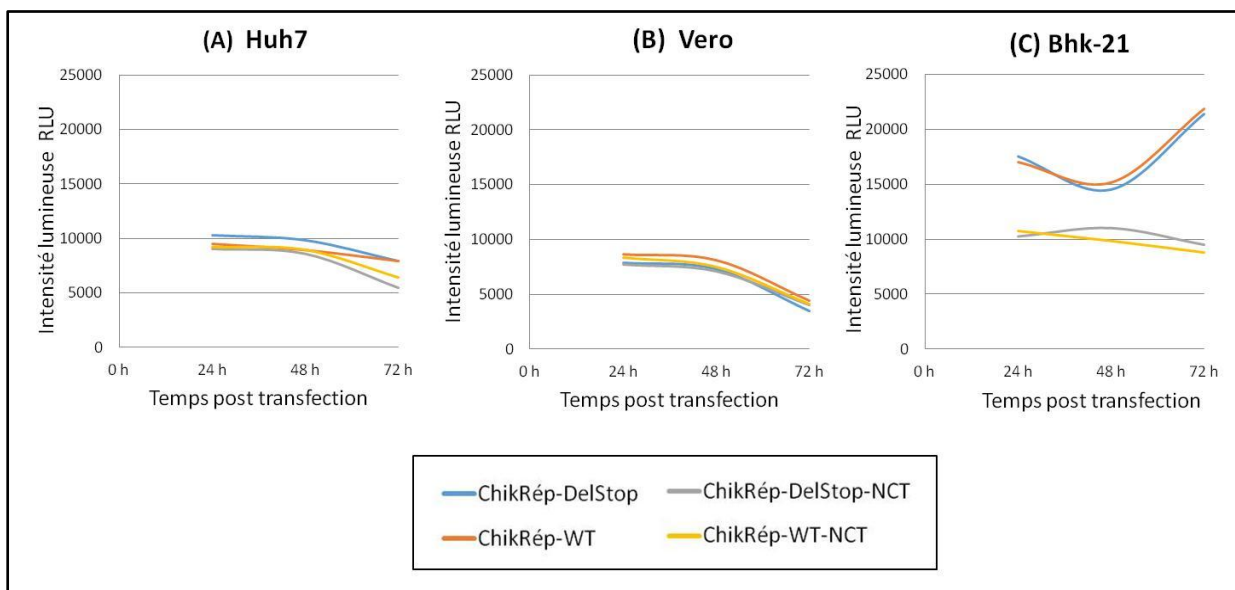


FIGURE 29 : Suivi de l'expression de la GLuc dans le surnageant des cellules Huh7 (A), des cellules Vero (B) et des cellules Bhk-21 (C) transfectées avec les réplicons.

Quatre vingt mille cellules Huh7 (A), Vero (B) ou Bhk-21 (C) ont été transfectées (plaque 24 puits) par 1 μ g d'ARN ChikRép-DelStop (bleu) ou ChikRép-WT (orange) ou ChikRép-DelStop-NCT (gris) ou ChikRép-WT-NCT (jaune). L'activité de la GLuc a été quantifiée (Varioskan Flash) sur 30 μ l de surnageant de culture prélevés à 24 h, 48 h et 72 h. Une valeur moyenne de cette activité a été calculée à partir des deux expériences indépendantes de transfection réalisées en duplicate pour chaque réplicon et chaque type cellulaire.

Pour les cellules Bhk-21, les cinétiques d'expression de la GLuc ont présenté des différences selon le type de réplicon transfecté. Pour l'analyse des résultats, les réplicons ont ainsi pu être séparés en deux groupes distincts. Les « réplicons NCT » d'une part, pour lesquels une expression relativement stable de GLuc a été observée entre 24 et 72 h (Figure 29-C), et les « réplicons non NCT » d'autre part, pour lesquels après une légère diminution entre 24 et 48 h, l'expression de GLuc a considérablement augmenté à 72 h.

A côté des nuances portant sur la cinétique d'expression des réplicons, les résultats obtenus ont également révélé des différences quant aux niveaux d'expression des réplicons selon le type cellulaire transfecté. D'une façon générale, quel que soit le type de réplicon transfecté, le niveau d'expression de la GLuc a atteint des valeurs plus élevées dans les cellules Bhk-21 que dans les cellules Huh7. Les cellules Vero ont été les cellules pour lesquelles les niveaux d'expression les plus faibles ont été observés, ceci dans les conditions expérimentales choisies.

Un parallèle peut être fait entre ces observations et les résultats obtenus lors de l'estimation des efficacités de transfection de ces trois types cellulaires. En effet, il a été montré précédemment que les cellules Bhk-21 semblaient être plus efficacement transfectées (94%) que les cellules Huh7 (42%), dans les conditions de l'expérimentation (Figure 20). Une analyse similaire a été effectuée avec les cellules Vero montrant une efficacité de transfection inférieure à celle qui a été obtenue pour les cellules Huh7 (33% vs 42%) (les résultats de cette expérience ne sont pas présentés dans cette thèse) et par conséquent également inférieure à celle des cellules Bhk-21. Il paraît ainsi logique qu'un type cellulaire ayant un rendement de transfection inférieur à un autre ait un niveau d'expression du matériel transfecté moindre.

Lors de ces expérimentations de transfection, la cytotoxicité cellulaire a été appréciée par microscopie optique. Pour cela une estimation semi quantitative du pourcentage de confluence cellulaire de chacun des puits transfecté a été effectuée à 72 h post transfection. Rappelons que la veille des transfections, les confluences cellulaires étaient similaires et estimées entre 70 et 80 %. Pour un type cellulaire donné, les quatre réplicons semblaient avoir la même cytotoxicité, au moment de l'observation. Cependant, d'importantes différences de cytotoxicité ont été constatées entre les types cellulaires étudiés. Il a été observé une forte mortalité cellulaire des cellules Bhk-21 (confluence réduite à 20-30% à 72 h), une mortalité cellulaire modérée des cellules Huh7 (confluence réduite à 50-60 % à 72 h) alors que les cellules Vero n'ont pas semblé être affectées par l'ECP des réplicons. Ces résultats pourraient

être mis en confrontation avec le fait que les cellules Vero ont à priori été très peu transfectées par les réplicons dans les conditions expérimentales définies. Les constats réalisés sur l'ECP des réplicons selon le type cellulaire étudié n'ont cependant été qu'observationnels. Il aurait été pertinent de confirmer ces observations par une analyse quantitative de la mortalité cellulaire. Malheureusement cette approche n'a pas pu être réalisée dans nos conditions expérimentales.

Du fait des résultats de ces premières séries de transfections cellulaires, il a été choisi de poursuivre les expériences de transfection des quatre réplicons avec le type cellulaire Bhk-21. En effet, les observations faites n'ont pas conduit à montrer qu'un des réplicons testés présentait un ECP moindre et par conséquent serait plus favorable à l'établissement d'une lignée cellulaire stable. De plus, malgré une importante cytotoxicité apparente, les cellules Bhk-21 semblaient être le type cellulaire testé le plus efficacement transfecté par les réplicons du CHIKV avec des niveaux d'expression de ces derniers parmi les plus importants (Tableau 4).

TABLEAU 4 : Synthèse comparative des résultats de transfection selon le type cellulaire étudié.

| Type cellulaire | Vero | Huh7 | Bhk-21 |
|------------------------------------|------|------|--------|
| Efficacité de transfection | 33% | 42% | 94% |
| Cytotoxicité | - | + | ++ |
| Intensité d'expression du réplicon | -/+ | + | + / ++ |

Trois types cellulaires ont été étudiés : les cellules Huh7, les cellules Vero et les cellules Bhk-21. L'efficacité de transfection a été estimée par mesure en cytométrie en flux du pourcentage de cellules fluorescentes (EGFP positive). Pour cela, la veille, les cellules étudiées ont été transfectées avec les ARN miniG(+) en plaque 24 puits selon le protocole de transfection précédemment détaillé (*Matériel et Méthode, section II-9 et Résultats, section III-2*). La cytotoxicité a été appréciée grâce au niveau de confluence cellulaire observé 72 h post transfection des réplicons. La notation utilisée est la suivante : (-) absence de cytotoxicité apparente (confluence maximale de 100%) ; (+) cytotoxicité modérée (confluence de 50 à 60%) et (++) cytotoxicité importante (confluence de 20 à 30%). L'intensité d'expression des réplicons a été évaluée grâce aux mesures des intensités lumineuses (proportionnelles à la quantité de GLuc). La notation utilisée est la suivante: (-/+) pour des niveaux d'expression faible à nul ; (+) pour des niveaux d'expression moyens et (+/++) pour des niveaux d'expression moyens à élevés.

4. Sélection d'une lignée cellulaire Bhk-21 exprimant un réplicon du CHIKV

Les cellules Bhk-21 ont pour les raisons précédemment évoquées été choisies pour le développement d'une lignée cellulaire stable exprimant un réplicon du CHIKV, lignée dite « Réplicon positive » (ChikRép+). Différentes conditions de transfection (quantités d'ARN et volumes de DMRIE-C) ont ainsi été testées, en plaque 24 puits, afin de déterminer les conditions optimales pour la transfection des réplicons dans ce type cellulaire. L'objectif était de travailler dans des conditions propices à l'obtention d'une lignée cellulaire ChikRép+. Pour cela le pourcentage de cellules transfectées devait être proche de 100% tout en réduisant l'effet cytotoxique initial causé par cette manipulation cellulaire. En effet, le réplicon du CHIKV étant lui-même cytotoxique, les travaux réalisés par l'équipe de *Pohjala et al* (Pohjala et al. 2011) indiquent qu'il est nécessaire de transfecter au minimum 1×10^5 cellules pour obtenir un clone ChikRép+ viable. Ainsi, la transfection de 800 ng de matériel ARN et l'utilisation de 2.1 μ l de DMRIE-C (les autres paramètres restant identiques) ont été définies comme étant les conditions de transfection optimales pour les cellules Bhk-21 en plaque 24 puits (les résultats de cette expérience ne sont pas présentés dans cette thèse). Afin d'augmenter la probabilité d'obtention d'un clone cellulaire ChikRép+, les transfections cellulaires ont été effectuées en flasque de 25 cm²ensemencées à raison de 1.5×10^6 cellules par flasque dans un volume final de 5 mL. Les quantités d'ARN réplicons transfectées ainsi que les volumes de DMRIE-C utilisés sont restés conformes à ceux définis pour travailler dans des conditions décrites comme étant optimales. Les quatre réplicons ont ainsi été transfectés, chaque type dans une flasque différente. En parallèle, un ARN témoin (VHC) ne comportant pas le gène codant la GLuc, a également été transfecté dans une cinquième flasque, servant d'expérimentation témoin. Les cellules Bhk-21 transfectées, ont ensuite été sélectionnées 48 h post transfection (J2) en présence de G418 (500 ng/ μ L) grâce au gène de résistance (NeoR) présent dans la séquence des réplicons (Figure 28). Les cellules transfectées ont été entretenues régulièrement par changement du milieu de culture et/ou ajout de l'agent de sélection. De même, les cinq flasques ont assidûment été observées microscopiquement et macroscopiquement à l'œil nu. Les principaux éléments considérés et appréciés de façon semi-quantitative étaient : la confluence cellulaire, la mortalité cellulaire, l'apparition de clones cellulaires ainsi que l'estimation de leur quantité. L'ensemble des observations effectuées est rassemblé dans le Tableau 5. Des prélèvements de surnageant des milieux de culture des cinq flasques ont été effectués à J9 et J13 post transfection afin de s'assurer de la

présence d'une expression des réplicons dans les cellules en sélection. Les résultats des intensités lumineuses mesurées sont présentés dans le Tableau 5. La GLuc étant une protéine très stable, les milieux de culture ont été changés la veille de la réalisation des prélèvements des surnageants afin de ne mesurer que la production de GLuc par les cellules viables le jour choisi.

Suite à la transfection de l'ARN témoin, le taux de mortalité des cellules Bhk-21 a rapidement atteint son maximum. Ainsi, après l'initiation du traitement au G418 (J2), la cytotoxicité a atteint son maximum dès J5 où la totalité des cellules de la flasque avait disparu. Le G418 étant un antibiotique toxique pour les cellules eucaryotes, ce résultat n'est pas apparu comme surprenant et a permis de vérifier la sensibilité des cellules étudiées à cet agent de sélection. Cela est à mettre en parallèle avec les observations qui ont été réalisées à J5 pour les quatre autres flasques. Malgré une importante mortalité cellulaire, les cellules transfectées avec les réplicons semblaient continuer à se diviser et donc résister à l'agent de sélection permettant ainsi l'obtention d'une confluence de 100% à J5. Ces résultats ont confirmé que les cellules transfectées avec les réplicons exprimaient effectivement le gène de résistance (NeoR) au G418 permettant ainsi leur sélection par cet agent. En effet, si leur résistance était secondaire à l'acquisition d'une mutation spontanée leur conférant une moindre sensibilité au G418, des résultats comparables auraient été observés en termes de mortalité cellulaire dans la flasque témoin.

Les mesures de l'activité de la GLuc effectuées à J9 et J13 ont confirmé que les réplicons étaient effectivement exprimés au sein des cellules dans lesquelles ils ont été transfectés. Alors qu'une expression de GLuc a été détectée dans les quatre flasques expérimentales (intensité lumineuse > 10 000 RLU), l'activité mesurée dans le surnageant de la flasque témoin (< 6 000 RLU) a été considérée comme non significative. Compte tenu de l'absence de cellules viables, la flasque témoin a été éliminée à J13.

TABLEAU 5 : Observations des cellules Bhk-21, au cours du protocole de sélection, selon le type d'ARN transfectés.

| | ChikRép-DelStop | ChikRép-WT | ChikRép-DelStop-NCT | ChikRép-WT-NCT | Témoin |
|--------------------|-----------------|------------|---------------------|----------------|--------|
| J0 | | | | | |
| Confluence | 70-80% | 70-80% | 70-80% | 70-80% | 70-80% |
| J5 | | | | | |
| Confluence | 100% | 100% | 100% | 100% | 0% |
| Mortalité | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ |
| J9 | | | | | |
| Confluence | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | 0% |
| Mortalité | +++ | +++ | +++ | +++ | x |
| Clones cellulaires | 10-20 | 10-20 | 10-20 | >20 | x |
| Gluc (RLU) | 55 354 | 75 116 | 52 748 | 53 769 | 5 713 |
| J13 | | | | | |
| Confluence | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | 0% |
| Mortalité | +++ | +++ | +++ | +++ | x |
| Clones cellulaires | <10 | <10 | <10 | 10-20 | x |
| Gluc (RLU) | 15 272 | 16 561 | 10 498 | 10 715 | 5 106 |
| J20 | | | | | |
| Clones cellulaires | 10-20 | ∅ | ∅ | <10 | x |
| J30 | | | | | |
| Clones cellulaires | >20 | ∅ | ∅ | ∅ | x |
| Gluc (RLU) | 30 000 | x | x | x | x |

1.5 x 10⁶ cellules Bhk-21 ont été transfectées (J0) en flasks de 25 cm² par 10.72 µg d'ARN ChikRép-DelStop ou ChikRép-WT ou ChikRép-DelStop-NCT ou ChikRép-WT-NCT ou bien d'ARN Témoin VHC. Les observations réalisées ont été rassemblées dans ce tableau. La confluence cellulaire a été estimée semi quantitativement soit en pourcentage (%), soit par une signalétique suivante : ↓ indiquant une réduction du niveau de confluence cellulaire sans que celle-ci soit appréciable en % du fait de l'organisation des cellules en amas cellulaires et non plus en tapis. La mortalité cellulaire a été appréciée semi quantitativement (+++ : mortalité très importante, ++ : mortalité importante, + : mortalité modérée, +/- : mortalité faible, - : absence de mortalité). La quantité de clones cellulaires viables a été appréciée par leur numération et la catégorisation suivante : ∅ pour absence de clone, < 10 pour moins de 10 clones, 10-20 pour 10 à 20 clones et > 20 pour plus de 20 clones. L'activité de la GLuc a été quantifiée (Varioskan Flash) sur 30 µl de surnageant de culture prélevés à J9 et J13. Une croix (x) signifie que l'observation de la flasque n'a pas été réalisée (flasque jetée) ou bien n'a pas pu l'être du fait de l'absence de cellules.

Les cellules Bhk-21 transfectées avec les réplicons ont commencé dès J9 à présenter pour certaines d'entre elles des aspects phénotypiques distincts de l'aspect classique de cellules Bhk-21 non modifiées. Ainsi, des amas, appelés clones cellulaires, ont été observés (Figure 30). Il est apparu qu'à la fois le nombre de cellules constituant un clone et la quantité de

clones dénombrés sur une flasque donnée variaient selon le jour d'observation et selon le type de réplicon transfecté. En effet, alors que des clones cellulaires viables étaient observés à J9 pour les quatre types de réplicon, ils n'ont été observés à J20 que pour les ChikRép-DelStop et ChikRép-WT-NCT puis seulement pour le ChikRép-DelStop à J30. Le protocole de sélection a conduit dans cette expérience à l'obtention de nombreux clones viables pour les cellules Bhk-21 transfectées avec le ChikRép-DelStop (J30).

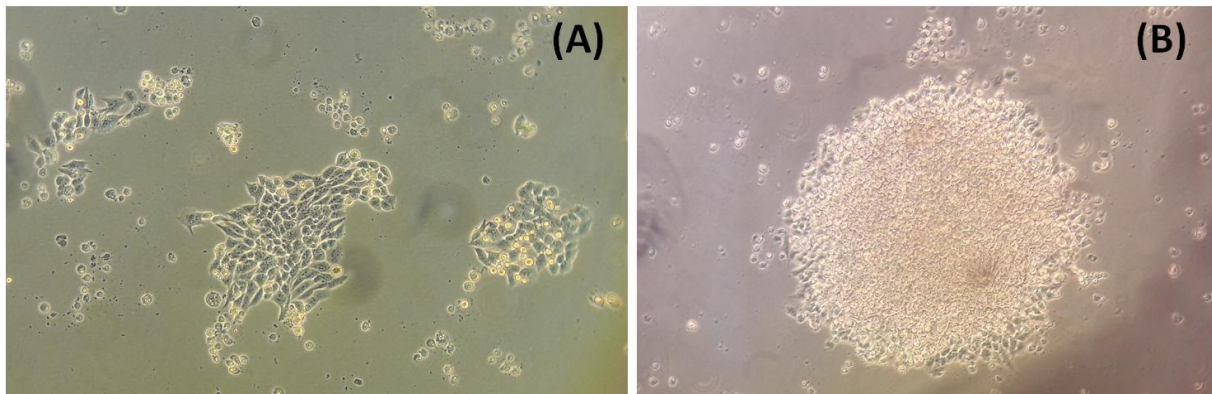


FIGURE 30 : Photographies de clones cellulaires Bhk-21 en cours de sélection.

Les images ont été prises au microscope optique inversé, au grossissement x 100. La photographie (A) a été réalisée à J9 suite à la transfection du ChikRép-DelStop. La photographie (B) a été réalisée à J20 suite à la transfection du ChikRép-DelStop.

Cette expérience visant à sélectionner une lignée cellulaire Bhk-21 ChikRép+ a été réalisée en duplicate. Les observations effectuées concernant les flasques expérimentales paraissaient quelque peu différentes à la fin du protocole de sélection. En effet, pour cette deuxième tentative, des clones ont pu être sélectionnés à la fois pour le ChikRép-DelStop mais également pour le ChikRép-WT-NCT.

La suite du protocole de sélection des clones ChikRép+ a été effectuée sur les clones cellulaires de la première expérimentation obtenus avec le ChikRép-DelStop. Les clones présents à J30 ont été dissociés grâce à l'action de la trypsine afin d'obtenir une culture cellulaire ChikRép+ confluente. Des prélèvements additionnels de surnageant du milieu de culture ont été effectués à J31, J32 et J33 dans le but de vérifier que les cellules en développement exprimaient le réplicon. Les intensités lumineuses mesurées (J31 : 33 000 RLU, J32 : 110 240 RLU et J33 : 230 000 RLU) ont confirmé l'expression du réplicon du CHIKV au sein des cellules en culture. L'obtention d'une culture cellulaire ChikRép+

confluente à J33 a permis la congélation dans l'azote liquide (-196°C) de la lignée Bhk-21 ChikRép+ sélectionnée.

5. Isolement de clones cellulaires exprimant un réplicon du CHIKV

Une lignée cellulaire Bhk-21 exprimant un réplicon du CHIKV a été sélectionnée. Cette lignée était hétérogène puisqu'elle se composait de plusieurs clones initiaux. L'objectif consistait donc à isoler certains clones cellulaires Bhk-21 ChikRép+ en vue de leur analyse ultérieure par séquençage. Un clonage cellulaire a donc été réalisé sur une culture de la lignée Bhk-21 ChikRép+ en flasque de 25 cm². Ainsi, des cellules Bhk-21 ChikRép+ ont été déposées dans une plaque 96 puits à raison d'une seule cellule par puits. L'ajout du milieu de culture standard (DMEM supplémenté avec 10% de SVF) a ensuite permis leur amplification par divisions cellulaires. Afin de simplifier les manipulations, seulement six des futurs clones en division ont été conservés et régulièrement entretenus (changement du milieu de culture et/ou ajout de G418) jusqu'à ce qu'ils atteignent un stade de développement suffisant. Un prélèvement de surnageant du milieu de culture a été effectué (J11) pour chacun des six clones maintenus afin de vérifier l'expression du réplicon dans ces derniers. Les résultats des intensités lumineuses mesurées (Tableau 6) ont confirmé que les clones cellulaires en cours d'expansion exprimaient la GLuc et par conséquent hébergeaient le réplicon du CHIKV.

Après un développement suffisant, une extraction des ARN cellulaires a été effectuée pour chacun des six clones matures. La qualité des ARN extraits a été vérifiée par électrophorèse capillaire grâce au Bioanalyzer 2100 Agilent. Chacun des clones a finalement été congelé dans l'azote liquide (-196°C).

TABLEAU 6 : Mesure de l'activité de la Gaussia Luciférase dans les surnageants de culture des clones cellulaires Bhk-21 en développement.

| Clone cellulaire | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|
| Intensité lumineuse (RLU) | 7 199 | 19 156 | 6 738 | 27 696 | 10 649 | 73 404 |

L'activité de la GLuc a été quantifiée (Varioskan Flash) sur 30 µl de surnageant de culture, prélevés à J11, de chaque clone cellulaire Bhk-21 ChikRép+ en cours d'expansion.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le CHIK est, à ce jour, une arbovirose en réémergence dans le monde. Des zones non touchées jusque là ont récemment été la cible d'épidémies de grandes ampleurs. Les mutations possibles du virus, les différents génotypes, les changements climatiques, le contexte politique (guerre, mondialisation, ...) ainsi que les réservoirs du virus difficilement maîtrisables sont autant de facteurs rendant le contrôle de la dissémination du CHIKV délicate. De plus, l'existence du vecteur *Ae. albopictus* dans plusieurs zones tempérées du monde ainsi que l'augmentation constante du nombre de voyageurs internationaux laissent penser que d'autres épidémies de CHIK pourraient survenir dans ces régions à l'instar de celle qui a eu lieu en Italie en 2007. Les récentes épidémies du 21^{ème} siècle ont permis de replacer dans l'actualité une maladie jusque-là considérée comme bénigne, d'une part au travers de son ampleur lors de sa survenue dans des populations immunologiquement naïves, et d'autre part, par la mise en évidence de formes sévères et parfois létales, mais également par l'observation d'un « nouveau » mode de transmission du virus (transmission verticale mère-enfant). Ces différents aspects imposent la poursuite des travaux de recherche sur le CHIKV et une vigilance particulière à tous les niveaux de la chaîne sanitaire, d'autant qu'à ce jour, ni traitement antiviral efficace ni vaccin ne sont disponibles.

C'est dans ce contexte que s'est inscrite la thématique de ma thèse d'exercice. L'objectif des travaux de recherche consistait à mettre en place un système cellulaire non infectieux pour l'étude de la réplication du CHIKV. Une des approches développée dans ce projet s'est avérée concluante et a conduit à l'obtention de plusieurs clones cellulaires exprimant de façon stable un réplicon du CHIKV, comprenant un marqueur de sélection NeoR et un marqueur de détection GLuc. Des lignées cellulaires Bhk-21 ChikRép+ correspondantes, se développant aussi vite que la lignée cellulaire Bhk-21 native et exprimant des niveaux élevés de GLuc, ont ainsi pu être isolées. La GLuc est une protéine luminescente sécrétée dans le surnageant de culture cellulaire, son activité reflétant le niveau de réplication du réplicon du CHIKV. Ce dernier est donc un outil adapté aux tests de criblage de molécules inhibitrices de la réplication virale, et ceci même à grande échelle dans des tests à haut débit.

Un réplicon du CHIKV, développé par l'équipe de *Pohjala et al*, a précédemment été décrit dans la littérature fin 2011 (Pohjala et al. 2011). A la différence du réplicon construit ici, ce

premier réplicon comprend comme marqueur de détection, une molécule localisée au niveau cytoplasmique, l'EGFP. Le suivi de son expression, par microscopie à fluorescence ou par cytométrie de flux par exemple, rend ce modèle plus difficilement manipulable dans le cas de tests à haut débit. Il est donc difficilement adaptable à un usage industriel. L'équipe de recherche dispose donc, à ce jour, d'un outil d'étude sécurisé et efficace permettant aussi bien l'exploration de la réplication virale que le criblage d'inhibiteurs potentiels de la réplication du CHIKV (Dumas et al. 2007; Gläsker et al. 2013).

Bien que les minigénomes du CHIKV aient été construits avec succès lors de ce travail, l'approche consistant à révéler une activité répliquative grâce à leur utilisation s'est avérée infructueuse. En effet que ce soit dans la lignée cellulaire Huh7/NS-DelStop (*Résultats – Partie II*) ou bien lors des expériences de transfection simultanée utilisant un ARN NS-DelStop (*Résultats – Partie III*), les minigénomes n'ont pas permis la détection d'une activité répliquative. L'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer l'absence de réplication des minigénomes est probablement le défaut d'expression des protéines NS et, par conséquent, d'un CR viral fonctionnel dans les cellules étudiées. Compte tenu de l'absence d'anticorps spécifiques dirigés notamment contre la protéine nsP4, nous n'avons pas pu conclure définitivement quant à l'absence effective du CR viral lors des expérimentations des parties *II* et *III* du chapitre *Résultats*. Néanmoins, la modification de la séquence codant les protéines NS, utilisée dans ce travail, pourrait en partie expliquer l'absence, *in cellulo*, d'un CR fonctionnel. Effectivement, le codon stop opale initialement présent entre les gènes nsP3 et nsP4 a été délété afin d'optimiser la traduction de la polymérase virale (nsP4) du CHIKV. Cependant, d'après des travaux réalisés sur le SINV, virus apparenté au CHIKV, la présence de ce codon stop jouerait un rôle majeur dans la régulation du cycle répliquatif viral (J. H. Strauss et Strauss 1994). Ainsi, sa délétion ne serait pas associée à une augmentation de production de la polymérase virale mais, à l'inverse, cette modification aurait un effet délétère sur les étapes précoces du cycle répliquatif viral en diminuant la quantité de CR fonctionnel (G. P. Li et Rice 1989; Y. Shirako et Strauss 1994). Des travaux analogues n'ont, à ce jour, pas été effectués sur le CHIKV. La vérification de ces données pour le CHIKV serait pertinente pour l'analyse de nos résultats. De même, il pourrait être envisagé de réitérer les expérimentations des parties *II* et *III* mais, cette fois ci, sans délétion du codon stop au sein de la séquence NS.

Lors de l'analyse des résultats des deux premières approches (*Parties II et III*), une seconde hypothèse a été envisagée concernant l'absence d'activité répliquative apparente. Ainsi il a été

suggéré que les séquences virales du minigénome (5'UTR et 3'UTR) pourraient ne pas être suffisantes pour le recrutement du CR. Néanmoins, les travaux effectués sur un virus apparenté servant de modèle d'étude au genre Alphavirus, le SINV, semblent réfuter cette seconde théorie. En effet, d'après ces travaux, seules les séquences nucléotidiques conservées non codantes 5'UTR et 3'UTR du génome viral sembleraient être indispensables à la réplication de l'ARN génomique viral dans les cellules vertébrées (Atkins, Fleeton, et Sheahan 2008; Hyde et al. 2015). Ainsi, en se basant sur ces données, les minigénomes construits dans ce travail devraient être efficacement répliqués par le CR viral, à condition que ce dernier soit effectivement présent et fonctionnel. Ces réflexions mettent en avant l'intérêt de l'utilisation des minigénomes pour identifier précisément chez le CHIKV les régions génomiques impliquées dans le recrutement du CR puisque dans un tel modèle les étapes de réplication des ARN minigénomes viraux n'impactent pas la synthèse du CR viral.

La troisième approche (*Résultats - Partie IV*), consistant à exprimer les protéines NS par l'intermédiaire d'un réplicon du virus, a conduit à la sélection de clones cellulaires Bhk-21 ChikRép+. Ainsi, les lignées cellulaires correspondantes, exprimant durablement un réplicon du CHIKV et par conséquent le CR viral fonctionnel, ont pu être isolées. Compte tenu du fort ECP connu du CHIKV sauvage, des modifications, décrites dans cette thèse, ont été réalisées et ont ainsi conduit à la construction de quatre réplicons. En effet, les alphavirus sauvages provoquent une infection aiguë caractérisée par un ECP responsable, rapidement (24 h post-infection), d'une diminution sévère de la viabilité des cellules hôtes vertébrées (I Frolov et Schlesinger 1994). Dans le cas des alphavirus de l'Ancien Monde, cet ECP serait induit, au moins en partie, par la protéine nsP2 qui provoquerait une inhibition de la transcription de gènes de la cellule hôte par une interaction non identifiée avec des facteurs cellulaires (Garmashova et al. 2006; Fros et al. 2013). Ainsi, des réplicons sauvages d'alphavirus de l'Ancien Monde et donc du CHIKV ne peuvent pas être utilisés pour générer des lignées cellulaires stables. Pour atteindre cet objectif, il est donc nécessaire d'effectuer des modifications notamment dans la séquence nsP2 afin de réduire la cytotoxicité du réplicon vis-à-vis des cellules hôtes. Ainsi une mutation ponctuelle unique (Pro718→Gly) et, pour deux des quatre réplicons construits dans ce travail, une insertion de cinq acides aminés au sein de la séquence nsP2 ont été effectuées (Pohjala et al. 2011; Utt et al. 2014). Afin d'essayer d'élucider, au moins en partie, le rôle du codon stop présent entre nsP3 et nsP4 chez le virus sauvage, le codon opale a été délété dans la construction de deux des réplicons. Les observations ainsi que les données collectées au cours des expériences de transfection

cellulaire n'ont cependant pas permis de mettre en évidence qu'un des réplicons testés présentait initialement un ECP moindre et par conséquent était plus favorable à l'établissement d'une lignée cellulaire stable. De plus, les expériences de transfection des cellules Bhk-21 ont été réalisées en duplicate, pour les quatre réplicons, et ont conduit à des résultats de sélection hétérogènes. Lors du protocole de sélection cellulaire, les réplicons seraient sujets à l'acquisition aléatoire de mutations adaptatives afin de pouvoir persister durablement au sein des cellules dans lesquelles ils ont été transfectés. C'est probablement pour cette raison que des résultats non strictement identiques entre les deux expériences de transfection ont pu être constatés. Le délai observé entre l'initiation du protocole de sélection (J2 post transfection) et l'obtention de clones cellulaires ChikRép+ stables (J30) correspondrait ainsi au temps nécessaire à l'adaptation des futurs clones cellulaires à leur environnement. Ainsi, six lignées cellulaires ChikRép+ ont été isolées en vue de l'analyse par séquençage des possibles mutations adaptatives sélectionnées. Cette étude de la diversité des séquences des réplicons n'a, au jour d'aujourd'hui, pas encore pu être réalisée. Une des perspectives de ce travail serait d'identifier les principales mutations adaptatives dans la séquence des réplicons sélectionnés et de les comparer avec celles déjà connues dans la littérature (Utt et al. 2014). Ces mutations adaptatives sont probablement associées à un phénotype de moindre cytotoxicité envers les cellules Bhk-21 puisqu'elles ont conduit à l'obtention de lignées cellulaires ChikRép+ stables. Il conviendra ensuite de vérifier cette hypothétique relation entre la présence des mutations identifiées et la réduction de l'ECP. Pour cela la construction d'un réplicon portant la (ou les) mutation(s) étudiée(s) devra être effectuée, suivi de sa transfection cellulaire puis de sa sélection. La sélection de clones cellulaires ChikRép+ stables devrait alors être plus rapide avec une mortalité cellulaire moindre. Des essais de transfection ont également été entrepris dans un type cellulaire humain pouvant être la cible du CHIKV lors de l'infection humaine, les cellules Huh7. Cependant, l'important ECP observé envers ce type cellulaire n'a à ce jour pas permis l'établissement d'une lignée cellulaire Huh7 stable ChikRép+. L'identification de mutations adaptatives associé à un phénotype non cytotoxique pourrait ainsi nous permettre de développer un réplicon adapté et donc capable d'une réplication persistante dans des cellules humaines telles que les cellules Huh7.

D'autre part, la présence d'un CR fonctionnel dans les lignées cellulaires développées permettra de réévaluer le modèle des minigénomés afin d'étudier les mécanismes fondamentaux de la réplication du CHIKV.

En conclusion, ces travaux de recherche m'ont permis de mettre en place une lignée cellulaire stable hébergeant un réplicon du CHIKV. Cet outil, biosécurisé et facile de manipulation, doit permettre au laboratoire d'analyser plus finement les mécanismes de la réplication du virus. Par ailleurs il pourra être utilisé pour le criblage d'inhibiteurs potentiels de la réplication du CHIKV, en particulier en utilisant les chimiothèques : la « Prestwick Chemical Library® (FDA approved) – 1200 composés» et la « Prestwick Phytochemical Library – 320 composés » disponible par la FR Transbiomed à l'Université de Bordeaux.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdelnabi, Rana, Johan Neyts, et Leen Delang. 2015. « Towards Antivirals against Chikungunya Virus ». *Antiviral Research* 121 (septembre): 59-68. doi:10.1016/j.antiviral.2015.06.017.
- AbuBakar, Sazaly, I-Ching Sam, Pooi-Fong Wong, Poh-Sim Hooi, et Nuruliza Roslan. 2007. « Reemergence of Endemic Chikungunya, Malaysia ». *Emerging Infectious Diseases* 13 (1): 147-49. doi:10.3201/eid1301.060617.
- Acharya, Dhiraj, Amber M. Paul, John F. Anderson, Faqing Huang, et Fengwei Bai. 2015. « Loss of Glycosaminoglycan Receptor Binding after Mosquito Cell Passage Reduces Chikungunya Virus Infectivity ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (10). doi:10.1371/journal.pntd.0004139.
- Adhami, J., et P. Reiter. 1998. « Introduction and Establishment of Aedes (Stegomyia) Albopictus Skuse (Diptera: Culicidae) in Albania ». *Journal of the American Mosquito Control Association* 14 (3): 340-43.
- Ahola, T, A Lampio, P Auvinen, et L Kääriäinen. 1999. « Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. » *The EMBO Journal* 18 (11): 3164-72. doi:10.1093/emboj/18.11.3164.
- Aikat, B. K. 1966. « Pathology of mosquito-borne haemorrhagic fever in the Calcutta outbreak ». *Bulletin of the World Health Organization* 35 (1): 48-49.
- Ali Ou Alla, Sanae, et Bernard Combe. 2011. « Arthritis after infection with Chikungunya virus ». *Best Practice & Research Clinical Rheumatology, Infections and Musculoskeletal Conditions*, 25 (3): 337-46. doi:10.1016/j.berh.2011.03.005.
- Apandi, Y., W. A. Nazni, Z. A. Noor Azleen, I. Vythilingam, M. Y. Noorazian, A. H. Azahari, S. Zainah, et H. L. Lee. 2009. « The first isolation of Chikungunya virus from non-human primates in Malaysia ». *ResearchGate* 1 (novembre): 35-39.
- Arankalle, Vidya A., Shubham Shrivastava, Sarah Cherian, Rashmi S. Gunjekar, Atul M. Walimbe, Santosh M. Jadhav, A. B. Sudeep, et Akhilesh C. Mishra. 2007. « Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963–2006) with special reference to the 2005–2006 explosive epidemic ». *Journal of General Virology* 88 (7): 1967-76. doi:10.1099/vir.0.82714-0.
- Arias-Goeta, Camilo, Laurence Mousson, François Rougeon, et Anna-Bella Failloux. 2013. « Dissemination and Transmission of the E1-226V Variant of Chikungunya Virus in Aedes albopictus Are Controlled at the Midgut Barrier Level ». *PLoS ONE* 8 (2). doi:10.1371/journal.pone.0057548.
- Atkins, Gregory J., Marina N. Fleeton, et Brian J. Sheahan. 2008. « Therapeutic and prophylactic applications of alphavirus vectors ». *Expert Reviews in Molecular Medicine* 10 (novembre). doi:10.1017/S1462399408000859.
- Aubry, Maite, Anita Teissier, Claudine Roche, Vaea Richard, Aurore Shan Yan, Karen Zisou, Eline Rouault, et al. 2015. « Chikungunya Outbreak, French Polynesia, 2014 ». *Emerging Infectious Diseases* 21 (4): 724-26. doi:10.3201/eid2104.141741.
- Baltimore, D. 1971. « Expression of animal virus genomes. » *Bacteriological Reviews* 35 (3): 235-41.
- Bhatt, Samir, Peter W. Gething, Oliver J. Brady, Jane P. Messina, Andrew W. Farlow, Catherine L. Moyes, John M. Drake, et al. 2013. « The global distribution and burden of dengue ». *Nature* 496 (7446): 504-7. doi:10.1038/nature12060.
- Bonizzoni, Mariangela, Giuliano Gasperi, Xioaguang Chen, et Anthony A. James. 2013. « The invasive mosquito species Aedes albopictus: current knowledge and future perspectives ». *Trends in parasitology* 29 (9): 460-68. doi:10.1016/j.pt.2013.07.003.
- Borgherini, Gianandrea, Patrice Poubeau, Annie Jossaume, Arnaud Gouix, Liliane Cotte, Alain Michault, Claude Arvin-Berod, et Fabrice Paganin. 2008. « Persistent Arthralgia Associated with Chikungunya Virus: A Study of 88 Adult Patients on Reunion Island ». *Clinical Infectious Diseases* 47 (4): 469-75. doi:10.1086/590003.
- Bottieau, E., M. Van Esbroeck, L. Cnops, J. Clerinx, et A. Van Gompel. 2009. « Chikungunya Infection Confirmed in a Belgian Traveller Returning from Phuket (Thailand) ». *Euro Surveillace: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 14 (25).
- Bracco, José Eduardo, Margareth Lara Capurro, Ricardo Lourenço-de-Oliveira, et Maria Anice Mureb Sallum. 2007. « Genetic variability of Aedes aegypti in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions ». *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (5): 573-80. doi:10.1590/S0074-02762007005000062.

- Brighton, S. W., O. W. Prozesky, et A. L. de la Harpe. 1983. « Chikungunya Virus Infection. A Retrospective Study of 107 Cases ». *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde* 63 (9): 313-15.
- Brown, Julia E., Benjamin R. Evans, Wei Zheng, Vanessa Obas, Laura Barrera-Martinez, Andrea Egizi, Hongyu Zhao, Adalgisa Caccone, et Jeffrey R. Powell. 2014. « Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito ». *Evolution; international journal of organic evolution* 68 (2): 514-25. doi:10.1111/evo.12281.
- Burt, Felicity J, Micheal S Rolph, Nestor E Rulli, Suresh Mahalingam, et Mark T Heise. 2012. « Chikungunya: a re-emerging virus ». *The Lancet* 379 (9816): 662-71. doi:10.1016/S0140-6736(11)60281-X.
- Carey, D. E. 1971. « Chikungunya and Dengue: A Case of Mistaken Identity? » *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* 26 (3): 243-62.
- Carmona, Raj J., Saeed Shaikh, et Nader A. Khalidi. 2008. « Chikungunya Viral Polyarthritits. » *The Journal of Rheumatology* 35 (5): 935-36.
- Chan, K. L., Y. C. Chan, et B. C. Ho. 1971. « *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) in Singapore City ». *Bulletin of the World Health Organization* 44 (5): 643-49.
- Chang, Kyeong-Ok, Stanislav V. Sosnovtsev, Gaël Belliot, Adriene D. King, et Kim Y. Green. 2006. « Stable expression of a Norwalk virus RNA replicon in a human hepatoma cell line ». *Virology* 353 (2): 463-73. doi:10.1016/j.virol.2006.06.006.
- Cheng, R. Holland, Richard J. Kuhn, Norman H. Olson, Michael G. Rossmann, Hok-Kin Choi, Thomas J. Smith, et Timothy S. Baker. 1995. « Nucleocapsid and Glycoprotein Organization in an Enveloped Virus ». *Cell* 80 (4): 621-30.
- Chevillon, Christine, Laurence Briant, François Renaud, et Christian Devaux. 2008. « The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective ». *Trends in Microbiology* 16 (2): 80-88. doi:10.1016/j.tim.2007.12.003.
- « Chikungunya Virus Strain LR2006_OPY1, Complete Genome ». 2015, septembre. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KT449801.1>.
- Coffey, Lark L., Anna-Bella Failloux, et Scott C. Weaver. 2014. « Chikungunya Virus-Vector Interactions ». *Viruses* 6 (11): 4628-63. doi:10.3390/v6114628.
- Couderc, Thérèse, Fabrice Chrétien, Clémentine Schilte, Olivier Disson, Madly Brigitte, Florence Guivel-Benhassine, Yasmina Touret, et al. 2008. « A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease ». *PLoS Pathogens* 4 (2). doi:10.1371/journal.ppat.0040029.
- Couderc, Thérèse, et Marc Lecuit. 2015. « Chikungunya virus pathogenesis: From bedside to bench ». *Antiviral Research* 121 (septembre): 120-31. doi:10.1016/j.antiviral.2015.07.002.
- Crosby, Laura, Caroline Perreau, Benjamin Madeux, Jeanne Cossic, Christophe Armand, Cécile Herrmann-Storke, Fatiha Najioullah, Ruddy Valentino, et Guillaume Thiéry. 2016. « Severe Manifestations of Chikungunya Virus in Critically Ill Patients during the 2013-2014 Caribbean Outbreak ». *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, mai. doi:10.1016/j.ijid.2016.05.010.
- Davis, Jack L., Howard M. Hodge, et William E. Campbell. 1971. « Growth of Chikungunya Virus in Baby Hamster Kidney Cell (BHK-21-Clone 13) Suspension Cultures ». *Applied Microbiology* 21 (2): 338-41.
- De Tomassi, Amedeo, Maura Pizzuti, Rita Graziani, Andrea Sbardellati, Sergio Altamura, Giacomo Paonessa, et Cinzia Traboni. 2002. « Cell Clones Selected from the Huh7 Human Hepatoma Cell Line Support Efficient Replication of a Subgenomic GB Virus B Replicon ». *Journal of Virology* 76 (15): 7736-46. doi:10.1128/JVI.76.15.7736-7746.2002.
- Delatte, Helene, Amelie Desvars, Anthony Bouétard, Séverine Bord, Geoffrey Gimonneau, Gwenaël Vourc'h, et Didier Fontenille. 2009. « Blood-Feeding Behavior of *Aedes albopictus*, a Vector of Chikungunya on La Réunion ». *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 10 (3): 249-58. doi:10.1089/vbz.2009.0026.
- Delaunay, P., C. Jeannin, F. Schaffner, et P. Marty. 2009. « [News on the presence of the tiger mosquito *Aedes albopictus* in metropolitan France] ». *Archives De Pédiatrie: Organe Officiel De La Société Française De Pédiatrie* 16 Suppl 2 (octobre): S66-71. doi:10.1016/S0929-693X(09)75304-7.
- Delisle, E., C. Rousseau, B. Broche, I. Leparac-Goffart, G. L'Ambert, A. Cochet, C. Prat, et al. 2015. « Chikungunya Outbreak in Montpellier, France, September to October 2014 ». *Euro Surveillace: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 20 (17).
- Deller, Lt Col John J., et Lt Col Philip K. Russell. 1968. « Chikungunya Disease ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 17 (1): 107-11.

- DeTulleo, L., et T Kirchhausen. 1998. « The clathrin endocytic pathway in viral infection. » *The EMBO Journal* 17 (16): 4585-93. doi:10.1093/emboj/17.16.4585.
- Devaux, Christian A. 2012. « Emerging and re-emerging viruses: A global challenge illustrated by Chikungunya virus outbreaks ». *World Journal of Virology* 1 (1): 11-22. doi:10.5501/wjv.v1.i1.11.
- Diallo, M., J. Thonnon, M. Traore-Lamizana, et D. Fontenille. 1999. « Vectors of Chikungunya Virus in Senegal: Current Data and Transmission Cycles. » *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60 (2): 281-86.
- Dogan, Ayse Dudu Altintas, Kristin Bunes, et Sigurdur Skarphédinsson. 2013. « [The tropical disease Chikungunya fever has come to Europe] ». *Ugeskrift for Laeger* 175 (24): 1716-19.
- Dryga, S. A., O. A. Dryga, et S. Schlesinger. 1997. « Identification of Mutations in a Sindbis Virus Variant Able to Establish Persistent Infection in BHK Cells: The Importance of a Mutation in the nsP2 Gene ». *Virology* 228 (1): 74-83. doi:10.1006/viro.1996.8364.
- Duijl-Richter, Mareike K. S. van, Tabitha E. Hoornweg, Izabela A. Rodenhuis-Zybert, et Jolanda M. Smit. 2015. « Early Events in Chikungunya Virus Infection—From Virus Cell Binding to Membrane Fusion ». *Viruses* 7 (7): 3647-74. doi:10.3390/v7072792.
- Dumas, E., C. Masante, T. Astier-Gin, D. Lapaillerie, et M. Ventura. 2007. « The Hepatitis C Virus Minigenome: A New Cellular Model for Studying Viral Replication ». *Journal of Virological Methods* 142 (1-2): 59-66. doi:10.1016/j.jviromet.2007.01.005.
- Dupont-Rouzeyrol, Myrielle, Valérie Caro, Laurent Guillaumot, Marie Vazeille, Eric D'Ortenzio, Jean-Michel Thiberge, Noémie Baroux, Ann-Claire Gourinat, Marc Grandadam, et Anna-Bella Failloux. 2012. « Chikungunya Virus and the Mosquito Vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific Region) ». *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 12 (12): 1036-41. doi:10.1089/vbz.2011.0937.
- Enserink, Martin. 2006. « Massive Outbreak Draws Fresh Attention to Little-Known Virus ». *Science* 311 (5764): 1085-1085. doi:10.1126/science.311.5764.1085a.
- Ernould, S., H. Walters, J. -L. Alessandri, B. Llanas, M. -C. Jaffar, S. Robin, T. Attali, D. Ramful, et J. -C. Combes. 2008. « Aspects pédiatriques de l'épidémie de Chikungunya à l'île de la Réunion ». *Archives de Pédiatrie* 15 (3): 253-62. doi:10.1016/j.arcped.2007.10.019.
- Failloux, A. B., F. Fouque, M. Vazeille, et F. Rodhain. 2002. « Isoenzyme Differentiation of *Aedes Aegypti* Populations in French Guiana ». *Medical and Veterinary Entomology* 16 (4): 456-60.
- Fongsaran, Chanida, Krit Jirakanwisal, Atichat Kuadkitkan, Nitwara Wikan, Phitchayapak Wintachai, Chutima Thepparit, Sukathida Ubol, Narumon Phaonakrop, Sittiruk Roytrakul, et Duncan R. Smith. 2014. « Involvement of ATP Synthase β Subunit in Chikungunya Virus Entry into Insect Cells ». *Archives of Virology* 159 (12): 3353-64. doi:10.1007/s00705-014-2210-4.
- Forrester, N. L., G. Palacios, R. B. Tesh, N. Savji, H. Guzman, M. Sherman, S. C. Weaver, et W. I. Lipkin. 2012. « Genome-Scale Phylogeny of the Alphavirus Genus Suggests a Marine Origin ». *Journal of Virology* 86 (5): 2729-38. doi:10.1128/JVI.05591-11.
- Fourie, E. D., et J. G. Morrison. 1979. « Rheumatoid Arthritic Syndrome after Chikungunya Fever ». *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde* 56 (4): 130-32.
- Frolov, I, R Hardy, et C M Rice. 2001. « Cis-acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. » *RNA* 7 (11): 1638-51.
- Frolov, I, et S Schlesinger. 1994. « Comparison of the effects of Sindbis virus and Sindbis virus replicons on host cell protein synthesis and cytopathogenicity in BHK cells. » *Journal of Virology* 68 (3): 1721-27.
- Frolov, Ilya, Eugene Agapov, Thomas A. Hoffman, Béla M. Prágai, Mara Lippa, Sondra Schlesinger, et Charles M. Rice. 1999. « Selection of RNA Replicons Capable of Persistent Noncytopathic Replication in Mammalian Cells ». *Journal of Virology* 73 (5): 3854-65.
- Fros, Jelke J., Erika van der Maten, Just M. Vlak, et Gorben P. Pijlman. 2013. « The C-Terminal Domain of Chikungunya Virus nsP2 Independently Governs Viral RNA Replication, Cytopathicity, and Inhibition of Interferon Signaling ». *Journal of Virology* 87 (18): 10394-400. doi:10.1128/JVI.00884-13.
- Fusco, Francesco Maria, Vincenzo Puro, Antonino Di Caro, Emanuele Nicastrì, Novella Carannante, Francesco Saverio Faella, Luisa Barzon, et al. 2006. « [Cases of Chikungunya fever in Italy in travellers returning from the Indian Ocean and risk of introduction of the disease to Italy] ». *Le Infezioni in Medicina: Rivista Periodica Di Eziologia, Epidemiologia, Diagnostica, Clinica E Terapia Delle Patologie Infettive* 14 (4): 238-45.
- Garmashova, Natalia, Rodion Gorchakov, Elena Frolova, et Ilya Frolov. 2006. « Sindbis Virus Nonstructural Protein nsP2 Is Cytotoxic and Inhibits Cellular Transcription ». *Journal of Virology* 80 (12): 5686-96. doi:10.1128/JVI.02739-05.

- Garmashova, Natalia, Rodion Gorchakov, Eugenia Volkova, Slobodan Paessler, Elena Frolova, et Ilya Frolov. 2007. « The Old World and New World Alphaviruses Use Different Virus-Specific Proteins for Induction of Transcriptional Shutoff ». *Journal of Virology* 81 (5): 2472-84. doi:10.1128/JVI.02073-06.
- Gérardin, Patrick, Vanina Guernier, Joëlle Perrau, Adrian Fianu, Karin Le Roux, Philippe Grivard, Alain Michault, Xavier de Lamballerie, Antoine Flahault, et François Favier. 2008. « Estimating Chikungunya prevalence in La Réunion Island outbreak by serosurveys: Two methods for two critical times of the epidemic ». *BMC Infectious Diseases* 8 (juillet): 99. doi:10.1186/1471-2334-8-99.
- Gläsker, Sabine, Aleksei Lulla, Valeria Lulla, Therese Couderc, Jan Felix Drexler, Peter Liljeström, Marc Lecuit, Christian Drosten, Andres Merits, et Beate Mareike Kümmerer. 2013. « Virus Replicon Particle Based Chikungunya Virus Neutralization Assay Using Gaussia Luciferase as Readout ». *Virology Journal* 10: 235. doi:10.1186/1743-422X-10-235.
- Glomb-Reinmund, Sallie, et Margaret Kielian. 1998. « The Role of Low pH and Disulfide Shuffling in the Entry and Fusion of Semliki Forest Virus and Sindbis Virus ». *Virology* 248 (2): 372-81. doi:10.1006/viro.1998.9275.
- Gomez de Cedron, Marta, Neda Ehsani, Marja L. Mikkola, Juan Antonio Garcia, et Leevi Kääriäinen. 1999. « RNA Helicase Activity of Semliki Forest Virus Replicase Protein NSP2 ». *FEBS Letters* 448 (1): 19-22. doi:10.1016/S0014-5793(99)00321-X.
- Gonzalez, Gladys, Loretta Pfannes, Robert Brazas, et Rob Striker. 2007. « Selection of an optimal RNA transfection reagent and comparison to electroporation for the delivery of viral RNA ». *Journal of virological methods* 145 (1): 14-21. doi:10.1016/j.jviromet.2007.04.013.
- Gorchakov, Rodion, Elena Frolova, et Ilya Frolov. 2005. « Inhibition of Transcription and Translation in Sindbis Virus-Infected Cells ». *Journal of Virology* 79 (15): 9397-9409. doi:10.1128/JVI.79.15.9397-9409.2005.
- Grandadam, Marc, Valérie Caro, Sébastien Plumet, Jean-Michel Thiberge, Yvan Souarès, Anna-Bella Failloux, Hugues J. Tolou, et al. 2011. « Chikungunya Virus, Southeastern France ». *Emerging Infectious Diseases* 17 (5): 910-13. doi:10.3201/eid1705.101873.
- Gratz, N. G. 2004. « Critical Review of the Vector Status of Aedes Albopictus ». *Medical and Veterinary Entomology* 18 (3): 215-27. doi:10.1111/j.0269-283X.2004.00513.x.
- Gubler, Duane J. 1998. « Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever ». *Clinical Microbiology Reviews* 11 (3): 480-96.
- Gubler, Duane J. 2002. « The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems ». *Archives of Medical Research* 33 (4): 330-42. doi:10.1016/S0188-4409(02)00378-8.
- Hahn, Y S, E G Strauss, et J H Strauss. 1989. « Mapping of RNA- temperature-sensitive mutants of Sindbis virus: assignment of complementation groups A, B, and G to nonstructural proteins. » *Journal of Virology* 63 (7): 3142-50.
- Halstead, Scott B. 2015. « Reappearance of Chikungunya, Formerly Called Dengue, in the Americas ». *Emerging Infectious Diseases* 21 (4): 557-61. doi:10.3201/eid2104.141723.
- Hammar, Lena, Sevak Markarian, Lars Haag, Hilkka Lankinen, Aimo Salmi, et Holland R. Cheng. 2002. « Prefusion Rearrangements Resulting in Fusion Peptide Exposure in Semliki Forest Virus ». *Journal of Biological Chemistry*, décembre. doi:10.1074/jbc.M206015200.
- Hammon, W. M., A. Rudnick, et G. E. Sather. 1960. « Viruses Associated with Epidemic Hemorrhagic Fevers of the Philippines and Thailand ». *Science (New York, N.Y.)* 131 (3407): 1102-3.
- Hawley, W. A., P. Reiter, R. S. Copeland, C. B. Pumpuni, et G. B. Craig. 1987. « Aedes Albopictus in North America: Probable Introduction in Used Tires from Northern Asia ». *Science* 236 (4805): 1114-16. doi:10.1126/science.3576225.
- Higashi, N., A. Matsumoto, K. Tabata, et Y. Nagatomo. 1967. « Electron microscope study of development of Chikungunya virus in green monkey kidney stable (VERO) cells ». *Virology* 33 (1): 55-69. doi:10.1016/0042-6822(67)90093-1.
- Hyde, Jennifer L., Rubing Chen, Derek W. Trobaugh, Michael S. Diamond, Scott C. Weaver, William B. Klimstra, et Jeffrey Wilusz. 2015. « The 5' and 3' Ends of Alphavirus RNAs--Non-Coding Is Not Non-Functional ». *Virus Research* 206 (août): 99-107. doi:10.1016/j.virusres.2015.01.016.
- « ICTV Virus Taxonomy ». 2016. Consulté le septembre 14. <http://www.ictvdb.org/virusTaxonomy.asp>.
- Inoue, S., K. Morita, R.r. Matias, J.v. Tuplano, R.r.g. Resuello, J.r. Candelario, D.j.m. Cruz, et al. 2003. « Distribution of Three Arbovirus Antibodies among Monkeys (Macaca Fascicularis) in the Philippines ». *Journal of Medical Primatology* 32 (2): 89-94. doi:10.1034/j.1600-0684.2003.00015.x.
- Jeandel, P., R. Josse, et J. P. Durand. 2004. « [Exotic viral arthritis: role of alphavirus] ». *Médecine Tropicale: Revue Du Corps De Santé Colonial* 64 (1): 81-88.

- Jose, Joyce, Jonathan E Snyder, et Richard J Kuhn. 2009. « A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly ». *Future microbiology* 4 (septembre): 837-56. doi:10.2217/fmb.09.59.
- Josseran, Loïc, Christophe Paquet, Abdelkrim Zehgnoun, Nadège Caillere, Alain Le Tertre, Jean-Louis Solet, et Martine Ledrans. 2006. « Chikungunya Disease Outbreak, Reunion Island ». *Emerging Infectious Diseases* 12 (12): 1994-95. doi:10.3201/eid1212.060710.
- Jupp, P. G., et B. M. McIntosh. 1990. « Aedes Furcifer and Other Mosquitoes as Vectors of Chikungunya Virus at Mica, Northeastern Transvaal, South Africa ». *Journal of the American Mosquito Control Association* 6 (3): 415-20.
- Kawashima, Kent D., Lady-Anne C. Suarez, Hannah Karen M. Labayo, Veni R. Liles, Noel C. Salvoza, David C. Klinzing, Maria Luisa G. Daroy, Ronald R. Matias, et Filipinas F. Natividad. 2014. « Complete Genome Sequence of Chikungunya Virus Isolated in the Philippines ». *Genome Announcements* 2 (3). doi:10.1128/genomeA.00336-14.
- Kay, B. H., W. A. Ives, P. I. Whelan, P. Barker-Hudson, I. D. Fanning, et E. N. Marks. 1990. « Is Aedes Albopictus in Australia? » *The Medical Journal of Australia* 153 (1): 31-34.
- Khan, Afjal Hossain, Kouichi Morita, Maria del Carmen Parquet, Futoshi Hasebe, Edward G. M. Mathenge, et Akira Igarashi. 2002. « Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site ». *Journal of General Virology* 83 (12): 3075-84. doi:10.1099/0022-1317-83-12-3075.
- Klimstra, William B., Elizabeth M. Nangle, M. Shane Smith, Andrew D. Yurochko, et Kate D. Ryman. 2003. « DC-SIGN and L-SIGN Can Act as Attachment Receptors for Alphaviruses and Distinguish between Mosquito Cell- and Mammalian Cell-Derived Viruses ». *Journal of Virology* 77 (22): 12022-32. doi:10.1128/JVI.77.22.12022-12032.2003.
- Kraemer, Moritz U. G., Marianne E. Sinka, Kirsten A. Duda, Adrian Mylne, Freya M. Shearer, Oliver J. Brady, Jane P. Messina, et al. 2015. « The global compendium of Aedes aegypti and Ae. albopictus occurrence ». *Scientific Data* 2 (juillet). doi:10.1038/sdata.2015.35.
- Kraemer, Moritz UG, Marianne E Sinka, Kirsten A Duda, Adrian QN Mylne, Freya M Shearer, Christopher M Barker, Chester G Moore, et al. 2016. « The global distribution of the arbovirus vectors Aedes aegypti and Ae. albopictus ». *eLife* 4. Consulté le septembre 27. doi:10.7554/eLife.08347.
- Kuno, Goro. 2015. « A Re-Examination of the History of Etiologic Confusion between Dengue and Chikungunya ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (11). doi:10.1371/journal.pntd.0004101.
- Laakkonen, P, M Hyvönen, J Peränen, et L Kääriäinen. 1994. « Expression of Semliki Forest virus nsP1-specific methyltransferase in insect cells and in Escherichia coli. » *Journal of Virology* 68 (11): 7418-25.
- La Linn, May, Joy Gardner, David Warrilow, Grant A. Darnell, Clive R. McMahon, Ian Field, Alex D. Hyatt, Robert W. Slade, et Andreas Suhrbier. 2001. « Arbovirus of Marine Mammals: a New Alphavirus Isolated from the Elephant Seal Louse, Lepidophthirus macrorhini ». *Journal of Virology* 75 (9): 4103-9. doi:10.1128/JVI.75.9.4103-4109.2001.
- Lamballerie, Xavier de, Eric Leroy, Rémi N. Charrel, Konstantin Ttsetsarkin, Stephen Higgs, et Ernest A. Gould. 2008. « Chikungunya Virus Adapts to Tiger Mosquito via Evolutionary Convergence: A Sign of Things to Come? » *Virology Journal* 5 (février): 33. doi:10.1186/1743-422X-5-33.
- Lambrechts, Louis, Thomas W. Scott, et Duane J. Gubler. 2010. « Consequences of the Expanding Global Distribution of Aedes albopictus for Dengue Virus Transmission ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (5). doi:10.1371/journal.pntd.0000646.
- Lanciotti, Robert S., et Amy J. Lambert. 2016. « Phylogenetic Analysis of Chikungunya Virus Strains Circulating in the Western Hemisphere ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 94 (4): 800-803. doi:10.4269/ajtmh.15-0375.
- Lee, H., P. D. Ricker, et D. T. Brown. 1994. « The Configuration of Sindbis Virus Envelope Proteins Is Stabilized by the Nucleocapsid Protein ». *Virology* 204 (1): 471-74. doi:10.1006/viro.1994.1557.
- Lemant, Jérôme, Véronique Boisson, Arnaud Winer, Laure Thibault, Hélène André, François Tixier, Marie Lemercier, et al. 2008. « Serious Acute Chikungunya Virus Infection Requiring Intensive Care during the Reunion Island Outbreak in 2005-2006 ». *Critical Care Medicine* 36 (9): 2536-41. doi:10.1097/CCM.0b013e318183f2d2.
- Lenglet, Y., G. Barau, P.-Y. Robillard, H. Randrianaivo, A. Michault, A. Bouveret, P. Gérardin, et al. 2008. « Infection à Chikungunya chez la femme enceinte et risque de transmission materno-fœtale ». <http://www.em-premium.com/data/revues/03682315/00350006/578/>, octobre. <http://www.em-premium.com/article/117958/>.
- Leparc-Goffart, Isabelle, Antoine Nougairede, Sylvie Cassadou, Christine Prat, et Xavier de Lamballerie. 2014. « Chikungunya in the Americas ». *The Lancet* 383 (9916): 514. doi:10.1016/S0140-6736(14)60185-9.
- Leroy, Eric M., Dieudonné Nkoghe, Benjamin Ollomo, Chimène Nze-Nkogue, Pierre Becquart, Gilda Grard, Xavier Pourrut, et al. 2009. « Concurrent Chikungunya and Dengue Virus Infections during

- Simultaneous Outbreaks, Gabon, 2007 ». *Emerging Infectious Diseases* 15 (4): 591-93. doi:10.3201/eid1504.080664.
- Leung, Jason Yat-Sing, Mary Mah-Lee Ng, et Justin Jang Hann Chu. 2011. « Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells ». *Advances in Virology* 2011. doi:10.1155/2011/249640.
- Levis, R., S. Schlesinger, et H. V. Huang. 1990. « Promoter for Sindbis Virus RNA-Dependent Subgenomic RNA Transcription ». *Journal of Virology* 64 (4): 1726-33.
- Li, G P, et C M Rice. 1989. « Mutagenesis of the in-frame opal termination codon preceding nsP4 of Sindbis virus: studies of translational readthrough and its effect on virus replication. » *Journal of Virology* 63 (3): 1326-37.
- Li, G, et C M Rice. 1993. « The signal for translational readthrough of a UGA codon in Sindbis virus RNA involves a single cytidine residue immediately downstream of the termination codon. » *Journal of Virology* 67 (8): 5062-67.
- Liang, Guodong, Xiaoyan Gao, et Ernest A Gould. 2015. « Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control ». *Emerging Microbes & Infections* 4 (3): e18. doi:10.1038/emi.2015.18.
- Lima-Camara, Tamara Nunes. 2016. « Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil ». *Revista de Saúde Pública* 50 (juin). doi:10.1590/S1518-8787.2016050006791.
- Lo Presti, Alessandra, Eleonora Cella, Silvia Angeletti, et Massimo Ciccozzi. 2016. « Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of Chikungunya virus: An updating review ». *Infection, Genetics and Evolution* 41: 270-78. doi:10.1016/j.meegid.2016.04.006.
- Lo Presti, Alessandra, Alessia Lai, Eleonora Cella, Gianguglielmo Zehender, et Massimo Ciccozzi. 2014. « Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review ». *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7 (12): 925-32. doi:10.1016/S1995-7645(14)60164-4.
- Lokireddy, Sudarsanareddy, Sarojamma Vemula, et Ramakrishna Vadde. 2008. « Connective tissue metabolism in chikungunya patients ». *Virology Journal* 5 (février): 31. doi:10.1186/1743-422X-5-31.
- Lounibos, L. Philip. 2002. « Invasions by Insect Vectors of Human Disease ». *Annual Review of Entomology* 47 (1): 233-66. doi:10.1146/annurev.ento.47.091201.145206.
- Lum, Fok-Moon, et Lisa F. P. Ng. 2015. « Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis ». *Antiviral Research* 120 (août): 165-74. doi:10.1016/j.antiviral.2015.06.009.
- Lumsden, W. H. 1955. « An Epidemic of Virus Disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General Description and Epidemiology ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 49 (1): 33-57.
- Lyra, Priscila Pinheiro Ribeiro, Gúbio Soares Campos, Igor Dórea Bandeira, Silvia Ines Sardi, Lilian Ferreira de Moura Costa, Flávia Rocha Santos, Carlos Alexandre Santos Ribeiro, et al. 2016. « Congenital Chikungunya Virus Infection after an Outbreak in Salvador, Bahia, Brazil ». *AJP Reports* 6 (3): e299-300. doi:10.1055/s-0036-1587323.
- Madariaga, Miguel, Eduardo Ticona, et Cristhian Resurrecion. 2016. « Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world ». *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 20 (1): 91-98. doi:10.1016/j.bjid.2015.10.004.
- Manimunda, Sathya Prakash, Paluru Vijayachari, Raghuraj Uppoor, Attayur Purushottaman Sugunan, Shiv Shankar Singh, Subhodh Kumar Rai, Anakkathil Balan Sudeep, Nagarajan Muruganandam, Itta Krishna Chaitanya, et Dev Reddy Guruprasad. 2010. « Clinical Progression of Chikungunya Fever during Acute and Chronic Arthritic Stages and the Changes in Joint Morphology as Revealed by Imaging ». *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 104 (6): 392-99. doi:10.1016/j.trstmh.2010.01.011.
- Mavalankar, Dileep, Priya Shastri, Tathagata Bandyopadhyay, Jeram Parmar, et Karaikurichi V. Ramani. 2008. « Increased Mortality Rate Associated with Chikungunya Epidemic, Ahmedabad, India ». *Emerging Infectious Diseases* 14 (3): 412-15. doi:10.3201/eid1403.070720.
- Mavalankar, Dileep, Priya Shastri, et Parvathy Raman. 2007. « Chikungunya epidemic in India: a major public-health disaster ». *The Lancet Infectious Diseases* 7 (5): 306-7. doi:10.1016/S1473-3099(07)70091-9.
- Mayuri, null, Todd W. Geders, Janet L. Smith, et Richard J. Kuhn. 2008. « Role for Conserved Residues of Sindbis Virus Nonstructural Protein 2 Methyltransferase-like Domain in Regulation of Minus-Strand Synthesis and Development of Cytopathic Infection ». *Journal of Virology* 82 (15): 7284-97. doi:10.1128/JVI.00224-08.
- Mbuyamba, Sarah, Gianandr a Borgherini, Emilie Boidin, Annie Jossaume, Fabrice Paganin, Claude Arvin-Berod, et Patrice Poubeau. 2008. « Mise au point sur le chikungunya au travers de

- laë™Ć©pidĆ©mie 2005-2006 Ć Ā laë™Ć®le deĀ laĀ RĆ©union ». *Médecine thérapeutique* 14 (4): 218-25. doi:10.1684/met.2008.0177.
- McGill, Paul E. 1995. « Viral infections: α -viral arthropathy ». *Baillière's Clinical Rheumatology, Tropical Rheumatology*, 9 (1): 145-50. doi:10.1016/S0950-3579(05)80151-7.
- Medlock, Jolyon M., Kayleigh M. Hansford, Francis Schaffner, Veerle Versteirt, Guy Hendrickx, Herve Zeller, et Wim Van Bortel. 2012. « A Review of the Invasive Mosquitoes in Europe: Ecology, Public Health Risks, and Control Options ». *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 12 (6): 435-47. doi:10.1089/vbz.2011.0814.
- Medlock, Jolyon M, et Steve A Leach. 2015. « Effect of climate change on vector-borne disease risk in the UK ». *The Lancet Infectious Diseases* 15 (6): 721-30. doi:10.1016/S1473-3099(15)70091-5.
- Mi, S., R. Durbin, H. V. Huang, C. M. Rice, et V. Stollar. 1989. « Association of the Sindbis Virus RNA Methyltransferase Activity with the Nonstructural Protein nsP1 ». *Virology* 170 (2): 385-91.
- Moore, D. L., S. Reddy, F. M. Akinkugbe, V. H. Lee, T. S. David-West, O. R. Causey, et D. E. Carey. 1974. « An Epidemic of Chikungunya Fever at Ibadan, Nigeria, 1969 ». *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 68 (1): 59-68.
- Morens, David M., et Anthony S. Fauci. 2014. « Chikungunya at the Door — Déjà Vu All Over Again? » *New England Journal of Medicine* 371 (10): 885-87. doi:10.1056/NEJMp1408509.
- Morrison, Thomas E. 2014. « Reemergence of Chikungunya Virus ». *Journal of Virology* 88 (20): 11644-47. doi:10.1128/JVI.01432-14.
- Myles, Kevin M., Cindy L. H. Kelly, Jeremy P. Ledermann, et Ann M. Powers. 2006. « Effects of an Opal Termination Codon Preceding the nsP4 Gene Sequence in the O'Nyong-Nyong Virus Genome on *Anopheles gambiae* Infectivity ». *Journal of Virology* 80 (10): 4992-97. doi:10.1128/JVI.80.10.4992-4997.2006.
- Ng, Lisa F. P., et David M. Ojcius. 2009. « Chikungunya fever – Re-emergence of an old disease ». *Microbes and Infection*, Forum on Chikungunya, 11 (14–15): 1163-64. doi:10.1016/j.micinf.2009.09.001.
- Nkoghe, Dieudonné, Roland Fabrice Kassa Kassa, Ulrich Bisvigou, Mélanie Caron, Gilda Gard, et Eric Maurice Leroy. 2012. « No clinical or biological difference between Chikungunya and Dengue Fever during the 2010 Gabonese outbreak ». *Infectious Disease Reports* 4 (1). doi:10.4081/idr.2012.e5.
- Nunes, Marcio Roberto Teixeira, Nuno Rodrigues Faria, Janaina Mota de Vasconcelos, Nick Golding, Moritz UG Kraemer, Layanna Freitas de Oliveira, Raimunda do Socorro da Silva Azevedo, et al. 2015. « Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil ». *BMC Medicine* 13 (avril). doi:10.1186/s12916-015-0348-x.
- Ou, J. H., C. M. Rice, L. Dalgarno, E. G. Strauss, et J. H. Strauss. 1982. « Sequence Studies of Several Alphavirus Genomic RNAs in the Region Containing the Start of the Subgenomic RNA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (17): 5235-39.
- Owen, K E, et R J Kuhn. 1996. « Identification of a region in the Sindbis virus nucleocapsid protein that is involved in specificity of RNA encapsidation. » *Journal of Virology* 70 (5): 2757-63.
- Owen, Katherine E., et Richard J. Kuhn. 1997. « Alphavirus Budding Is Dependent on the Interaction between the Nucleocapsid and Hydrophobic Amino Acids on the Cytoplasmic Domain of the E2 Envelope Glycoprotein ». *Virology* 230 (2): 187-96. doi:10.1006/viro.1997.8480.
- Ozden, Simona, Marianne Lucas-Hourani, Pierre-Emmanuel Ceccaldi, Ajoy Basak, Menogh Valentine, Suzanne Benjannet, Josée Hamelin, et al. 2008. « Inhibition of Chikungunya Virus Infection in Cultured Human Muscle Cells by Furin Inhibitors IMPAIRMENT OF THE MATURATION OF THE E2 SURFACE GLYCOPROTEIN ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (32): 21899-908. doi:10.1074/jbc.M802444200.
- Padbidri, V. S., et T. T. Gnaneswar. 1979. « Epidemiological Investigations of Chikungunya Epidemic at Barsi, Maharashtra State, India ». *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology* 23 (4): 445-51.
- Paganin, Fabrice, Giannandrea Borgherini, Frédéric Staikowsky, Claude Arvin-Berod, et Patrice Poubreau. 2006. « Chikungunya à l'île de la Réunion: chronique d'une épidémie annoncée ». *La Presse Médicale*, Dossier thématique : Actualités en autoimmunité, 35 (4): 641-46. doi:10.1016/S0755-4982(06)74657-7.
- Parrott, Megan M., Sarah A. Sitariski, Randy J. Arnold, Lora K. Picton, R. Blake Hill, et Suchetana Mukhopadhyay. 2009. « Role of Conserved Cysteines in the Alphavirus E3 Protein ». *Journal of Virology* 83 (6): 2584-91. doi:10.1128/JVI.02158-08.
- Pastorino, B., J.j. Muyembe-Tamfum, M. Bessaud, F. Tock, H. Tolou, J.p. Durand, et C.n. Peyrefitte. 2004. « Epidemic Resurgence of Chikungunya Virus in Democratic Republic of the Congo: Identification of a New Central African Strain ». *Journal of Medical Virology* 74 (2): 277-82. doi:10.1002/jmv.20168.

- Paty, M. C., C. Six, F. Charlet, G. Heuzé, A. Cochet, A. Wiegandt, J. L. Chappert, et al. 2014. « Large Number of Imported Chikungunya Cases in Mainland France, 2014: A Challenge for Surveillance and Response ». *Euro Surveillace: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 19 (28): 20856.
- Paupy, C., H. Delatte, L. Bagny, V. Corbel, et D. Fontenille. 2009. « Aedes albopictus, an arbovirus vector: From the darkness to the light ». *Microbes and Infection*, Forum on Chikungunya, 11 (14–15): 1177–85. doi:10.1016/j.micinf.2009.05.005.
- Paupy, Christophe, Cécile Brengues, Ousmane Ndiath, Céline Toty, Jean-Pierre Hervé, et Frédéric Simard. 2010. « Morphological and Genetic Variability within Aedes Aegypti in Niakhar, Senegal ». *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 10 (4): 473–80. doi:10.1016/j.meegid.2010.03.001.
- Peper, Shana M., Benjamin J. Monson, Trevor Van Schooneveld, et Christopher J. Smith. 2015. « That Which Bends Up: A Case Report and Literature Review of Chikungunya Virus ». *Journal of General Internal Medicine* 31 (5): 576–81. doi:10.1007/s11606-015-3459-3.
- Petersen, Lyle R., et Ann M. Powers. 2016. « Chikungunya: epidemiology ». *F1000Research* 5 (janvier). doi:10.12688/f1000research.7171.1.
- Peyrefitte, Christophe N., Dominique Rousset, Boris A.M. Pastorino, Regis Pouillot, Maël Bessaud, Fabienne Tock, Helene Mansaray, et al. 2007. « Chikungunya Virus, Cameroon, 2006 ». *Emerging Infectious Diseases* 13 (5): 768–71. doi:10.3201/eid1305.061500.
- Pialoux, G., B. -A. Gaüzère, et M. Strobel. 2006. « Infection à virus Chikungunya : revue générale par temps d'épidémie ». *Médecine et Maladies Infectieuses* 36 (5): 253–63. doi:10.1016/j.medmal.2006.04.002.
- Pialoux, Gilles, Bernard-Alex Gaüzère, Stéphane Jauréguiberry, et Michel Strobel. 2007. « Chikungunya, an Epidemic Arbovirosis ». *The Lancet Infectious Diseases* 7 (5): 319–27. doi:10.1016/S1473-3099(07)70107-X.
- Pineda, Carlos, Roberto Muñoz-Louis, Carlo V. Caballero-Urbe, et Diego Viasus. 2016. « Chikungunya in the Region of the Americas. A Challenge for Rheumatologists and Health Care Systems ». *Clinical Rheumatology*, août, 1–5. doi:10.1007/s10067-016-3390-y.
- Pletnev, Sergei V., Wei Zhang, Suchetana Mukhopadhyay, Bonnie R. Fisher, Raquel Hernandez, Dennis T. Brown, Timothy S. Baker, Michael G. Rossmann, et Richard J. Kuhn. 2001. « Locations of Carbohydrate Sites on Alphavirus Glycoproteins Show that E1 Forms an Icosahedral Scaffold ». *Cell* 105 (1): 127–36.
- Pohjala, Leena, Age Utt, Margus Varjak, Aleksei Lulla, Andres Merits, Tero Ahola, et Päivi Tammela. 2011. « Inhibitors of Alphavirus Entry and Replication Identified with a Stable Chikungunya Replicon Cell Line and Virus-Based Assays ». *PLOS ONE* 6 (12): e28923. doi:10.1371/journal.pone.0028923.
- Powers, Ann M. 2011. « Genomic Evolution and Phenotypic Distinctions of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak ». *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 236 (8): 909–14. doi:10.1258/ebm.2011.011078.
- Powers, Ann M., Aaron C. Brault, Robert B. Tesh, et Scott C. Weaver. 2000. « Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships ». *Journal of General Virology* 81 (2): 471–79. doi:10.1099/0022-1317-81-2-471.
- Powers, Ann M., et Christopher H. Logue. 2007. « Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus ». *Journal of General Virology* 88 (9): 2363–77. doi:10.1099/vir.0.82858-0.
- Queyriaux, Benjamin, Fabrice Simon, Marc Grandadam, Rémy Michel, Hugues Tolou, et Jean-Paul Boutin. 2008. « Clinical burden of chikungunya virus infection ». *The Lancet Infectious Diseases* 8 (1): 2–3. doi:10.1016/S1473-3099(07)70294-3.
- Rajapakse, Senaka, Chathuraka Rodrigo, et Anoja Rajapakse. 2010. « Atypical Manifestations of Chikungunya Infection ». *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 104 (2): 89–96. doi:10.1016/j.trstmh.2009.07.031.
- Ratsitorahina, Mahery, Julie Harisoa, Jocelyn Ratovonjato, Sophie Biacabe, Jean-Marc Reynes, Hervé Zeller, Yolande Raoelina, Antoine Talarmin, Vincent Richard, et Jean Louis Soares. 2008. « Outbreak of Dengue and Chikungunya Fevers, Toamasina, Madagascar, 2006 ». *Emerging Infectious Diseases* 14 (7): 1135–37. doi:10.3201/eid1407.071521.
- Receveur, M., K. Ezzedine, T. Pistone, et D. Malvy. 2010. « Chikungunya Infection in a French Traveller Returning from the Maldives, October, 2009 ». *Euro Surveillace: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 15 (8): 19494.
- Reid, Colleen R., Adriana M. Airo, et Tom C. Hobman. 2015. « The Virus-Host Interplay: Biogenesis of +RNA Replication Complexes ». *Viruses* 7 (8): 4385–4413. doi:10.3390/v7082825.

- Reiter, P., et D. Sprenger. 1987. « The Used Tire Trade: A Mechanism for the Worldwide Dispersal of Container Breeding Mosquitoes ». *Journal of the American Mosquito Control Association* 3 (3): 494-501.
- Renault, P., E. Balleydier, E. D'Ortenzio, M. Bâville, et L. Filleul. 2012. « Epidemiology of chikungunya infection on Reunion Island, Mayotte, and neighboring countries ». *Médecine et Maladies Infectieuses* 42 (3): 93-101. doi:10.1016/j.medmal.2011.12.002.
- Renault, Philippe, Jean-Louis Solet, Daouda Sissoko, Elsa Balleydier, Sophie Larrieu, Laurent Filleul, Christian Lassalle, et al. 2007. « A Major Epidemic of Chikungunya Virus Infection on Réunion Island, France, 2005–2006 ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77 (4): 727-31.
- Rezza, G., L. Nicoletti, R. Angelini, R. Romi, A. C. Finarelli, M. Panning, P. Cordioli, et al. 2007. « Infection with Chikungunya Virus in Italy: An Outbreak in a Temperate Region ». *Lancet (London, England)* 370 (9602): 1840-46. doi:10.1016/S0140-6736(07)61779-6.
- Rezza, Giovanni. 2014. « Dengue and chikungunya: long-distance spread and outbreaks in naïve areas ». *Pathogens and Global Health* 108 (8): 349-55. doi:10.1179/2047773214Y.0000000163.
- . 2015. « Do We Need a Vaccine against Chikungunya? » *Pathogens and Global Health* 109 (4): 170-73. doi:10.1179/2047773215Y.0000000017.
- Richard, Vaea, Tuterarii Paoaafaite, et Van-Mai Cao-Lormeau. 2016. « Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* Populations from French Polynesia for Chikungunya Virus ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (5). doi:10.1371/journal.pntd.0004694.
- Rikkonen, M., J. Peränen, et L. Kääriäinen. 1992. « Nuclear and Nucleolar Targeting Signals of Semliki Forest Virus Nonstructural Protein nsP2 ». *Virology* 189 (2): 462-73.
- Robillard, Pierre-Yves, Brahim Boumahni, Patrick Gérardin, Alain Michault, Alain Fourmaintraux, Isabelle Schuffenecker, Magali Carbonnier, et al. 2006. « Transmission verticale materno-fetale du virus chikungunya ». *La Presse Médicale* 35 (5): 785-88. doi:10.1016/S0755-4982(06)74690-5.
- Robinson, M. C. 1955. « An Epidemic of Virus Disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical Features ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 49 (1): 28-32.
- Roche, Benjamin, Lucas Léger, Grégory L'Ambert, Guillaume Lacour, Rémi Foussadier, Gilles Besnard, Hélène Barré-Cardi, Frédéric Simard, et Didier Fontenille. 2015. « The Spread of *Aedes albopictus* in Metropolitan France: Contribution of Environmental Drivers and Human Activities and Predictions for a Near Future ». *PLoS ONE* 10 (5). doi:10.1371/journal.pone.0125600.
- Rodríguez-morales, Alfonso J., Jaime A. Cardona-ospina, Sivia Fernanda Urbano-Garzón, et Juan Sebastian Hurtado-Zapata. 2016. « Prevalence of Post-Chikungunya Chronic Inflammatory Rheumatism: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Arthritis Care & Research*, mars, n/a-n/a. doi:10.1002/acr.22900.
- Roiz, David, Philippe Boussès, Frédéric Simard, Christophe Paupy, et Didier Fontenille. 2015. « Autochthonous Chikungunya Transmission and Extreme Climate Events in Southern France ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (6). doi:10.1371/journal.pntd.0003854.
- Ross, R. W. 1956. « The Newala epidemic ». *The Journal of Hygiene* 54 (2): 177-91.
- Rougeron, Virginie, I-Ching Sam, Mélanie Caron, Dieudonné Nkoghe, Eric Leroy, et Pierre Roques. 2015. « Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk ». *Journal of Clinical Virology* 64 (mars): 144-52. doi:10.1016/j.jcv.2014.08.032.
- Rupp, Jonathan C., Kevin J. Sokoloski, Natasha N. Gebhart, et Richard W. Hardy. 2015. « Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions ». *Journal of General Virology* 96 (9): 2483-2500. doi:10.1099/jgv.0.000249.
- Sambri, Vittorio, Francesca Cavrini, Giada Rossini, Anna Pierro, et Maria Paola Landini. 2008. « The 2007 Epidemic Outbreak of Chikungunya Virus Infection in the Romagna Region of Italy: A New Perspective for the Possible Diffusion of Tropical Diseases in Temperate Areas? » *The New Microbiologica* 31 (3): 303-4.
- Sarkar, J. K., S. N. Chatterjee, S. K. Chakravarti, et A. C. Mitra. 1965. « Chikungunya Virus Infection with Haemorrhagic Manifestations ». *The Indian Journal of Medical Research* 53 (10): 921-25.
- Savage, H. M., V. I. Ezike, A. C. Nwankwo, R. Spiegel, et B. R. Miller. 1992. « First Record of Breeding Populations of *Aedes Albopictus* in Continental Africa: Implications for Arboviral Transmission ». *Journal of the American Mosquito Control Association* 8 (1): 101-3.
- Saxena, S. K., M. Singh, N. Mishra, et V. Lakshmi. 2006. « Resurgence of Chikungunya Virus in India: An Emerging Threat ». *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 11 (8): E060810.2.
- Schaffner, F. (Adege, et S. Karch. 2000. « Première observation d'*Aedes albopictus* (Skuse, 1894) en France métropolitaine ». *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Serie 3 Sciences de la Vie (France)*.

http://agris.fao.org/agris-search/search.do;jsessionid=77A385FFAEA511FC79997C21BB76D847?request_locale=fr&recordID=FR2000003117&query=&sourceQuery=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=¢erString=&enableField=

- Schmaljohn, Alan L., et David McClain. 1996. « Alphaviruses (Togaviridae) and Flaviviruses (Flaviviridae) ». In *Medical Microbiology*, édité par Samuel Baron, 4th éd. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7633/>.
- Schuffenecker, Isabelle, Isabelle Iteman, Alain Michault, Séverine Murri, Lionel Frangeul, Marie-Christine Vaney, Rachel Lavenir, et al. 2006. « Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak ». *PLoS Medicine* 3 (7). doi:10.1371/journal.pmed.0030263.
- Schwartz, Olivier, et Matthew L. Albert. 2010. « Biology and Pathogenesis of Chikungunya Virus ». *Nature Reviews. Microbiology* 8 (7): 491-500. doi:10.1038/nrmicro2368.
- Sergon, Kibet, Charles Njuguna, Rosalia Kalani, Victor Ofula, Clayton Onyango, Limbaso S. Konongoi, Sheryl Bedno, et al. 2008. « Seroprevalence of Chikungunya Virus (CHIKV) Infection on Lamu Island, Kenya, October 2004 ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78 (2): 333-37.
- Sergon, Kibet, Ali Ahmed Yahaya, Jennifer Brown, Said A. Bedja, Mohammed Mlindasse, Naphtali Agata, Yokouide Allaranger, et al. 2007. « Seroprevalence of Chikungunya Virus Infection on Grande Comore Island, Union of the Comoros, 2005 ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76 (6): 1189-93.
- Seyler, T., C. Rizzo, A. C. Finarelli, C. Po, P. Alessio, V. Sambri, M. L. Ciofi Degli Atti, et S. Salmaso. 2008. « Autochthonous Chikungunya Virus Transmission May Have Occurred in Bologna, Italy, during the Summer 2007 Outbreak ». *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 13 (3).
- Sheehy, P., B. Mullan, I. Moreau, E. Kenny-Walsh, F. Shanahan, M. Scallan, et L. J. Fanning. 2007. « In Vitro Replication Models for the Hepatitis C Virus ». *Journal of Viral Hepatitis* 14 (1): 2-10. doi:10.1111/j.1365-2893.2006.00807.x.
- Shiferaw, Bethel, Paul Lam, Summer Tuthill, Hira Choudhry, Sarah Syed, Shadab Ahmed, et Tabassum Yasmin. 2015. « The Chikungunya Epidemic: A Look at Five Cases ». *IDCases* 2 (4): 89-91. doi:10.1016/j.idcr.2015.08.004.
- Shirako, Y., et J. H. Strauss. 1990. « Cleavage between nsP1 and nsP2 Initiates the Processing Pathway of Sindbis Virus Nonstructural Polyprotein P123 ». *Virology* 177 (1): 54-64.
- . 1994. « 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 ». *Journal of Virology* 68 (3): 1874-85.
- Shirako, Yukio, Ellen G. Strauss, et James H. Strauss. 2000. « Suppressor Mutations That Allow Sindbis Virus RNA Polymerase to Function with Nonaromatic Amino Acids at the N-Terminus: Evidence for Interaction between nsP1 and nsP4 in Minus-Strand RNA Synthesis ». *Virology* 276 (1): 148-60. doi:10.1006/viro.2000.0544.
- Simizu, B, K Yamamoto, K Hashimoto, et T Ogata. 1984. « Structural proteins of Chikungunya virus. » *Journal of Virology* 51 (1): 254-58.
- Simon, Fabrice, Philippe Parola, Marc Grandadam, Sabrina Fourcade, Manuela Oliver, Philippe Brouqui, Pierre Hance, et al. 2007. « Chikungunya Infection: An Emerging Rheumatism among Travelers Returned from Indian Ocean Islands. Report of 47 Cases ». *Medicine* 86 (3): 123-37. doi:10.1097/MD/0b013e31806010a5.
- Simpson, Dennis A., Nancy L. Davis, Seh-Ching Lin, Darcy Russell, et Robert E. Johnston. 1996. « Complete Nucleotide Sequence and Full-Length cDNA Clone of S.A.AR86, a South African Alphavirus Related to Sindbis ». *Virology* 222 (2): 464-69. doi:10.1006/viro.1996.0445.
- Sissoko, Daouda, Denis Malvy, Khaled Ezzedine, Philippe Renault, Frederic Moscetti, Martine Ledrans, et Vincent Pierre. 2009. « Post-Epidemic Chikungunya Disease on Reunion Island: Course of Rheumatic Manifestations and Associated Factors over a 15-Month Period ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3 (3). doi:10.1371/journal.pntd.0000389.
- Sissoko, Daouda, Denis Malvy, Claude Giry, Gilles Delmas, Christophe Paquet, Philippe Gabrie, François Pettinelli, Marie Anne Sanquer, et Vincent Pierre. 2008. « Outbreak of Chikungunya Fever in Mayotte, Comoros Archipelago, 2005-2006 ». *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102 (8): 780-86. doi:10.1016/j.trstmh.2008.02.018.
- Solignat, Maxime, Bernard Gay, Stephen Higgs, Laurence Briant, et Christian Devaux. 2009. « Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus ». *Virology* 393 (2): 183-97. doi:10.1016/j.virol.2009.07.024.
- Soumahoro, Man-Koumba, Pierre-Yves Boelle, Bernard-Alex Gaüzere, Kokuvi Atsou, Camille Pelat, Bruno Lambert, Guy La Roche, et al. 2011. « The Chikungunya Epidemic on La Réunion Island in 2005-

- 2006: A Cost-of-Illness Study ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (6). doi:10.1371/journal.pntd.0001197.
- Sourisseau, Marion, Clémentine Schilte, Nicoletta Casartelli, Céline Trouillet, Florence Guivel-Benhassine, Dominika Rudnicka, Nathalie Sol-Foulon, et al. 2007. « Characterization of Reemerging Chikungunya Virus ». *PLoS Pathogens* 3 (6). doi:10.1371/journal.ppat.0030089.
- Stapleford, Kenneth A., Gonzalo Moratorio, Rasmus Henningsson, Rubing Chen, Séverine Matheus, Antoine Enfissi, Daphna Weissglas-Volkov, et al. 2016. « Whole-Genome Sequencing Analysis from the Chikungunya Virus Caribbean Outbreak Reveals Novel Evolutionary Genomic Elements ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (1): e0004402. doi:10.1371/journal.pntd.0004402.
- Strauss, E. G., C. M. Rice, et J. H. Strauss. 1984. « Complete Nucleotide Sequence of the Genomic RNA of Sindbis Virus ». *Virology* 133 (1): 92-110.
- Strauss, J H, et E G Strauss. 1994. « The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. » *Microbiological Reviews* 58 (3): 491-562.
- Sudeep, A. B., et D. Parashar. 2008. « Chikungunya: An Overview ». *Journal of Biosciences* 33 (4): 443-49.
- Suhrbier, Andreas, Marie-Christine Jaffar-Bandjee, et Philippe Gasque. 2012. « Arthritogenic Alphaviruses—an Overview ». *Nature Reviews Rheumatology* 8 (7): 420-29. doi:10.1038/nrrheum.2012.64.
- Tabachnick, W. J. 1991. « The Evolutionary Relationships among Arboviruses and the Evolutionary Relationships of Their Vectors Provides a Method for Understanding Vector-Host Interactions ». *Journal of Medical Entomology* 28 (3): 297-98.
- Tamm, Kristi, Andres Merits, et Inga Sarand. 2008. « Mutations in the nuclear localization signal of nsP2 influencing RNA synthesis, protein expression and cytotoxicity of Semliki Forest virus ». *The Journal of General Virology* 89 (Pt 3): 676-86. doi:10.1099/vir.0.83320-0.
- Tannous, Bakhos A., Dong-Eog Kim, Juliet L. Fernandez, Ralph Weissleder, et Xandra O. Breakefield. 2005. « Codon-Optimized Gaussia Luciferase cDNA for Mammalian Gene Expression in Culture and in Vivo ». *Molecular Therapy* 11 (3): 435-43. doi:10.1016/j.ymthe.2004.10.016.
- Teixeira, Maria G., Alcina M.S. Andrade, Maria da Conceição N. Costa, Jesuína S.M. Castro, Francisca L.S. Oliveira, Cristina S.B. Goes, Maricelia Maia, Eloisa B. Santana, Bruno T.D. Nunes, et Pedro F.C. Vasconcelos. 2015. « East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil, 2014 ». *Emerging Infectious Diseases* 21 (5): 906-7. doi:10.3201/eid2105.141727.
- Tesh, R. B., D. M. Watts, K. L. Russell, C. Damodaran, C. Calampa, C. Cabezas, G. Ramirez, et al. 1999. « Mayaro Virus Disease: An Emerging Mosquito-Borne Zoonosis in Tropical South America ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 28 (1): 67-73. doi:10.1086/515070.
- Thiberville, Simon-Djamel, Nanikaly Moyen, Laurence Dupuis-Maguiraga, Antoine Nougairede, Ernest A. Gould, Pierre Roques, et Xavier de Lamballerie. 2013. « Chikungunya Fever: Epidemiology, Clinical Syndrome, Pathogenesis and Therapy ». *Antiviral Research* 99 (3): 345-70. doi:10.1016/j.antiviral.2013.06.009.
- Thiboutot, Michelle M., Senthil Kannan, Omkar U. Kawalekar, Devon J. Shedlock, Amir S. Khan, Gopalsamy Sarangan, Padma Srikanth, David B. Weiner, et Karuppiah Muthumani. 2010. « Chikungunya: A Potentially Emerging Epidemic? » *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (4). doi:10.1371/journal.pntd.0000623.
- Tomasello, Danilo, et Patricia Schlagenhauf. 2013. « Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007–2012 ». *Travel Medicine and Infectious Disease* 11 (5): 274-84. doi:10.1016/j.tmaid.2013.07.006.
- Torres, Jaime R., Luiza H. Falleiros-Arlant, Lourdes Dueñas, Jorge Pleitez Navarrete, Doris M. Salgado, et José Brea-Del Castillo. 2016. « Congenital and Perinatal Complications of Chikungunya Fever: A Latin American Experience ». *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, septembre. doi:10.1016/j.ijid.2016.09.009.
- Torres, Jaime R., Leopoldo Códova G., Julio S. Castro, Libsen Rodríguez, Víctor Saravia, Joanne Arvelaez, Antonio Ríos-Fabra, María A. Longhi, et Melania Marcano. 2014. « Chikungunya fever: Atypical and lethal cases in the Western hemisphere ». *Idcases* 2 (1): 6-10. doi:10.1016/j.idcr.2014.12.002.
- Touret, Yasmina, Hanitra Randrianaivo, Alain Michault, Isabelle Schuffenecker, Edouard Kauffmann, Yann Lenglet, Georges Barau, et Alain Fourmaintraux. 2006. « Transmission materno-fœtale précoce du virus Chikungunya ». *La Presse Médicale* 35 (11): 1656-58. doi:10.1016/S0755-4982(06)74874-6.
- Tsetsarkin, Konstantin A., Rubing Chen, Grace Leal, Naomi Forrester, Stephen Higgs, Jing Huang, et Scott C. Weaver. 2011. « Chikungunya virus emergence is constrained in Asia by lineage-specific adaptive landscapes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (19): 7872-77. doi:10.1073/pnas.1018344108.

- Tsetsarkin, Konstantin A., Rubing Chen, Michael B. Sherman, et Scott C. Weaver. 2011. « Chikungunya Virus: Evolution and Genetic Determinants of Emergence ». *Current opinion in virology* 1 (4): 310-17. doi:10.1016/j.coviro.2011.07.004.
- Tsetsarkin, Konstantin A, Rubing Chen, et Scott C Weaver. 2016. « Interspecies transmission and chikungunya virus emergence ». *Current Opinion in Virology*, Emerging viruses• Viral immunology, 16: 143-50. doi:10.1016/j.coviro.2016.02.007.
- Tsetsarkin, Konstantin A, Dana L Vanlandingham, Charles E McGee, et Stephen Higgs. 2007. « A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential ». *PLoS Pathogens* 3 (12). doi:10.1371/journal.ppat.0030201.
- Tsetsarkin, Konstantin A., et Scott C. Weaver. 2011. « Sequential Adaptive Mutations Enhance Efficient Vector Switching by Chikungunya Virus and Its Epidemic Emergence ». *PLoS Pathogens* 7 (12). doi:10.1371/journal.ppat.1002412.
- Tuittila, Minna T., Maria G. Santagati, Matias Røyttä, Jorma A. Määttä, et Ari E. Hinkkanen. 2000. « Replicase Complex Genes of Semliki Forest Virus Confer Lethal Neurovirulence ». *Journal of Virology* 74 (10): 4579-89.
- Utt, Age, Pratyush Kumar Das, Margus Varjak, Valeria Lulla, Aleksei Lulla, et Andres Merits. 2014. « Mutations Conferring a Noncytotoxic Phenotype on Chikungunya Virus Replicons Compromise Enzymatic Properties of Nonstructural Protein 2 ». *Journal of Virology* 89 (6): 3145-62. doi:10.1128/JVI.03213-14.
- Vasiljeva, Lidia, Andres Merits, Petri Auvinen, et Leevi Kääriäinen. 2000. « Identification of a Novel Function of the Alphavirus Capping Apparatus RNA 5'-TRIPHOSPHATASE ACTIVITY OF Nsp2 ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (23): 17281-87. doi:10.1074/jbc.M910340199.
- Vazeille, Marie, Sara Moutailler, Daniel Coudrier, Claudine Rousseaux, Huot Khun, Michel Huerre, Julien Thiria, et al. 2007. « Two Chikungunya Isolates from the Outbreak of La Reunion (Indian Ocean) Exhibit Different Patterns of Infection in the Mosquito, *Aedes albopictus* ». *PLoS ONE* 2 (11). doi:10.1371/journal.pone.0001168.
- Vega-Rúa, Anubis, Ricardo Lourenço-de-Oliveira, Laurence Mousson, Marie Vazeille, Sappho Fuchs, André Yébakima, Joel Gustave, et al. 2015. « Chikungunya Virus Transmission Potential by Local *Aedes* Mosquitoes in the Americas and Europe ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (5). doi:10.1371/journal.pntd.0003780.
- Verhaegen, Monique, et Theodore K. Christopoulos. 2002. « Recombinant Gaussia Luciferase. Overexpression, Purification, and Analytical Application of a Bioluminescent Reporter for DNA Hybridization ». *Analytical Chemistry* 74 (17): 4378-85. doi:10.1021/ac025742k.
- Vihinen, Helena, Tero Ahola, Minna Tuittila, Andres Merits, et Leevi Kääriäinen. 2001. « Elimination of Phosphorylation Sites of Semliki Forest Virus Replicase Protein nsP3 ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (8): 5745-52. doi:10.1074/jbc.M006077200.
- Villoing, Stéphane, Monique Béarzotti, Stefan Chiltonczyk, Jeannette Castric, et Michel Brémont. 2000. « Rainbow Trout Sleeping Disease Virus Is an Atypical Alphavirus ». *Journal of Virology* 74 (1): 173-83.
- Volk, Sara M., Rubing Chen, Konstantin A. Tsetsarkin, A. Paige Adams, Tzintzuni I. Garcia, Amadou A. Sall, Farooq Nasar, et al. 2010. « Genome-Scale Phylogenetic Analyses of Chikungunya Virus Reveal Independent Emergences of Recent Epidemics and Various Evolutionary Rates ». *Journal of Virology* 84 (13): 6497-6504. doi:10.1128/JVI.01603-09.
- Volpe, A., P. Caramaschi, A. Angheben, A. Marchetta, G. Monteiro, L. M. Bambara, et Z. Bisoffi. 2006. « Chikungunya Outbreak—remember the Arthropathy ». *Rheumatology* 45 (11): 1449-50. doi:10.1093/rheumatology/kel275.
- Waldock, Joanna, Nastassya L Chandra, Jos Lelieveld, Yiannis Proestos, Edwin Michael, George Christophides, et Paul E Parham. 2013. « The role of environmental variables on *Aedes albopictus* biology and chikungunya epidemiology ». *Pathogens and Global Health* 107 (5): 224-41. doi:10.1179/2047773213Y.0000000100.
- Wang, K S, R J Kuhn, E G Strauss, S Ou, et J H Strauss. 1992. « High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. » *Journal of Virology* 66 (8): 4992-5001.
- Wang, Y F, S G Sawicki, et D L Sawicki. 1991. « Sindbis virus nsP1 functions in negative-strand RNA synthesis. » *Journal of Virology* 65 (2): 985-88.
- . 1994. « Alphavirus nsP3 functions to form replication complexes transcribing negative-strand RNA. » *Journal of Virology* 68 (10): 6466-75.

- Waymouth, Heather E., Dick E. Zoutman, et Tanveer E. Towheed. 2013. « Chikungunya-related arthritis: Case report and review of the literature ». *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 43 (2): 273-78. doi:10.1016/j.semarthrit.2013.03.003.
- Weaver, Scott C. 2014. « Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (6). doi:10.1371/journal.pntd.0002921.
- Weaver, Scott C., et Naomi L. Forrester. 2015. « Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread ». *Antiviral Research* 120 (août): 32-39. doi:10.1016/j.antiviral.2015.04.016.
- Weaver, Scott C., et Marc Lecuit. 2015. « Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease ». *New England Journal of Medicine* 372 (13): 1231-39. doi:10.1056/NEJMra1406035.
- Weaver, Scott C., Richard Winegar, Ian D. Manger, et Naomi L. Forrester. 2012. « Alphaviruses: Population genetics and determinants of emergence ». *Antiviral Research* 94 (3): 242-57. doi:10.1016/j.antiviral.2012.04.002.
- Weiss, B, H Nitschko, I Ghattas, R Wright, et S Schlesinger. 1989. « Evidence for specificity in the encapsidation of Sindbis virus RNAs. » *Journal of Virology* 63 (12): 5310-18.
- West, John, et Dennis T. Brown. 2006. « Role of a conserved tripeptide in the endodomain of Sindbis virus glycoprotein E2 in virus assembly and function ». *Journal of General Virology* 87 (3): 657-64. doi:10.1099/vir.0.81304-0.
- Weston, Jonathan H., Michael D. Welsh, Marian F. McLoughlin, et Daniel Todd. 1999. « Salmon Pancreas Disease Virus, an Alphavirus Infecting Farmed Atlantic Salmon, *Salmo salar* L. » *Virology* 256 (2): 188-95. doi:10.1006/viro.1999.9654.
- Wiles, Siouxsie, Kathryn Ferguson, Martha Stefanidou, Douglas B. Young, et Brian D. Robertson. 2005. « Alternative Luciferase for Monitoring Bacterial Cells under Adverse Conditions ». *Applied and Environmental Microbiology* 71 (7): 3427-32. doi:10.1128/AEM.71.7.3427-3432.2005.
- Win, M. K., A. Chow, F. Dimatatac, C. J. Go, et Y. S. Leo. 2010. « Chikungunya fever in Singapore: Acute clinical and laboratory features, and factors associated with persistent arthralgia ». *Journal of Clinical Virology* 49 (2): 111-14. doi:10.1016/j.jcv.2010.07.004.
- Wintachai, Phitchayapak, Nitwara Wikan, Atichat Kuadkitkan, Thitigun Jaimipuk, Sukathida Ubol, Rojjanaporn Pulmanasahakul, Prasert Auewarakul, et al. 2012. « Identification of Prohibitin as a Chikungunya Virus Receptor Protein ». *Journal of Medical Virology* 84 (11): 1757-70. doi:10.1002/jmv.23403.
- Wolfe, N. D., A. M. Kilbourn, W. B. Karesh, H. A. Rahman, E. J. Bosi, B. C. Cropp, M. Andau, A. Spielman, et D. J. Gubler. 2001. « Sylvatic Transmission of Arboviruses among Bornean Orangutans. » *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 64 (5): 310-16.
- Zhang, Wei, Suchetana Mukhopadhyay, Sergei V. Pletnev, Timothy S. Baker, Richard J. Kuhn, et Michael G. Rossmann. 2002. « Placement of the Structural Proteins in Sindbis Virus ». *Journal of Virology* 76 (22): 11645-58.

Serment de Galien

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

Mise en place d'un système cellulaire non infectieux pour l'étude de la réplication du virus chikungunya

RESUME en français : Le virus chikungunya (CHIKV ; genre *Alphavirus*, famille *Togaviridae*), pathogène ré-émergent, a récemment causé des épidémies d'une ampleur sans précédent, affectant des millions de personnes, et faisant de la maladie du même nom un problème actuel de santé publique. A ce jour, ni traitement antiviral, ni vaccin ne sont disponibles, d'où la nécessité d'entreprendre des travaux de recherche pour mieux appréhender le cycle viral et ainsi développer des stratégies antivirales efficaces. Le CHIKV étant un pathogène de classe 3, l'objectif de ce travail consistait à mettre en place un système cellulaire non infectieux pour l'étude de la réplication de ce virus. Pour cela un réplicon, ARN non infectieux à réplication autonome, a été construit. Il se compose des gènes codant le complexe de réplication viral associés à la GLuc, un gène permettant sa détection. Grâce à l'introduction de mutations dans les gènes codant les protéines non-structurales, une lignée cellulaire exprimant stablement un réplicon non cytotoxique du CHIKV a été développée. Seules les cellules Bhk-21 se sont révélées compétentes pour cette réplication, l'effet cytopathogène associé à l'expression des protéines non-structurales, étant trop important sur les autres lignées cellulaires étudiées. Les approches mises en place dans ce travail ont donc permis la création d'un outil de recherche biologiquement sûr et efficace permettant aussi bien l'exploration de la réplication virale que le criblage d'inhibiteurs potentiels de cette étape du cycle viral.

TITRE et RESUME en anglais :

Establishment of a non-infectious cellular model for studying CHIKV's replication

Chikungunya virus (CHIKV; genus *Alphavirus*, family *Togaviridae*), considered as a reemerging pathogen, has recently caused several major outbreaks of unprecedented scale affecting millions of people and making its associated disease a current public health concern. Currently, no vaccines or antiviral drugs are available, emphasizing the need to gain more insight into its life cycle and to develop effective antiviral strategies. As CHIKV is a 3 biosafe laboratory agent, the aim of this study was to develop a non-infectious model for studying CHIKV's replication in a cellular system. To this end, a CHIKV's replicon, a non-infectious RNA with autonomous replication, was constructed. It consists of genes encoding the viral replication complex associated with GLuc, a marker gene allowing its detection. A stable cell line harboring a noncytotoxic CHIKV's replicon was developed through the introduction of mutations within genes encoding nonstructural proteins. Only Bhk-21 cells proved to be competent for this replication, due to the cytopathic effect of the nonstructural proteins expression in the other cell lines studied. The cell line developed in this study represents a biosafe and efficient research tool valuable for studying viral replication as well as for screening CHIKV replication inhibitors.

MOTS-CLES : Virologie – Chikungunya – Réplication – Réplicon – Modèle cellulaire

Université de Bordeaux – U.F.R des Sciences Pharmaceutiques

146 rue Léo Saignat – 33076 Bordeaux cedex