

**THESE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité Immunologie

Ecole doctorale Physiologie et Physiopathologie (ED 394)

Présentée par

**Mlle Caroline PETITDEMANGE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

**« Etude des cellules NK au cours des infections par le  
virus du Chikungunya et le virus de la Dengue. »**

Soutenue le Vendredi 16 mai 2014

Devant le jury composé de :

Dr. Vincent Vieillard, Co-directeur

Dr. Eric Leroy, Co-directeur

Dr. Olivier Schwartz, Rapporteur

Dr. Sylvain Baize, Rapporteur,

Dr. Christelle Retière, Examinatrice

Pr. Patrice Debré, Examineur

Pr. Henri Agut, Président du jury

---

Université Pierre & Marie Curie – Paris 6  
Bureau d'accueil, inscription des doctorants  
Esc G, 2<sup>ème</sup> étage  
15 rue de l'école de médecine  
75270-PARISCEDEX 06

Tel. Secrétariat: 01 42 34 68 35  
Fax: 01 42 34 68 40  
Tél. pour les étudiants de A à EL: 01 42 34 69 54  
Tél. pour les étudiants de EM à MON: 01 42 34 68 41  
Tél. pour les étudiants de MOO à Z: 01 42 34 68 51  
E-mail: [scolarite.doctorat@upmc.fr](mailto:scolarite.doctorat@upmc.fr)

# Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	<b>1</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>3</b>
<b>Résumé en Français</b> .....	<b>4</b>
<b>English Summary</b> .....	<b>5</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>6</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>8</b>
<b>Préambule</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Cellules NK et immunité antivirale : modifications phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK au cours des infections virales</b> .....	<b>10</b>
1.1. Activation précoce des cellules NK.....	10
1.2. Modalités de l'activation des cellules NK.....	10
1.3. Implications des cellules NK sur l'évolution de l'infection et/ou la maladie.....	12
1.3.1. Influence des cellules NK sur l'infection.....	12
1.3.2. Influence des cellules NK sur la maladie.....	13
1.4. Déplétion et immunodéficience: implication directe des cellules NK.....	14
<b>2. Qu'est-ce qu'une cellules Natural Killer ?</b> .....	<b>15</b>
2.1. Définition morphologique, phénotypique et fonctionnelle.....	15
2.1.1. Morphologie et phénotype des cellules NK.....	15
2.1.2. Les fonctions effectrices des cellules NK.....	18
2.1.2.1. La cytotoxicité.....	18
2.1.2.2. La production de cytokines.....	20
2.2. Les récepteurs NK et leur mode d'activation : intégration de signaux négatifs et positifs.....	21
2.2.1. Les récepteurs inhibiteurs.....	22
2.2.2. Les récepteurs activateurs.....	37
2.2.3. Les autres récepteurs.....	32
2.3. Régulation du seuil d'activation des cellules NK.....	34
2.4. Implications du polymorphisme génétique des récepteurs KIR dans la susceptibilité/résistance aux infections.....	36
2.5. Les interactions NK/DCs.....	38
2.5.1. Les cellules NK induisent la maturation des DCs.....	38
2.5.2. Lyse des DCs par les cellules NK.....	38
2.5.3. Les DCs activent les cellules NK.....	39
2.5.4. Exemples d'interactions NK/DCs dans le contrôle d'infections virales.....	41
2.6. Échappement viral à la reconnaissance par les cellules NK.....	42
<b>3. Le Chikungunya et la Dengue : unité et divergences de deux arbovirus</b> .....	<b>45</b>
3.1.1. Taxonomie et classification.....	47
3.1.2. Structure, organisation des génomes et cycles de réplication.....	53
3.2. Vecteurs et réservoirs.....	53
3.2.1. Vecteurs.....	55
3.2.2. Réservoirs.....	56
3.3. Historique des épidémies.....	61

3.4. La maladie.....	61
3.4.1. Les manifestations cliniques.....	61
3.4.2. Le diagnostic biologique.....	67
3.4.3. Traitements et pistes vaccinales.....	70
3.4.3.1. Traitements.....	70
3.4.3.2. Pistes vaccinales.....	70
3.4.4. Mesures de prévention.....	72
3.5. Physiopathologie des infections.....	73
3.5.1. Physiopathologie du Chikungunya.....	73
3.5.2. Physiopathologie de la Dengue.....	77
3.6. Les modèles animaux.....	82
3.6.1. Expérimentation chez la souris.....	82
3.6.2. Expérimentation chez les primates non humains.....	83
<b>Objectifs</b> .....	84
<b>Résultats</b> .....	87
<b>Projet 1A:</b> Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules NK chez des patients infectés par le CHIKV au cour de l'épidémie de 2007 à Libreville, Gabon <b>Article 1 :</b> « <i>Unconventional Repertoire profile is imprinted during acute Chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity</i> » .....	88
<b>Projet 1B:</b> Etude longitudinale des cellules NK et des lymphocytes T chez des patients infectés par le CHIKV, DENV-2 ou coinfectés par les deux virus au cours de l'épidémie de 2010 à Franceville au Gabon – <b>Article 2 :</b> « <i>Longitudinal Study of NK and T cell population in CHIKV, DENV-2 and CHIKV/DENV-2 co-infected patients</i> » .....	104
<b>Projet 2:</b> Etude génétique de l'association des récepteurs KIR avec les molécules HLA de Classe-I chez des patients infectés par le CHIKV ou DENV-2 <b>Article 3 :</b> « <i>Association of HLA Class-I and Inhibitory KIR Genotypes in Gabonese Patients infected by Chikungunya or Dengue type-2 viruses</i> ».....	131
<b>Projet 3:</b> Etude <i>in vitro</i> des cellules dendritiques infectées par le DENV-2 ainsi que des interactions entre les cellules NK et les cellules dendritiques après infection <b>Article 4 :</b> « <i>Natural Killer/ dendritic cell cross-talk during Dengue virus serotype-2 infection</i> ». ....	148
<b>Projet 4 :</b> Etude des coinfections CHIKV/DENV-2 dans un modèle expérimental chez le macaque Rhésus.....	168
<b>Discussion</b> .....	176
<b>Conclusions générales/ perspectives</b> .....	188
<b>Références</b> .....	192
<b>Annexe</b> .....	219

# Remerciements

**Je remercie particulièrement mes directeurs de thèse Vincent Vieillard et Eric Leroy pour leur encadrement et leur soutien au cours de ces 4 années de doctorat.**

**Merci !**

**J e remercie l'ensemble des membres de mon jury : Olivier Schwartz, Sylvain Baize, Christelle Retière, Patrice Debré et Henri Agut qui me font l'honneur d'évaluer ces travaux.**

**Merci à,**

Abla Achour, Nadia Wauquier, Baptiste hervier, Jehane Fadlallah, Juliana Rey, Vivien Beziat, Alexis Sennepin, Isabelle Nel, Driss Chader, Pauline Robinet, Steeve Sagon, Virginie Rougeron, Franck Prugnonle, Nicolas Berthet, Heidi Lancon, Nil Rahola, Fabian Schmidt, Sonia Lekana, Philippe Engandja, Dieudonné Nkoghe, Anais Herbet, James Brown, Barthelemy Ngoubangoye, Gael Maganga, Gabin Maguene, Cécile d' Archangues, Marine Ridoux, Cécile Richard et Xavier sengelen, Cécile Jeune, Thomas Guillaume, Jean Fougerol, Juliette Moltes, Joanne Collombet, Parvati Nauche, JC, Anne-Charles-Baptiste Aussedat, Emilie Haenggi, Famille Michel, Famille Petit, Anne-Marie et Maurice Petit, Suzanne et Jacques Petitdemange, Anne-Christophe-Jeab-Baptiste-Vincent-Michel-Marie-Josèphe Petitdemange, Jaïd Seddak.

Laboratoire d'immunologie (CERVI ) de l'hôpital La Pitié-Sâlpétrière

Unité des Maladies Virales Emergentes du CIRMF au Gabon



## Résumé en Français

Les virus du Chikungunya (CHIKV) et de la dengue (DENV) sont deux virus émergents qui sévissent dans les régions tropicales et subtropicales du monde entier et qui sont transmis par les moustiques du genre *Aedes*. Ces dernières années, leur transmission a surtout progressé dans les zones urbaines et périurbaines touchant des millions d'individus et faisant de ces deux pathogènes des sujets majeurs de préoccupation pour la santé publique.

Le Chikungunya et la Dengue sont des infections dites aiguës entraînant une mise en place rapide de la réponse immunitaire innée qui joue un rôle majeur dans le contrôle et l'évolution de la maladie. Les cellules Natural Killer (NK) représentent une population cellulaire clé de la réponse innée et jouent un rôle crucial dans les mécanismes de défense mis en place.

A travers des études *ex vivo* et *in vitro*, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des cellules NK à travers (i) une étude phénotypique et fonctionnelle des cellules NK chez des patients infectés en phase aiguë par le CHIKV, DENV-2 ou par les deux virus et (ii) à la caractérisation des interactions entre les cellules NK et les cellules cibles infectées par le virus.

Au cours des dernières épidémies, plusieurs cas de patients coïnfectés par les deux virus ont été répertoriés. De plus, l'expansion géographique des moustiques *Aedes* pourrait amener à une augmentation du nombre de cas de coïnfections sans que les mécanismes sous jacents aux coïnfections ne soient étudiés. Afin de pouvoir répondre à certaines questions concernant ce phénomène, nous avons mis en place un modèle expérimental de coïnfection par CHIKV et DENV-2 chez le macaque Rhésus.

L'ensemble de ces données va contribuer à mieux identifier l'implication des cellules NK dans le contrôle des infections par le CHIKV et DENV-2 permettant ainsi de mieux comprendre les mécanismes à l'origine des dérèglements de la réponse immunitaire.

## English summary

Chikungunya (CHIKV) and Dengue (DENV) virus are both re-emerging viruses transmitted by *Aedes* mosquitoes and responsible for widespread outbreaks in tropical and subtropical countries. Recently, transmission of both viruses has emerged in urban and peri-urban areas infecting millions of individuals.

Chikungunya and Dengue are both acute infections where innate immunity plays a crucial role in the control and evolution of disease. Natural Killer cells (NK) represent one of the major cellular populations of innate immunity and play a crucial role for host defense.

We have characterized NK cells *ex vivo* and *in vitro* by (i) phenotypic and functional study of NK cells in CHIKV, DENV-2 infected patients or CHIKV/DENV-2 co-infected patients and (ii) characterization of NK cells interactions with infected target cells.

During the last outbreaks, several cases of co-infected patients were reported. Moreover, geographic spread of *Aedes* mosquitoes could explain the increased number of cases suffering from co-infection without underlying mechanisms. In order to respond to certain questions regarding co-infections, we created a co-infected CHIKV and DENV-2 experimental model in Rhesus macaques.

Together, these data will contribute to better identify the implication of NK cells in the control of CHIKV and DENV-2 infections. This provides a better comprehension of the underlying mechanisms resulting in immune system disorder.

## Abréviations

<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>ADCC</b>	<i>Antibody-dependent cell cytotoxicity</i>
<b>ADE</b>	<i>Antibody Dependant Enhancement</i>
<b>AICL</b>	<i>Activation-Induced-C type-Lectin</i>
<b>ALAT</b>	Alanine Transaminases
<b>AP-1</b>	<i>Activator Protein 1</i>
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>ASAT</b>	Aspartate Transaminases
<b>CD</b>	Cluster de Différenciation
<b>CHIKV</b>	Virus Chikungunya
<b>CIRMF</b>	Centre International de Recherches Médicales de Franceville
<b>CMH</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
<b>CRP</b>	Protéine C Réactive
<b>CPA</b>	Cellules Présentatrices d'Antigène
<b>DC</b>	<i>Dendritic Cell</i>
<b>DC-SIGN</b>	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Nonintegrin</i>
<b>DENV</b>	Virus de la Dengue
<b>DNAM</b>	<i>DNAX Accessory Molecule</i>
<b>EBOV</b>	Virus Ebola
<b>EBV</b>	Virus d'Epstein-Barr
<b>ECP</b>	Effet Cytopathogène
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>FasL</b>	Ligand Fas
<b>Fc</b>	Fraction Cristallisable
<b>FD</b>	Fièvre Dengue
<b>FHD</b>	Fièvre Hémorragique de Dengue
<b>FITC</b>	<i>Fluorescein IsoThioCyanate</i>
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocytes Macrophages-Colony Stimulating Factor</i>
<b>GP</b>	Glycoprotéine
<b>HCMV</b>	<i>Human CytoMegalovirus</i>
<b>HIA</b>	<i>Hemmagglutination Inhibition Assay</i>
<b>HLA</b>	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
<b>IFN</b>	Interféron
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IgG</b>	Immunoglobuline G
<b>IgM</b>	Immunoglobuline M
<b>IIF</b>	<i>Indirect Immunofluorescence</i>
<b>IL</b>	Interleukine

<b>ILT</b>	<i>Immunoglobulin Like Transcript</i>
<b>ITAM</b>	<i>Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif</i>
<b>ITIM</b>	<i>Immunoreceptor Tyrosine based Inhibition Motif</i>
<b>KIR</b>	<i>Killer cell Immunoglobulin-like Receptor</i>
<b>KO</b>	<i>Knock Out</i>
<b>LASV</b>	Virus de Lassa
<b>LB</b>	Lymphocyte B
<b>LIR</b>	<i>Leukocyte Ig-Like Receptor</i>
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>LT</b>	Lymphocyte T
<b>LTc</b>	Lymphocyte T Cytotoxique
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
<b>MIC</b>	<i>MHC class I chain-related protein A</i>
<b>MIP</b>	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
<b>NASBA</b>	<i>Nucleic Acid Sequence Based Amplification</i>
<b>NCR</b>	<i>Natural Cytotoxicity Receptors</i>
<b>NFκB</b>	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PAMPs</b>	<i>Pathogen-Associated Microbia Pattern</i>
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PFU</b>	<i>Particle Forming Unit</i>
<b>RANTES</b>	<i>Regulated on Activation Normal T Expressed and Secreted</i>
<b>RT-PCR</b>	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
<b>SCID</b>	Severe Combined Immunodeficient Disease
<b>SIDA</b>	Syndrme d'Immuno-Déficience Acquise
<b>TCR</b>	<i>T-Cell Receptor</i>
<b>TGF</b>	<i>Tumor Growth Factor</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
<b>TRAIL</b>	<i>Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing ligand</i>
<b>ULBP</b>	UL16 Binding Protein
<b>VHB</b>	Virus de l'Hépatite B
<b>VHC</b>	Virus de l'Hépatite C
<b>VIH</b>	Virus de l'Immunodéficence Humaine
<b>VLP</b>	Virus-Like Particles
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>

# **- INTRODUCTION -**

## Préambule

L'incidence de la Dengue et du Chikungunya progresse actuellement de manière importante, inscrivant aujourd'hui ces infections aux rangs de maladies dites « ré-émergentes ». Le nombre de cas de dengue est estimé à 50 millions par an, dont 500 000 cas de dengue hémorragique mortels dans plus de 20% des cas (*WHO, 2009*). Le Chikungunya reste une infection bénigne et le nombre de cas mortels est assez faible, mais elle est reconnue pour être à l'origine d'arthralgies aiguës et chroniques fortement invalidantes (*Gerardin P et al. 2008; Simon F et al. 2011*). Le rôle de l'immunité contre les infections à CHIKV et à DENV reste encore mal compris et l'absence de modèles animaux n'a pas permis de développer de traitements thérapeutiques ou de vaccins efficaces impliquant donc une simple prise en charge symptomatique.

Au cours des formes classiques de DENV et CHIKV, la virémie est rapidement contrôlée suggérant la mise en place d'une réponse immunitaire innée robuste et efficace. Néanmoins, les formes cliniques de Dengue et Chikungunya sont variées: il existe des formes asymptomatiques, des formes de dengue sévères et des formes de Chikungunya chroniques (*Harris E et al. 2000; Simon F et al. 2011*). Les mécanismes sous-jacents au développement de ces formes ne sont pas bien compris et l'exploration des mécanismes de l'immunité innée peut apporter des pistes pour expliquer ces différences.

Les cellules Natural Killer (NK) constituent une population cellulaire centrale de l'immunité innée. Elles possèdent des fonctions cytotoxiques mais aussi des fonctions immuno-régulatrices pouvant influencer sur les réponses immunes adaptatives. La réponse cellulaire NK a été très peu étudiée dans les infections à CHIKV et DENV et a fait l'objet de mon travail de thèse. Nous avons mené, en parallèle, une analyse des cellules NK dans les infections à CHIKV, DENV-2 ou CHIKV/DENV-2 et ceci nous a permis de mettre en évidence des points communs et des divergences dans la réponse de ces cellules en fonction des virus impliqués. Ceci nous a également permis de comparer les réponses des patients monoinfectés à celles de patients coinfectés par les deux virus, amenant de nouvelles données quant au type de réponse immune induite au cours d'une telle coinfection.

L'efficacité de la réponse immune réside dans la redondance des réponses mises en jeu. Nous nous sommes donc également intéressés à la réponse des lymphocytes T au cours de ces infections ainsi qu'aux interactions des cellules NK avec les cellules dendritiques au cours de l'infection par le DENV-2.

## **1. Cellules NK et immunité antivirale : modifications phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK au cours des infections virales**

Le rôle des cellules NK au cours des infections virales repose sur trois types de données :

- les modifications phénotypiques et fonctionnelles indiquant une activation des cellules NK
- la corrélation entre l'activation des cellules NK et l'évolution de l'infection virale (corrélation avec la charge virale) et/ou la maladie (conséquences immunopathologiques).
- les travaux expérimentaux et d'immunodéficiences des cellules NK

### **1.1. Activation précoce des cellules NK**

Suite à une infection virale, les cellules NK sont parmi les premières cellules cytotoxiques à être activées et recrutées sur le site de l'infection.

Plusieurs observations au cours des infections virales indiquent que les cellules NK peuvent être activées : on observe l'augmentation de l'expression des marqueurs d'activation CD69 et HLA-DR, une sécrétion d'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ) et le développement des fonctions cytotoxiques (*Muntasell A et al. 2013*).

### **1.2. Modalités de l'activation des cellules NK**

Classiquement, dans les heures suivant une infection virale, un pic de cytokines, principalement d'interféron de type I (IFN- $\alpha/\beta$ ) et d'IL-12, précède l'activation des cellules NK (*Samuel CE et al. 2001*). Le déclenchement de la réponse interféron est spécifique de l'infection par des virus. Ce sont des protéines antivirales que toutes les cellules de l'organisme peuvent synthétiser mais qui ne deviennent actives qu'en présence de virus. Les IFN-I activent des voies de signalisation qui induisent l'expression d'une centaine de gènes de réponse aux IFN-I, entraînant la synthèse de multiples protéines à action antivirale. En plus de leur activité directe sur le contrôle de la dissémination du virus, les IFN-I jouent un rôle primordial dans l'activation des cellules NK. La stimulation des NK par les IFN-I favorise le développement de leurs fonctions cytotoxiques effectrices ainsi que leur prolifération.

Les cellules NK sont aussi activées par l'IL-12 et le TNF- $\alpha$ , deux cytokines produites par les macrophages au début de nombreuses infections et qui induisent une production de cytokines, majoritairement l'IFN- $\gamma$  (*Nguyen KB et al. 2002; Tripp CS et al. 1993*). La présence de ces différentes cytokines entraîne l'activation des cellules NK pendant les stades initiaux de l'infection virale pouvant bloquer ou contenir l'infection le temps nécessaire à la mise en place de la réponse adaptative.

Une troisième population cellulaire, les cellules dendritiques (DCs), représentent également un élément majeur dans l'activation initiale des cellules NK. Elles sont une source importante d'IL-12, d'IL-18 et d'IFN-I qui activent les fonctions NK (*Banchereau J et al. 1998*). De nombreux travaux ont montré que les cellules NK et les DCs s'activaient réciproquement au cours d'une réponse immunitaire (*Cooper MA et al. 2004*). Ce point sera développé ultérieurement dans le paragraphe 2.5.

L'activation des cellules NK peut également provenir de l'engagement de récepteurs activateurs NK (*se référer au paragraphe 2.2.2. pour la description des récepteurs activateurs*) par des ligands exprimés à la surface de la cellule infectée et dont l'expression est induite par le stress cellulaire.

Enfin, les cellules NK peuvent être activées par une interaction directe des protéines ou des peptides viraux agissant sur les récepteurs d'activation. Par exemple, l'interaction du récepteur NKp46 avec l'hémagglutinine du virus influenza ou l'hémagglutinine-neuramidase du virus Sendai (*Mandelboim O et al. 2001*). Il a également été reporté que l'interaction du récepteur NKp44 avec la glycoprotéine E du DENV pouvait activer les cellules NK (*Hershkovitz O et al. 2009*).

Une fois stimulées et activées, les cellules NK exercent leurs fonctions antivirales selon les trois grands mécanismes qui seront décrits dans la deuxième partie : (i) la production de cytokines (ii) le relargage de granules cytotoxiques et (iii) la lyse de la cellule cible. Selon le degré d'activation et les voies effectrices impliquées, la réponse NK sera plus ou moins efficace. Cela dépendra également du pathogène viral et des mécanismes d'échappement qui lui sont spécifiques.

La régulation de l'activité NK jouera également un rôle majeur sur la pathogénèse et l'issue de l'infection. L'IFN- $\gamma$  produit par les cellules NK est notamment un puissant activateur des macrophages qui sont une source majeure d'IL-12 (*Schroder K et al. 2004*). On observe ainsi un système de rétrocontrôle positif stimulant l'activation des deux types cellulaires au niveau du tissu infecté. La production de cytokines par les



macrophages est également importante dans l'initiation de la réponse T. Une fois que les lymphocytes T effecteurs arrivent sur le site de l'infection, ils deviennent une source d'IL-10, une cytokine inhibitrice des fonctions NK (*Moore KW et al. 2001*). On observe dans ce cas un système de rétrocontrôle négatif limitant la réponse des cellules NK.

### **1.3. Implications des cellules NK sur l'évolution de l'infection et/ou de la maladie**

Certaines infections sont éliminées par la réponse innée mais des foyers viraux résiduels à faible titre viral peuvent persister et occasionner des réactivations. Certains virus peuvent également causer des infections persistantes à long terme, associées à un niveau élevé de virus dû à une mauvaise réponse immunologique.

Ainsi, la balance entre la réponse immune fonctionnelle et le titre viral est cruciale dans la détermination de la persistance virale. Les cellules NK peuvent ainsi directement contrôler les infections par certains virus en fonction de leur activation, notamment par la surexpression de protéines induites à la surface des cellules infectées mais peuvent également jouer un rôle direct sur l'évolution de la maladie.

#### **1.3.1. Influence des cellules NK sur l'infection**

Il a été montré que la contribution des cellules NK à l'élimination des virus de la famille des *Herpesviridae* était indispensable. L'infection par le cytomégalovirus humain (HCMV) illustre le mieux le rôle crucial des cellules NK dans le contrôle de ces infections. De nombreux travaux ont montré que les cellules NK contrôlaient le HCMV en stimulant la production d'IFN- $\beta$  par les cellules infectées, inhibant ainsi la propagation du virus (*Iversen AC et al. 2005*). Les cellules NK utilisent également leurs mécanismes cytolytiques pour lyser les fibroblastes infectés et produisent de l'IFN- $\gamma$  (*Borysiewicz LK et al. 1985*).

Si le rôle indispensable des cellules NK est clair dans les infections à herpesvirus, la manière dont les cellules NK influent sur l'évolution d'autres infections virales n'est pas toujours aussi évidente. Par exemple, dans l'infection par le virus de l'Hépatite C (VHC), il a été mis en évidence que les cellules NK, activées par l'IL-2 ou l'IFN- $\alpha$ , étaient en mesure de lyser les hépatocytes infectés avec un réplicon du VHC. Cette lyse est dépendante des perforines/granzymes ainsi que du récepteur CD81 (*Larkin J et al. 2006*). Une autre étude a montré que les cellules NK activées par l'IL-2 étaient capables d'inhiber la réplication du VHC dans les hépatocytes infectés. Le mécanisme semble

dépendre de la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK et l'induction d'IFN- $\alpha/\beta$  par les hépatocytes (*Wang SH et al. 2008*). En parallèle, de nombreux mécanismes mis en place par le virus et venant inhiber les fonctions NK ont également été mis en évidence. Entre autre, la protéine E2 du VHC inhibe la sécrétion de cytokines, la cytotoxicité et la dégranulation des cellules NK (*Crotta S et al. 2002; Tseng CT et al. 2002*).

A l'inverse, le virus peut échapper à la lyse par les cellules NK en inhibant la fonction des ces cellules. Ainsi, une absence d'activation totale des cellules NK est reportée dans certaines infections, induisant des conséquences dramatiques sur l'issue de l'infection. C'est le cas par exemple, de l'infection par le virus Ebola (EBOV). Des travaux ont montré que le nombre de cellules NK diminuait chez les patients infectés par EBOV. De plus il a été observé que EBOV n'entraînait pas d'activation ni de prolifération des cellules NK chez la souris (*Warfield KL et al. 2002*). Elles demeurent incapables de produire des cytokines ou de lyser les cellules infectées et donc de contrôler l'infection par EBOV. Il est à noter que cette infection est associée à une absence de production d'IFN-I ce qui pourrait expliquer l'absence d'activation des cellules NK (*Chang TH et al. 2009*).

### **1.3.2. Influence des cellules NK sur la maladie**

Il a été établi que les NK pouvaient apporter une protection précoce contre la propagation du virus de l'immunodéficience humaine de type-1 (VIH-1). Cependant, il semble que les cellules NK aient aussi un rôle immunopathogène au cours de la phase chronique de l'infection. En effet, les cellules NK participeraient également à la déplétion en cellules T-CD4 et ainsi à l'augmentation de la charge virale. Les cellules T-CD4 non infectées expriment le ligand NKp44L à leur surface, induit par un motif spécifique de la protéine d'enveloppe gp41 du VIH-1, les rendant alors sensibles à la lyse médiée par les cellules NK activées qui expriment le récepteur NKp44. Par contre, le VIH-1 induit par le biais de la protéine virale Nef, l'internalisation de ce ligand dans les cellules T-CD4 infectées les protégeant ainsi de la lyse NK (*Vieillard V et al. 2005; Fausther-Bovendo H et al. 2009*).

Ainsi, les cellules NK jouent un rôle primordial dans le contrôle de certaines infections virales mais peuvent aussi contribuer à l'induction de réponses immunes défectueuses. L'issue de cette réponse dépendra d'abord du type d'activation mais aussi de l'efficacité des fonctions effectrices et des mécanismes de régulation impliqués. Le type de virus

jouera nécessairement un rôle important, notamment à travers les mécanismes mis en place pour échapper au contrôle par les cellules NK (voir paragraphe 2.5 pour les mécanismes d'échappement viraux).

#### **1.4. Déplétion et immunodéficience: implication directe des cellules NK**

Le rôle déterminant des cellules NK dans le contrôle de certaines infections virales *in vivo* a été définitivement établi dans des modèles physiopathologiques murins. Des modèles de souris qui reproduisent certaines immunodéficiences NK humaines ont été mis en place (*Fisher A et al.*). La déplétion *in vivo* des cellules NK par injection d'anticorps dirigés contre des marqueurs préférentiellement exprimés sur ces lymphocytes entraîne une augmentation significative de la réplication de certains virus, voire la mort des animaux (*Biron CA et al. 1999*). Réciproquement, le transfert de cellules NK isolées de souris résistantes à l'infection permet de protéger des souris sensibles (*Bukowski JF et al. 1985*).

Une sensibilité accrue à l'infection par différents virus a également été détectée chez des patients atteints d'immunodéficience affectant les cellules NK. Le cas le plus emblématique reste celui, décrit en 1990, d'une adolescente atteinte d'infections sévères et récidivantes par plusieurs virus de la famille *Herpesviridae* (*Biron CA et al. 1989*). Cette jeune fille était totalement dépourvue de cellules CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ou CD16<sup>+</sup> mais présentait un compartiment lymphocytaire T et B normal. Une autre patiente, affectée par des carcinomes récidivants du col de l'utérus suite à l'infection par le papillomavirus humain, s'est également avérée déficiente en cellules NK (*Ballas ZK et al. 1990*). Ces deux cas font partie des quelques exemples connus de déficit sélectif en cellules NK et viennent confirmer le rôle crucial de ces cellules dans le contrôle des infections virales.

Ainsi, les cellules NK jouent un rôle primordial dans le contrôle des infections virales. Afin de mieux comprendre le fonctionnement d'une cellule NK nous allons développer, dans la partie suivante, les caractéristiques majeures de cette population cellulaire.

## 2. Qu'est-ce qu'une cellule Natural Killer ?

### 2.1. Définition morphologique, phénotypique et fonctionnelle

Les cellules « Natural Killer » (NK) ont été décrites au début des années 1970, au cours de recherches sur la capacité des lymphocytes T à lyser des cellules tumorales chez des souris préalablement immunisées. Au cours de ces expériences, les chercheurs mettent en évidence des cellules encore non répertoriées, exerçant une cytotoxicité spontanée dirigée contre les cellules tumorales (*Kiessling R et al. 1975*). Elles sont alors nommées « Natural Killer » en référence à leur capacité fonctionnelle à lyser les cellules cibles de manière naturelle, c'est-à-dire, sans exposition préalable à la cellule cible. Elles sont également définies en opposition aux lymphocytes T cytotoxiques (LTCs) dont la cytotoxicité est restreinte à la présentation antigénique par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (*Germain RN et al. 1996*). Plus tard, des études ont montré que les cellules NK ont une origine lymphoïde commune avec les lymphocytes T (*Spits H et al. 1995*) mais que, contrairement à ces derniers et aux lymphocytes B, elles ne nécessitent pas de réarrangements géniques pour leur différenciation et l'acquisition de leurs fonctions (*Hackett J et al. 1986*). Elles sont alors considérées comme faisant partie de l'immunité innée.

#### 2.1.1. Morphologie et phénotype des cellules NK

Chez l'homme, les cellules NK représentent en moyenne 5 à 20% des cellules nucléées du sang périphérique. On les retrouve également au sein des organes lymphoïdes (rate, amygdales, ganglions périphériques) et dans certains tissus (dont le foie, poumon, placenta). Elles possèdent un cytoplasme bien développé contenant des granules cytotoxiques. Les cellules NK sont phénotypiquement caractérisées par l'expression du marqueur de surface CD56 et l'absence du CD3 (*Robertson MJ et al. 1990*) (**Figure 1A**). Deux sous-populations majeures de cellules NK sont communément définies selon la densité d'expression des marqueurs de surface CD56 et CD16 (*Cooper MA et al. 2001*). Elles présentent des distributions et des fonctions différentes:

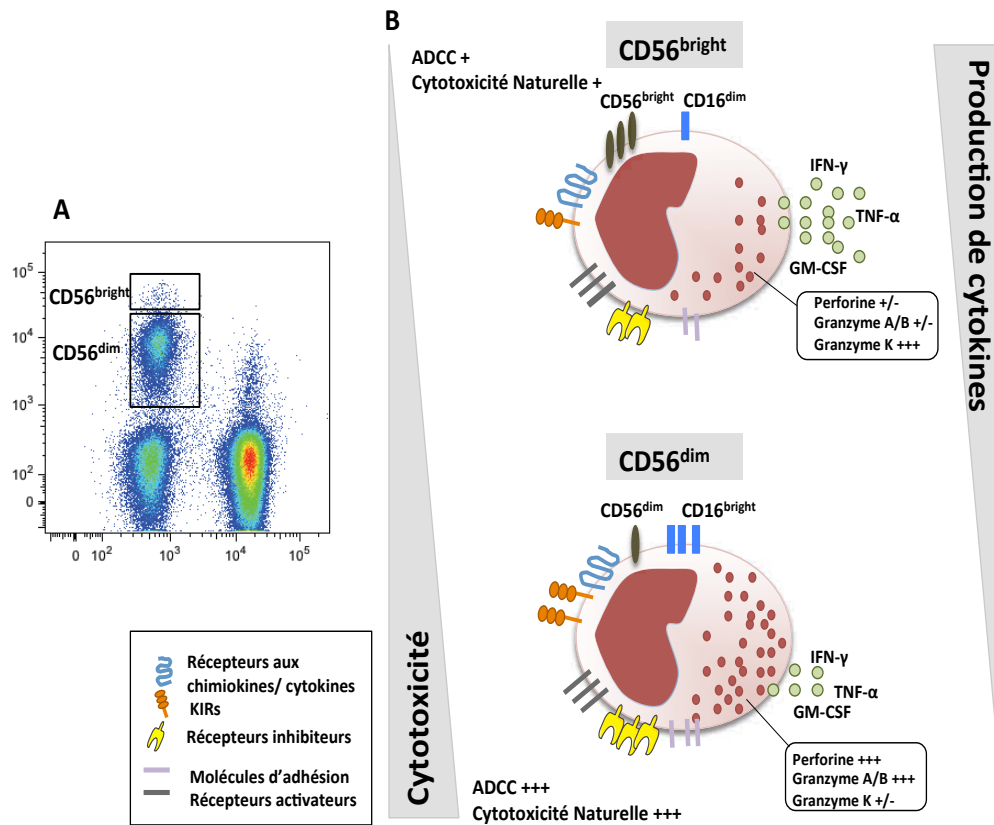
Les cellules **NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup>** représentent environ 90% des NK dans le sang, la rate et le foie, mais 10% des NK dans les ganglions lymphatiques et les amygdales. Elles possèdent de nombreux granules lytiques les rendant fortement cytotoxiques mais un

faible pouvoir prolifératif et produisent peu de cytokines en réponse à une stimulation par des monokines (*Cooper MA et al.*).

Les cellules NK  $CD56^{bright} CD16^{dim/-}$ , à l'inverse, représentent environ 10% des NK dans le sang mais 90% des NK dans les ganglions lymphatiques et les amygdales. Elles ont un fort potentiel prolifératif, sont moins cytotoxiques que les NK  $CD56^{dim} CD16^{+}$  mais produisent de grandes quantités de cytokines et chimiokines après activation (*Cooper MA et al. 2001*).

Il est à noter que des travaux récents sur la différenciation des cellules NK ont montré que les cellules  $CD56^{bright}$  sont les précurseurs des  $CD56^{dim}$ , mais les mécanismes impliqués dans cette transition restent à éclaircir (*Yu et al. 2010; Beziat V et al. 2010*).

L'expression  $CD56^{bright}$  ou  $CD56^{dim}$  corrèle également avec le nombre de récepteurs de surface exprimés, conférant à chaque sous-population leurs propriétés fonctionnelles spécifiques. (**Figure 1B**).



**Figure 1. Les sous-populations NK.** A. Les cellules NK représentent 5-20% des lymphocytes sanguins chez l'homme. En cytométrie en flux, on les définit sur la base de l'expression de CD56 et de l'absence de CD3. En fonction de l'intensité d'expression du CD56, on distingue 2 sous-populations NK : NK CD56<sup>bright</sup> et NK CD56<sup>dim</sup>. B. Les sous-populations NK CD56<sup>bright</sup> et CD56<sup>dim</sup> présentent un répertoire et un arsenal cellulaire différents pouvant expliquer les différences de fonctions observées entre les deux sous-populations.

## 2.1.2. Les fonctions effectrices des cellules NK

### 2.1.2.1. La cytotoxicité

Les cellules NK sont capables de fonctions effectrices directes antivirales et antitumorales. Elles peuvent reconnaître et éliminer, sans immunisation préalable, des cellules tumorales ou des cellules infectées par différents agents pathogènes. Cette fonction est nommée « cytotoxicité naturelle ». Deux mécanismes principaux sont impliqués: (i) l'exocytose de granules cytotoxiques perforine/granzymes (*granule-associated enzymes*) et (ii) la synthèse de ligands se fixant aux « récepteurs de mort » présents sur la cellule cible. Enfin, les cellules NK peuvent également détruire les cellules cibles par (iii) une activité cytolytique dépendante des anticorps (ADCC).

#### (i) la voie perforine/granzymes

L'exocytose de granules cytotoxiques est un mécanisme commun aux cellules NK et aux LTCs. A la différence des LTCs qui synthétisent les granules seulement après rencontre avec l'antigène spécifique, les cellules NK forment les granules au cours de leur développement, leur permettant ainsi de répondre très rapidement face à une cellule tumorale ou infectée (*Colucci F et al. 2003*). Les granulations azurophiles, qui sont des lysosomes renfermant des estérases (Granzymes) et une protéine la perforine, sont capables de lyser la membrane cellulaire.

**La perforine** est une protéine monomérique formant des pores, à l'instar de la protéine C9 du complément avec laquelle elle partage des propriétés structurales et fonctionnelles. Ce sont des travaux réalisés chez des souris déficitaires (KO) qui ont permis de mettre en évidence le rôle crucial de la perforine dans la cytotoxicité. Les souris KO pour la perforine présentent une sensibilité accrue aux tumeurs mais également à différents agents pathogènes (*Kagi D et al. 1994*). En se fixant à la membrane de la cellule cible et en formant des canaux transmembranaires, la perforine permet le passage des granzymes vers le cytoplasme des cellules cibles, déclenchant ensuite le mécanisme d'apoptose (*Cullen SP et al. 2008*).

**Les granzymes** forment un groupe de sérine-protéases composé de 5 membres (granzyme A, B, H, K, M) qui sont aussi libérés lors de l'exocytose des granules (*Anthony DA et al. 2010*). De nombreux travaux réalisés *in vitro* se sont surtout focalisés sur l'étude des granzymes A et B. Ces travaux ont montré que l'activité des granzymes semblait être dépendante de la perforine, qui en formant des pores leur

permet d'accéder au cytoplasme (*Cullen SP et al. 2008*). Il est intéressant de noter que la Granzyme K est plutôt associée à un état immature de la cellule NK (CD56<sup>bright</sup>) alors que les Granzymes A et B sont associées aux CD56<sup>dim</sup> (*Beziat V et al. 2011*).

Ainsi, la perforine et les granzymes semblent agir en synergie, les granzymes entrant dans la cellule cible par des pores formés par la perforine.

## **(ii) La voie engageant les « récepteurs de mort »**

Les cellules NK expriment des ligands qui se lient à des « récepteurs de mort » présents à la surface des cellules cibles. L'engagement de ces récepteurs induit l'apoptose par activation de voies dépendantes des caspases (*Thorburn A et al. 2004*). Ces ligands appartiennent à la superfamille du TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*) et sont des protéines membranaires de type II (*Baker SJ et al. 1998*).

**Le système Fas.** Le ligand Fas (FasL) se lie au récepteur Fas présent à la surface des cellules cibles, induisant ainsi le recrutement de protéines impliquées dans la transduction du signal apoptotique (*Chavez-Galan L et al. 2009*). Cette interaction joue un rôle majeur dans la cytotoxicité des NK mais également des LTCs.

**Le système TRAIL (Apo-2L).** Le ligand TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) peut interagir avec cinq récepteurs (TRAIL-R1, -R2, -R3, -R4, -R5). La voie impliquée dans l'induction de l'apoptose est similaire à celle de Fas. L'expression de TRAIL est dépendante du statut d'activation de la cellule. TRAIL est notamment induit par une activation avec de l'IL-15 (*Lum J et al. 2004*)

**Le système TNF-R.** Le TNF- $\alpha$  peut se lier aux récepteurs TNF-RI et TNF-RII. TNF-RI est directement impliqué dans l'induction de l'apoptose alors que TNF-RII joue un rôle dans la régulation de l'apoptose via TNF-RI et dans l'activation des voies NF- $\kappa$ B et AP-1. De par leur affinité différente, TNF-RI est activé plus fortement par la forme soluble du TNF- $\alpha$ , tandis que TNF-RII est stimulé majoritairement par la forme membranaire du TNF- $\alpha$  à travers un contact direct de cellule à cellule (*Declercq W et al. 1998*).

Actuellement, le rôle et l'importance relative de chacun de ces systèmes dans la lyse directe médiée par les cellules NK n'est pas clairement établi bien que la voie perforine/granzyme semble être prédominante.



### (iii) L'ADCC

Les cellules NK expriment le récepteur de faible affinité FcγRIII (CD16), qui reconnaît préférentiellement les sous-classes d'immunoglobulines (*Ig*) IgG1 et IgG3 tandis que IgG2 et IgG4 sont faiblement reconnues, induisant l'attaque cytotoxique des cellules cibles recouvertes d'anticorps (*Kipps TJ et al. 1985*). Ce mécanisme est appelé cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC, *Antibody Dependent cell-mediated cytotoxicity*). Les cellules NK CD56<sup>bright</sup> expriment peu ou pas de CD16 et sont donc bien moins efficaces pour l'ADCC que les CD56<sup>dim</sup> (*Nagler A et al. 1989*). D'autres populations cellulaires portent le récepteur FcγR et sont capables d'ADCC (*Perussia B et al. 1984; Rumpold H et al. 1982*). Le rôle biologique de l'ADCC a été mis en évidence dans le rejet de greffe, les maladies auto-immunes, la défense antitumorale, antiparasitaire et antivirale. Par exemple, le Rituximab, un anti-CD20, est couramment utilisé en clinique dans le traitement des lymphoproliférations B (*Binyamin L et al. 2008 ; Benichou G et al. 2011*).

#### 2.1.2.2. La production de cytokines

La production de cytokines et chimiokines par les cellules NK permet de réguler les réponses immunes, la migration et la survie des cellules. En ce sens, les cellules NK ne sont pas simplement des cellules tueuses de l'immunité innée mais également des cellules permettant la régulation des réponses inflammatoires et la mise en place des réponses immunes adaptatives (*Fauci AS et al. 2005*)

- **Les cytokines**

Une fois activées, les cellules NK produisent majoritairement de l'IFN-γ mais aussi du TNF-α, TGF-β (*Transforming growth factor*), GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*), IL-3, -5, -8, -10 et -13 (*Cooper MA et al. 2001*). Les types et les quantités de cytokines produites dépendent des conditions de stimulation, des cytokines présentes dans l'environnement et de l'état d'activation des cellules NK. La production d'IFN-γ se fait majoritairement après stimulation par de l'IL-12 et IL-18. Son action oriente la réponse immunitaire vers une réponse de type Th1, active les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) et augmente l'expression des molécules de CMH de classe I (*Wallach D et al. 1982*). De plus, l'IFN-γ active les macrophages afin d'éliminer les pathogènes intracellulaires et a des effets anti-prolifératifs sur les cellules

infectées, malignes ou transformées (*Filipe-Santos O et al. 2006; Maher S et al. 2007*). L'association de l'IL-12 et l'IL-15 favorise une production importante d'IL-10 tandis que l'IL-15 associée à l'IL-18 induit la production de GM-CSF, TGF- $\beta$  et de l'IL-13 (*Cooper MA et al. 2001*). Le GM-CSF est important pour la maturation des cellules dendritiques et des macrophages ainsi que pour la prolifération des polynucléaires (*Tarr PE et al. 1996*). Le TGF- $\beta$  et l'IL-10 sont deux cytokines produites tardivement, qui jouent un rôle important dans l'immunomodulation de la réponse inflammatoire (*Horwitz DA et al. 1999 ; Mehrotra PT et al. 1998*). Contrairement à l'IL-2, l'IL-12 et l'IL-15 qui apportent des signaux positifs aux cellules NK, l'IL-4 et l'IL-13 inhibent l'expression et la fonction des cellules NK (*Cooper MA et al. 2001*). La présence de cibles peut également déclencher la production de cytokines.

- **Les chimiokines**

La fonction principale des chimiokines est d'attirer les autres populations cellulaires sur le site de l'inflammation. Quatre sous-familles de chimiokines ont été définies selon des considérations structurales et génétiques: les CXC-, CC-, C- et CX<sub>3</sub>C-chimiokines. Parmi les chimiokines produites par les NK se trouvent CCL2/MCP-1, CCL3/Mip-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL8/MCP-2, CCL22/MDC, CXCL8/IL-8 et CXCL10/IP-10 (*Maghazachi AA et al. 2002*). Leur production est rapide et précède celle des cytokines (*Lum J et al. 2004*). Elle est déclenchée par l'IL-12/IL-18, IL-12/IL-15 ou par les cellules cibles.

## **2.2. Les récepteurs NK et leur mode d'activation: intégration de signaux négatifs et positifs**

On distingue classiquement deux familles de récepteurs NK : les récepteurs inhibiteurs et les récepteurs activateurs (cf Annexe Tableau des récepteurs des cellules NK). Cette dualité doit plutôt être perçue sous forme de complémentarité dans le sens où les réponses NK sont contrôlées par une balance entre les signaux inhibiteurs et activateurs transmis par les différentes familles de récepteurs (*Vivier E et al. 2011*).

### **2.2.1. Les récepteurs inhibiteurs**

La cytotoxicité naturelle des cellules NK a été étudiée initialement vis-à-vis de lignées tumorales. Des travaux précurseurs ont démontré que la cytotoxicité naturelle était liée à l'expression du CMH de classe I par les cellules tumorales introduisant la théorie du « soi manquant » (*missing self*) (*Ljunggren HG et al. 1990*). Les cellules NK lysent les cellules tumorales qui n'expriment pas le CMH de classe I alors que les mêmes lignées qui l'expriment ne sont pas lysées. Dans les années 1990, la découverte de récepteurs inhibiteurs reconnaissant les molécules du CMH de classe I, a permis d'expliquer la théorie du « soi manquant ». Les récepteurs inhibiteurs appartiennent à deux grandes familles moléculaires de glycoprotéines membranaires : la superfamille des immunoglobulines qui comprend les KIR-L (*killer cell immunoglobulin-like receptors-Long*), et les LIR/ILT (*Leucocyte Immunoglobulin-like Receptor/Immunoglobulin-like Transcript*) et la superfamille des lectines de type C qui comprend les complexes CD94/NKG2A et CD94/NKG2B.

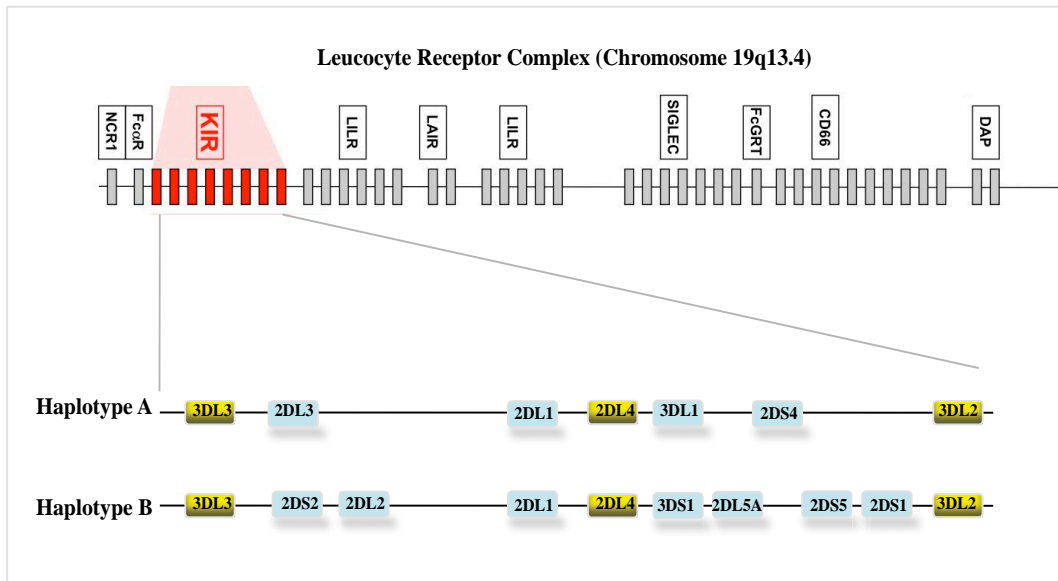
- **La superfamille des immunoglobulines (Ig)**

#### **Les KIRs (*killer cell immunoglobulin-like receptors*)**

Chez l'homme, les gènes KIRs codent pour des glycoprotéines qui se lient aux molécules du CMH de classe I (*Wagtmann N et al. 1995*). Jusqu'à présent, 15 gènes KIRs et 2 pseudogènes ont été décrits. Ils sont regroupés sous le « cluster de différenciation » 158 (CD158), sur le chromosome 19 en position 19q13.4, dans le « leucocyte Receptor Cluster » (LCR) (*Kulkarni S et al. 2008*). Les récepteurs KIRs sont essentiellement exprimés sur les NK CD56<sup>dim</sup> et faiblement sur les CD56<sup>bright</sup> mais aussi sur des sous-populations de lymphocytes T- $\gamma\delta$  et T-CD8 (*Battistini L et al. 1997 ; Anfossi N et al. 2004*). Les gènes KIRs sont répartis dans deux haplotypes A et B. L'haplotype A est invariant et contient essentiellement des gènes KIRs inhibiteurs alors

que l'haplotype B est variable et contient de nombreux gènes KIRs activateurs (*Martin AM et al. 2004*). Une nomenclature internationale regroupe ces gènes en fonction du nombre de domaine Ig extracellulaire et de la longueur du domaine intra-cytoplasmique. Ainsi, KIR2D et KIR3D ont respectivement 2 et 3 domaines Ig et KIRxDL ou KIRxDS désignent les KIRs qui ont respectivement un Long (L=Long) ou un court (S=Short) domaine intra-cytoplasmique (*Wagtmann N et al. 1995; Colonna M et al. 1995*). Les KIR-L sont inhibiteurs grâce à la présence de deux ITIM (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) dans leur domaine intra-cytoplasmique. Les KIR-S qui ont des fonctions activatrices seront donc présentés en détail dans le paragraphe 1.2.2. se référant aux récepteurs activateurs. Le gène KIR2DL4 représente une exception car à l'inverse des autres récepteurs KIR2D, il est exprimé sur toutes les cellules NK et reconnaît une molécule HLA de classe I non classique (*Human Leukocytes Antigen*), le HLA-G (*Le Page ME et al. 2014*). De plus ce récepteur possède à la fois des capacités inhibitrices et activatrices grâce à un acide-aminé présent dans le domaine transmembranaire qui interagit aussi bien avec les motifs ITIM que les motifs ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) (*Rajagopalan S et al. 2012*) (**Figure 2**).

Sept gènes KIRs inhibiteurs (KIR-L) ont été identifiés : KIR2DL1, -2DL2, -2DL3, -2DL5, -3DL1, -3DL2 et 3-DL3. Les KIR-L possèdent des spécificités différentes pour leur ligands HLA-I (*Kulkarni S et al. 2008*). Les récepteurs KIR2DL1, -2DL2 et -2DL3 reconnaissent les ligands HLA-C. (**Figure 3**). Deux groupes de ligands HLA-C sont définis en fonction de la nature de l'acide-aminé présent en position 80 de l'allèle HLA-C. Ainsi, KIR2DL1 reconnaît les allèles HLA-C du groupe 2 (Lysine en position 80 de l'allèle HLA-C), et KIR2DL2, -2DL3 reconnaissent les allèles HLA-C du groupe 1 (Asparagine en position 80 de l'allèle HLA-C) (*Winter CC et al. 1997*). Des travaux réalisés *in vitro* ont montré que les récepteurs KIR2DL2 et -2DL3 se lient avec une affinité plus faible aux HLA-C1 que le récepteur KIR2DL1 aux HLA-C2 (*Moesta AK et al. 2008*). KIR3DL1 reconnaît les allèles HLA-B du groupe Bw4 et quelques HLA-A. Il présente une plus forte affinité pour les HLA-Bw4-80I (Isoleucine en position 80) que pour HLA-Bw4-80T (tryptophane en position 80). KIR3DL2, qui s'exprime sous la forme d'un homodimère contrairement aux autres qui sont sous la forme de monomères, reconnaît certains allèles du HLA-A. Les ligands de KIR2DL5 et KIR3DL3 ne sont actuellement pas identifiés (*Kulkarni S et al. 2008*) (**Figure 3**).



**Figure 2. Organisation du cluster des gènes KIR.** Le cluster des gènes KIR est localisé sur le chromosome 19q13.4 dans le « leukocyte Receptor complex ». Il existe deux haplotypes KIR. L’haplotype A possède un contenu qui ne varie pas. En revanche, l’haplotype B est caractérisé par un nombre variable de gènes. Les gènes présentés en jaune sont les gènes KIR de structure (« Framework »), c’est-à-dire qu’ils sont présents dans tous les haplotypes.

HLA-C Groupe 2	HLA-C Groupe 1	HLA-B Groupe Bw4		HLA-A	HLA-G	
<b>80K</b>	<b>80N</b>	<b>Bw4-80I</b>	<b>Bw4-80T</b>			
C*02	C*01	B*51	B*13	A*03		C*04
C*04	C*03	B*52	B*27	A*11		A*11
C*05	C*07	B*53	B*37			
C*06	C*08	B*57	B*44			
C*15	C*12	B*58				
C*17	C*13	A*24				
	C*14					
<b>KIR2DL1</b>	<b>KIR2DL2/DL3</b>	<b>KIR3DL1</b>	<b>KIR3DL1</b>	<b>KIR3DL2</b>	<b>KIR2DL4</b>	<b>KIR2DS4</b>
<b>KIR2DS1</b>	<b>KIR2DS2</b>	<b>KIR3DS1</b>				
Les ligands 2DL5, 2DS3, 2DS5 et 3DL3 restent non identifiés						

**Figure 3. Ligands des KIR.** Les KIR ont comme ligands les molécules du HLA. Des spécificités pour chacun des 3 HLA classiques (HLA-A, B, C) ont été établies mais également pour HLA-G, un HLA non classique. Il est postulé que KIR2DS1, KIR2DS2 et KIR3DS1 ont les mêmes ligands que leurs homologues inhibiteurs mais avec une moindre affinité. Les HLA-C ayant une Lysine en position 80 (80K) appartiennent au groupe C2 et les HLA-C ayant une Asparagine en position 80 (80N) appartiennent au groupe C1. L’interaction entre KIR3DL1 et HLA-Bw4-80I(Isoleucine en position 80) est plus forte que celle avec les HLA-Bw4-80T (Tryptophane en position 80). Certains KIR n’ont pas encore de ligand connu. Adapté de *Kulkarni, S et col*

**Les LILR/ILT** (*Leucocyte Immunoglobulin-like Receptor/Immunoglobulin-like Transcript*)

Les LILR ou ILT ont été récemment regroupés sous le « cluster de différenciation » 85 (CD85) (*Perussia B et al. 1996*). Ils sont aussi exprimés par les monocytes, lymphocytes B, cellules dendritiques (DCs) et une fraction de lymphocytes T. Cette famille regroupe 13 gènes présents sur le chromosome 19 en position 19q13.4. Outre la localisation chromosomique, ces récepteurs présentent aussi une homologie structurale avec les KIRs. Leurs parties extra-cytoplasmiques se caractérisent par la présence de 2 ou 4 domaines Ig-like. (*Gumperz JE et al. 1996*). Parmi les 13 gènes ILT, seuls 2 gènes ILT2 (LILRB1/LIR1/CD85j) et ILT4 (LILRB2/LIR2/CD85d) codent pour un récepteur inhibiteur spécifique des molécules de CMH de classe I (*Colonna M et al. 1997*). Seule la molécule ILT2 est exprimée par les cellules NK et par certaines sous-populations de LT-CD8 ou LT- $\gamma\delta$ , ILT4 étant plutôt exprimé sur la lignée myélomonocytaire. ILT2 comprend 4 domaines Ig extracellulaires et 4 domaines ITIM intracellulaires lui conférant ses propriétés inhibitrices. Il n'est exprimé que sur les cellules NK CD56<sup>dim</sup> et contrairement aux autres récepteurs NK spécifiques du CMH-I, ILT2 se lie avec une faible affinité à presque tous les CMH-I classiques, HLA-A, -B, -C, et non classiques HLA-E, -F et -G. De plus, ILT2 reconnaît aussi des molécules homologues du CMH-I telle que UL-18, une molécule codée pour le HCMV (*Guma M et al. 2006*). Cette protéine possède une structure homologue aux molécules du CMH de classe I et permet au virus d'échapper à la lyse par les NK ILT2<sup>+</sup> mais pas ILT2<sup>-</sup> (*Guma M et al. 2004*).

**LAIR-1** (*Leukocyte Associated Ig-like Receptor-1*)

LAIR-1 est un récepteur inhibiteur dont le gène se trouve sur le chromosome 19 au niveau du LRC, où l'on retrouve déjà les gènes KIRs et LILR/ILT. Il est exprimé sur presque toutes les cellules du système immunitaire, dont les cellules NK. C'est un récepteur de forte affinité pour le collagène, un des constituants de la matrice extracellulaire. Au moins 4 variants sont connus (LAIR1-a, -b, -c, -d) mais leur signification biologique reste mal comprise (*Meyaard L et al. 2008*).

- **La superfamille des lectines de type C**

### **CD94/NKG2A, -B**

Les récepteurs de la famille des lectines de type C de type NKG2 regroupent des protéines transmembranaires de type II et sont représentés sur les NK par les hétérodimères CD94/NKG2 (*Brooks A et al. 1997*). Actuellement, 4 gènes fortement homologues et deux variants transcriptionnels de la famille NKG2 ont été décrits : NKG2A (et son variant NKG2B), NKG2C, NKG2E (et son variant NKG2H) et NKG2F (*Houchins JP et al. 1991*). Ces gènes sont localisés avec le CD94 sur le chromosome 12 au niveau du complexe NK (NKC, *NK Complex*) (*Sobanov Y et al. 1999*). Parmi eux, seuls NKG2A et son épissage alternatif NKG2B sont des récepteurs inhibiteurs. Les gènes et variants activateurs seront présentés dans le paragraphe 1.2.2. se rapportant aux récepteurs activateurs.

**CD94/NKG2A** est exprimé sur toutes les cellules CD56<sup>bright</sup> et sur une partie des NK CD56<sup>dim</sup> mais également sur des sous-populations de lymphocytes T-CD8. Il peut transmettre un signal inhibiteur via un domaine ITIM présent dans son domaine intracellulaire. CD94/NKG2A reconnaît HLA-E, une molécule du CMH de classe I non conventionnelle (CMH-Ib) et peu polymorphe (*Braud VM et al. 1998*). La molécule HLA-E est dépendante des peptides signaux des autres molécules HLA (HLA classiques et HLA-G).

**CD94/NKG2B** est une forme épissée de NKG2A qui a été beaucoup moins étudiée. Des travaux ont montré que NKG2B pouvait s'associer avec CD94-T4, un transcrite alternatif de CD94. Ce dimère, qui peut s'exprimer à la membrane de cellules transformées transmet un signal inhibiteur et son ligand est également le HLA-E (*Lieto LD et al. 2006*).

### **CD161 (NKR-P1A)**

Le récepteur CD161 est codé par un gène situé sur le chromosome 12. Il est exprimé sur les cellules NK immatures et les lymphocytes T dans le foie fœtal (*Lanier LL et al. 1994*). Des sous-populations de lymphocytes T expriment aussi ce récepteur, et particulièrement les cellules invariantes iNKT spécifiques du CD1d pour lesquelles il agit comme récepteur activateur (*Exley M et al. 1997*). Au contraire, des études *in vitro* ont montré que l'engagement de ce récepteur à la surface des cellules NK induisait une inhibition de la cytotoxicité NK (*Lanier LL et al. 1994*).

Ainsi, la reconnaissance par ces récepteurs inhibiteurs des molécules du CMH de classe I sur une cellule cible, permet d'inhiber la cytotoxicité NK en contrôlant ainsi la survie des cellules du soi qui expriment constitutivement des molécules du CMH-I.

### 2.2.2. Les récepteurs activateurs

Les mécanismes et récepteurs de l'inhibition ayant été identifiés, il restait à mettre en évidence ceux liés à l'activation. En effet, certaines cibles cellulaires (notamment les érythrocytes) n'expriment pas les molécules du CMH-I et ne sont cependant pas lysées par les cellules NK. Cela suppose qu'en plus de la levée de l'inhibition, un signal activateur soit nécessaire. Plusieurs familles de récepteurs activateurs ont alors été mises en évidence.

- **La superfamille des immunoglobulines (Ig)**

#### **Les KIR-S (Killer Immunoglobulin-like Receptors-short)**

Les KIR-S sont les pendants activateurs des KIR-L. Contrairement aux KIR-L, ils ont un court domaine intracytoplasmique et ne possèdent pas de motifs ITIM. Leur potentiel activateur vient d'un résidu chargé positivement au niveau du domaine transmembranaire qui leur permet de s'associer à DAP12, une protéine porteuse d'un motif ITAM (*Lanier LL et al. 1998*). Les KIR-S identifiés sont : KIR2DS1, -2DS2, -2DS3, -2DS4, -2DS5 et -3DS1. Comme sa contrepartie inhibitrice, KIR2DS1 reconnaît les allèles HLA-C du groupe 2. Les KIRs inhibiteurs reconnaissent cependant HLA-C avec une plus grande affinité pour leurs ligands que les KIRs activateurs (*Vales-Gomez M et al. 1998*). Un allèle HLA-C, HLA-Cw\*04 a été identifié comme ligand de KIR2DS4 mais les ligands de KIR2DS2, -2DS5, -2DS3 et -3DS1 restent à ce jour non identifiés (*Carrington M et al. 2003 NCBI*).

#### **CD16a**

Le récepteur CD16a est codé par un gène se trouvant sur le chromosome 1. Il est exprimé sur tous les CD56<sup>dim</sup>, une fraction des CD56<sup>bright</sup> et une faible proportion de lymphocytes T- $\gamma\delta$ , mais aussi sur les monocytes et macrophages. Il possède de nombreuses homologues avec le CD16b qui lui n'est exprimé que sur les neutrophiles. Comme nous l'avons vu précédemment, le récepteur CD16 est un récepteur de faible affinité aux IgG qui est impliqué dans l'ADCC. Pour transduire un signal activateur, le



CD16 s'associe aux chaînes Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  ou CD3 $\zeta$  qui contiennent des motifs ITAM (*Vivier E et al. 1991*).

### **DNAM-1**

Ce récepteur est codé par un gène situé sur le chromosome 18. Il est exprimé sur la majorité des cellules T, des cellules NK, des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques (*Shibuya A et al. 1996*). C'est une molécule d'adhésion impliquée dans l'induction de la cytotoxicité des cellules NK. Ses ligands sont le récepteur du poliovirus (PVR, CD155) et la nectine-2 (CD112) qui peuvent être exprimés par différents types de tumeurs (*Bottino C et al. 2003*).

- **La famille des NCR** (*Natural Cytotoxicity Receptors*)

Les récepteurs de la cytotoxicité naturelle (NCR) représentent une famille de molécules récemment décrites à la surface des cellules NK humaines incluant NKp30, NKp44 et NKp46 (*Kruse PH et al. 2014*). NKp46 est codé par un gène du chromosome 19 et les gènes codant les récepteurs NKp30 et NKp44 sont situés sur le chromosome 6. NKp30 et NKp46 sont exprimés de manière constitutive sur toutes les cellules NK d'un individu sain alors que NKp44 n'est exprimé qu'après activation. Il existe une corrélation entre le niveau d'expression des NCRs et le potentiel cytolytique des cellules NK, ces derniers pouvant agir en synergie les uns avec les autres. Les ligands de ces récepteurs restent encore mal connus. Des travaux ont montré que ces NCRs peuvent reconnaître des éléments issus de pathogènes. Ainsi, par exemple, NKp46 reconnaît l'hémagglutinine (HA) du virus Influenza et les virus de la famille des poxvirus, NKp44 reconnaît celle du virus Sendai ainsi que la protéine constituant l'enveloppe des virus de la Dengue et West Nile et NKp30 reconnaît la protéine pp65 du HCMV (*Mandelboim O et al. 2001; Jarahian M et al. 2011; Hershkovitz O et al. 2009; Arnon TI et al. 2001*). Cependant, l'identification des ligands cellulaires de ces NCRs reste actuellement incomplète. Celui pour NKp46 n'a toujours pas été identifié alors que des cellules cibles non infectées sont clairement lysées par le biais de ce récepteur. Pour NKp30, deux ligands cellulaires ont été décrits, BAT3 et B7H6 (*Brandt C et al. 2009*). Ce dernier est exprimé exclusivement sur les cellules tumorales. Récemment, Baychelier *et al.* ont identifié un ligand, NKp44L, représentant un nouvel isoforme de la protéine MLL5 (*mixed-lineage leukemia 5*), exprimée à la surface de nombreuses cellules stressées (*Baychelier F et al. 2013*).

- **La famille des lectines de type C**

### **NKG2C, -E, -F**

NKG2C, NKG2E (et son variant NKG2H) et NKG2F, sont les contreparties activatrices de NKG2A (et de son variant NKG2B). Tout comme NKG2A, **NKG2C et NKG2E** forment des hétérodimères avec CD94 et ont pour ligand HLA-E (*Braud VM et al. 1998*). NKG2C est faiblement exprimé sur les cellules NK CD56<sup>bright</sup> et CD56<sup>dim</sup> d'un individu sain (*Kusumi M et al. 2006*). Cependant, il est augmenté au cours de différentes infections dont celle médiée par le cytomegalovirus humain (HCMV), le virus de l'hépatite B (VHB), le virus de l'hépatite C (VHC), le virus de l'immunodéficience humaine de type-1 (VIH-1) et les Hantavirus (*Hendricks DW et al. 2014; Beziat V et al. 2014; Fausther-Bovendo H et al. 2008; Oliviero B et al. 2009; Björkström NK et al. 2011*). Les travaux réalisés dans le cadre de ma thèse ont également montré que NKG2C était augmenté après infection par le CHIKV et DENV. Je reviendrai sur ces travaux dans la partie dédiée aux résultats de ce manuscrit. Dans ces cas, l'expression de NKG2C est corrélée à une diminution de l'expression de NKG2A. En revanche, NKG2E reste très peu étudié à ce jour, et ce à cause de l'absence d'anticorps spécifiques pour la cytométrie. **NKG2F** possède un domaine cytoplasmique et un segment transmembranaire mais pas de domaine extracellulaire (*Plougastel B et al. 1997*). Il ne s'associe pas au CD94 et transmet un signal activateur mais sa fonction exacte reste encore inconnue (*Kim D et al. 2004*).

### **NKG2D**

NKG2D est un récepteur transmembranaire activateur codé par un gène situé sur le chromosome 12 mais qui a très peu d'homologie avec les autres NKG2 (*Houchins JP et al. 1991; Wu J et al. 1999*). Il est exprimé à la surface de toutes les cellules NK, d'une partie des LT- $\gamma\delta$  et T-CD8. NKG2D est l'un des récepteurs NK les mieux caractérisés. Il reconnaît une famille de molécules de stress présentant des homologies de structures avec les CMH-I : MIC-A, MIC-B, ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3 et ULBP-4 (*Chalupny NJ et al. 2003; Bauer S et al. 1999; Raulet DH et al. 2013*). Ces molécules sont absentes sur les cellules normales mais sont exprimées à la surface des cellules stressées (*Gonzalez S et al. 2006*). NKG2D permet donc aux cellules NK de détecter les modifications cellulaires induites par des processus pathologiques infectieux, tumoraux, liés à des carcinogènes, à des chocs oxydatifs ou thermiques (*Mistry AR et al. 2007*).

Globalement, l'engagement des récepteurs activateurs a pour conséquence le déclenchement de la cytotoxicité naturelle et de l'ADCC par les cellules NK. Ceci peut également entraîner leur stimulation, prolifération et production de cytokines.

	Récepteur (CD)	Nom alternatif	Ligands	Fonction
<b>Signalisation = ITAM</b>	CD16	FCGR1IIIA	IgG	ADCC
	CD158h/CD158j/CD158i	KIR2DS1/2DS2/2DS4	HLA-C (faible affinité)	
	CD158e2/???/CD158g	KIR3DS1/2DS3/2DS5	?	Immunité antivirale ?
	CD159c	NKG2C	HLA-E	
	CD335	NKp46	Hémagglutinine de la grippe	Surveillance du stress cellulaire ?
	CD336	NKp44	Hémagglutinine de la grippe	Surveillance du stress cellulaire ?
	CD337	NKp30	B7H6, BAT3, Pp65	Surveillance du stress cellulaire
<b>Signalisation = non-ITAM</b>	CD2	LFA-2	LFA-3 (CD58)	Interactions cellulaires
	CD7		SECTM1, Galectin	Interactions cellulaires ?
	CD44		Acide hyaluronique	?
	CD59		C8, C9	Surveillance du stress cellulaire ?
	CD158d	KIR2DL4	HLA-G (soluble)	Remodelage de la vascularisation placentaire ?
	CD160	BY55	CMH-Ia/b, HVEM	Immunité antivirale ?
	CD226	DNAM-1	CD155 (PVR), CD112	Surveillance de l'intégrité des tissus
	CD314	NKG2D	ULBP-s, MICA, MICB	Surveillance du stress cellulaire
	CD244	2B4	CD48	
	CD319	CRACC	CRACC	Interactions cellulaires
		NTB-A	TB-A	
		NKp80	AICL	Interaction NK/cellules myéloïdes

**Figure 4. Récepteurs activateurs des cellules NK.** Les cellules NK expriment de nombreux récepteurs activateurs. Ils transmettent un signal intracellulaire par des ITAM ou non. Adapté de Bryceson, YT et al. 2008

### 2.2.3. Les autres récepteurs

- **Les co-récepteurs**

#### **2B4 (CD244)**

Le récepteur 2B4 est une protéine transmembranaire de type I appartenant à la sous-famille CD2 qui inclut d'autres récepteurs tels que le CD48, CD58, CD84 et CD150. Les gènes codant pour ces récepteurs se trouvent tous sur le chromosome 1. Le récepteur 2B4 est exprimé par toutes les cellules NK, les monocytes, les basophiles et une sous-population de LT-CD8. Son ligand, la molécule CD48, est exprimé sur l'ensemble des cellules hématopoïétiques. Des travaux ont montré que l'engagement de NKp46 pouvait apporter un premier signal nécessaire à l'engagement de 2B4, suggérant ainsi la notion de co-récepteur. Son rôle reste cependant encore mal compris et selon le niveau de maturité, il pourrait jouer un rôle inhibiteur ou activateur (*Sivori S et al. 2002*).

#### **NKp80**

NKp80 est un co-récepteur récemment décrit, dont le gène se trouve au niveau du NKC sur le chromosome 12. Malgré son nom, NKp80 n'appartient pas à la famille des NCR mais à la superfamille des lectines de type C. Il est exprimé à la surface de toutes les cellules NK et sur certains lymphocytes T CD56<sup>+</sup> (*Vitale MG et al. 2001*). Des études fonctionnelles ont montré que les cellules NK présentent une réponse cytolytique hétérogène en réponse à l'anticorps anti-NKp80. De la même manière que 2B4, cette réponse est corrélée à la densité de surface de NKp46 suggérant également sa fonction de co-récepteur activateur. Son ligand est le AICL (*Activation-Induced C-type Lectin*) (*Welte S et al. 2006*). Il s'agit d'un ligand endogène exprimé sur les monocytes, les macrophages et les granulocytes. L'interaction NKp80/AICL participe à l'activation de la cytotoxicité des cellules NK contre les cellules myéloïdes malignes et au *cross-talk* des cellules NK avec les monocytes. Le signal activateur s'opère par un motif atypique, appelé hémi-ITAM, et le recrutement de la protéine kinase Syk (*Dennehy KM et al. 2011*).

- **Les récepteurs aux cytokines et chimiokines**

Les cytokines interviennent dans la différenciation, la prolifération et la production de cytokines/chimiokines par les cellules NK. Ainsi, les récepteurs NK expriment des récepteurs pour différentes cytokines telles que l'IL-2R (uniquement les chaînes formant le récepteur à faible affinité), l'IL-4R, l'IL-7R, l'IL-12R, l'IL-15R, l'IL-21R, et l'INF $\alpha$ / $\beta$ R. Les cellules NK expriment également une multitude de récepteurs aux chimiokines. Les NK non activées migrent en réponse aux chimiokines de type CxC fixant le CXCR3 (CXCL10, CXCL11), le CXCR4 (CXCL12), le CX<sub>3</sub>CR1 (CX<sub>3</sub>CL1) et CXCR1 (CXCL1) (*Inngjerdigen M et al. 2001*). Elles migrent également en réponse à plusieurs chimiokines de type CC se liant aux CCR1 (CCL3, CCL5, CCL7), CCR2 (CCL2, CCL7, CCL8), CCR3 (CCL5, CCL7, CCL8) et CCR5 (CCL3, CCL4, CCL5, CCL8) (*Allavena P et al. 1994*). Conformément à la différence d'expression des récepteurs aux chimiokines entre les cellules NK CD56<sup>bright</sup> et CD56<sup>dim</sup>, ces deux sous-populations migrent soit spécifiquement, soit de façon concomitante vers la cible en fonction de la chimiokine impliquée.

- **Les TLRs (*Toll-like Receptors*)**

Ces récepteurs qui ont été très conservés au cours de l'évolution jouent un rôle important dans l'immunité innée. Ils peuvent reconnaître des motifs moléculaires associés aux microorganismes pathogènes qui sont nommés PAMPs (*Pathogen-associated microbia pattern*). Les cellules NK expriment des TLRs permettant une défense immédiate contre des agents infectieux. La stimulation *in vitro* des cellules NK avec des PAMPs conduit à la production de défensines et de cytokines, comme l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  ainsi qu'à une augmentation de la cytotoxicité vis-à-vis des cellules tumorales (*Qiu F et al. 2011*). Néanmoins, l'importance de ces récepteurs dans la régulation de l'activité des cellules NK reste encore mal comprise.

### 2.3. Régulation du seuil d'activation des cellules NK

Le contrôle de l'activation des cellules NK est lié à une balance entre des signaux activateurs et inhibiteurs mettant en jeu les différents récepteurs énoncés précédemment.

On distingue schématiquement 4 situations:

(i) Une cellule n'exprimant aucun ligand des récepteurs inhibiteurs ou activateurs, c'est le cas de l'érythrocyte. La cellule NK est alors inhibée (**figure 5A**)

(ii) Une cellule cible normale exprime à sa surface des molécules du CMH-I reconnues par un récepteur inhibiteur NK : la cytotoxicité naturelle de la cellule NK est alors inhibée (**Figure 5B**)

(iii) Une cellule cible exprime des ligands pour les récepteurs activateurs mais n'exprime pas ou peu de molécules du CMH-I : il n'y a pas d'inhibition du signal activateur, la cellule est donc lysée (**Figure 5C**)

(iv) Une cellule cible stressée exprime de façon anormale des ligands reconnus par les récepteurs activateurs mais n'a pas perdu l'expression des molécules du CMH-I : le signal inhibiteur bloque l'activation et la cytotoxicité naturelle. Dans cette situation, le signal inhibiteur peut être levé lorsque la densité en ligands activateurs ou l'affinité récepteurs/ligands est importante (**Figure 5D**)

En plus de cette régulation par les récepteurs inhibiteurs et activateurs, de nombreuses études ont montré que la réactivité des cellules NK dépendait également de leur microenvironnement et de la durée d'exposition à cet environnement.

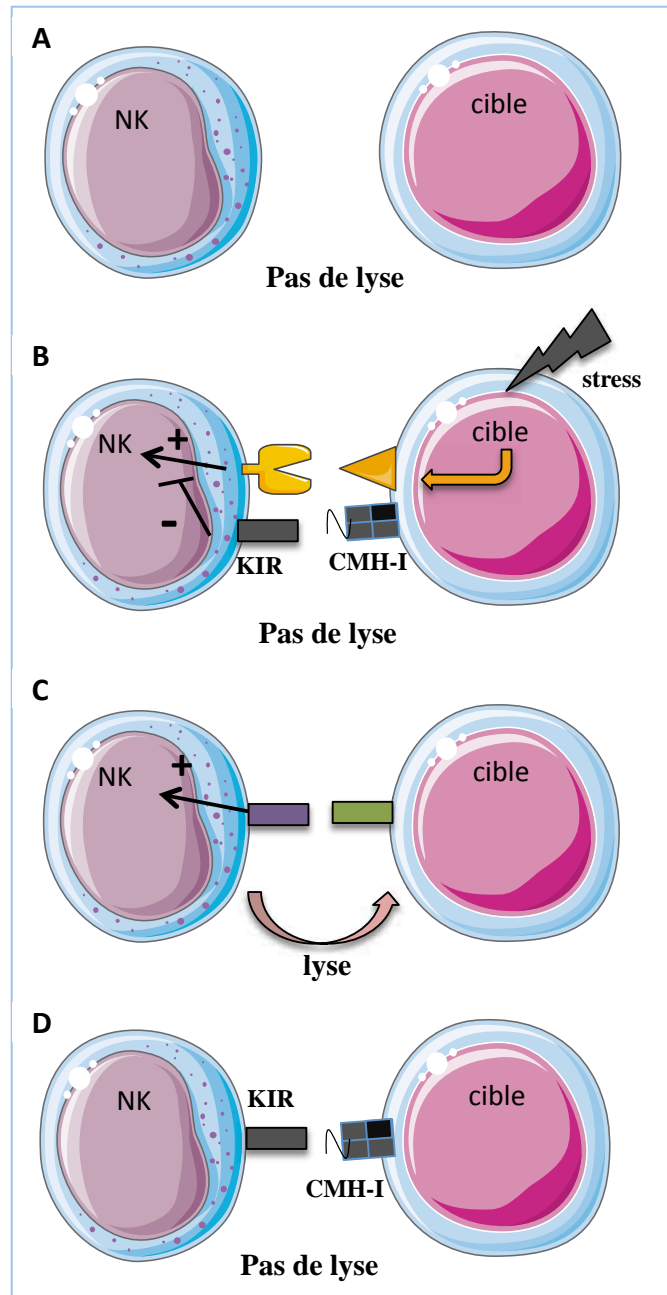


Figure 5. Régulation du seuil d'activation



#### **2.4. Implications du polymorphisme génétique des récepteurs KIRs dans la susceptibilité / résistance aux infections**

Un niveau de complexité supérieur est apparu suite à l'étude des récepteurs KIRs sur le plan génétique. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 2.2.1., il existe 17 gènes KIRs (dont deux pseudogènes) définissant deux haplotypes principaux avec des variations génétiques, en nombre et association de gènes, entre les individus (*Uhrberg M et al. 1997* ; *Martin AM et al. 2004*). A partir d'un génotype donné, l'étude de différents clones NK issus d'un même individu montre une expression restreinte et variable de différents récepteurs KIRs (*Valiante NM et al. 1997*). Les ligands des KIRs, certaines molécules du HLA de classes I, sont codés sur le chromosome 6, à la différence des KIRs codés sur le chromosome 19. Ainsi, l'héritage et l'expression des gènes codant ces récepteurs et leurs ligands sont physiquement indépendants l'un de l'autre. Il est donc possible qu'un certain KIR, son ligand, ou les deux soient absents chez un individu, résultant à une situation fonctionnelle particulière. Ceci ajoute une dimension supplémentaire à la variabilité et à la complexité du système. Par exemple, différentes études sur les interactions entre les récepteurs inhibiteurs KIR2D et leurs ligands HLA-C, montrent que l'interaction KIR2DL1/HLA-C2 confère des réponses inhibitrices plus fortes que KIR2DL3/HLA-C1 (*Markeljevic J et al. 1991*; *Gonzalez-Amaro R et al. 1988*). La variation allélique joue également un rôle dans la force des interactions. Certains allotypes de KIR3DL1 sont par exemple exprimés à des niveaux plus importants que d'autres, corrélant avec le niveau de liaison aux ligands HLA-Bw4 (*Martin MP et al. 2002*; *Nelson GW et al. 2004*). Il est devenu évident que le type et la force des interactions KIR/HLA peuvent avoir une influence significative sur la susceptibilité/résistance aux infections.

Généralement, les génotypes qui confèrent une inhibition faible et une forte activation apparaissent bénéfiques dans les infections virales telles que le VIH-1. En effet, il a été observé chez les individus infectés par le VIH-1, que la combinaison de KIR3DS1 avec son ligand HLA-Bw4-80I était associée à une progression plus lente vers le SIDA, une charge virale plus faible et une protection contre les infections opportunistes (*Velardi A et al. 2002*; *Farag SS et al. 2002*). De plus, des travaux ont également démontré que les cellules NK exprimant KIR3DS1 inhibaient significativement plus la réplication du VIH-1 dans les cellules exprimant HLA-Bw4-80I par rapport aux NK qui ne l'exprimaient pas (*Costello RT et al. 2002*). Un autre modèle a également montré l'importance de l'inhibition dans l'éducation des cellules NK (*Kim S et al. 2005*). Ces auteurs ont montré que la forte interaction inhibitrice conférée par KIR3DL1 lors du

développement des NK conduit à une réponse plus forte quand le ligand est down-régulée ou perdu lors de l'infection virale.

Les récepteurs KIR2D semblent à l'inverse être impliqués dans le contrôle de l'infection par le VHC. Chez les individus infectés avec une faible dose virale, la combinaison KIR2DL3/HLA-C1 s'avère être protectrice en corrélation avec une meilleure élimination du virus (*Khakoo SI et al. 2004*). Les cellules NK des individus KIR2DL3/HLA-C1 sécrètent plus d'IFN- $\gamma$  au début de l'infection et présentent une dégranulation plus efficace que les NK KIR2DL1/HLA-C2. Ces résultats mettent en évidence la différence d'inhibition associée à la présence du génotype KIR2DL3/HLA-C1 comparée à KIR2DL1/HLA-C2 (*Romero V et al. 2008*).

Un autre exemple intéressant est le cas d'un enfant avec un syndrome d'immunodéficience associée à une infection récurrente au CMV. L'ensemble de la population NK de cet enfant exprimait KIR2DL1 et il possédait également le ligand HLA-C2, suggérant alors une inhibition totale de l'activité NK. Une nouvelle forme de déficit immunitaire associée au CMV est alors envisagée (*Gazit R et al. 2004*).

De nombreux autres exemples viennent illustrer le rôle important de ces interactions KIR/HLA dans la susceptibilité/résistance aux infections virales. Des études ont également montré le rôle crucial de ces interactions dans les maladies auto-immunes ou les cancers qui ont une composante inflammatoire (*Kulkarni S et al. 2008*). Il est important de rappeler que l'expression des récepteurs KIRs n'est pas restreinte aux cellules NK mais peut être retrouvée à la surface de certaines sous-populations lymphocytaires T. Ainsi, toutes les études génétiques d'associations entre les génotypes KIR et les pathologies impliquent les cellules NK mais aussi certaines sous-populations lymphocytaires T.

## 2.5. Les interactions NK/DCs

Plusieurs études ont montré que les interactions NK/DCs conduisent à l'activation, à la maturation et même à la mort cellulaire. Bien que les cellules NK et DCs soient présentes dans plusieurs organes, les interactions seraient concentrées au niveau des organes lymphoïdes secondaires et au niveau des sites d'inflammation (*Bajenoff M et al. 2006 ; Ferlazzo G et al. 2004*).

### 2.5.1. Les cellules NK induisent la maturation des DCs

L'importance des interactions NK/DCs pour leur expansion et leur activation optimale a été observée *in vivo* au cours de différentes infections virales (*Andrew DM et al. 2003*). Plusieurs études ultérieures *in vitro* ont montré que les interactions entre les NK et les DCs induisaient une activation et une production de cytokines par les deux types cellulaires, amenant à la prolifération et la cytotoxicité des cellules NK ainsi qu'à la maturation des DCs (*Gerosa F et al. 2002; Osada T et al. 2001*). A des faibles ratios NK:DC, les cellules NK activées induisent l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation à la surface des DCs telles que le CD86, CD83 et HLA-DR, puis induisent la sécrétion de cytokines telles que l'IL-12 et le TNF- $\alpha$  par les DCs (*Gerosa F et al. 2002; Piccioli D et al. 2002*). Ce mécanisme fait intervenir les cytokines produites par les cellules NK mais aussi le contact entre les deux types de cellules. Ce phénomène semble en effet être régulé par le récepteur activateur Nkp30 et médié par une sous-population de NK exprimant le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A et ne possédant pas de récepteurs KIRs (*Ferlazzo G et al. 2002; Wilson JL et al. 1999*). Le fait que les cellules NK induisent l'expression de molécules de co-stimulation, la sécrétion de cytokines et surtout l'expression du CCR7, suggère que les cellules NK incitent les DC à migrer à partir des sites d'inflammation vers les organes lymphoïdes secondaires afin d'initier la réponse immunitaire adaptative (**Figure 6**).

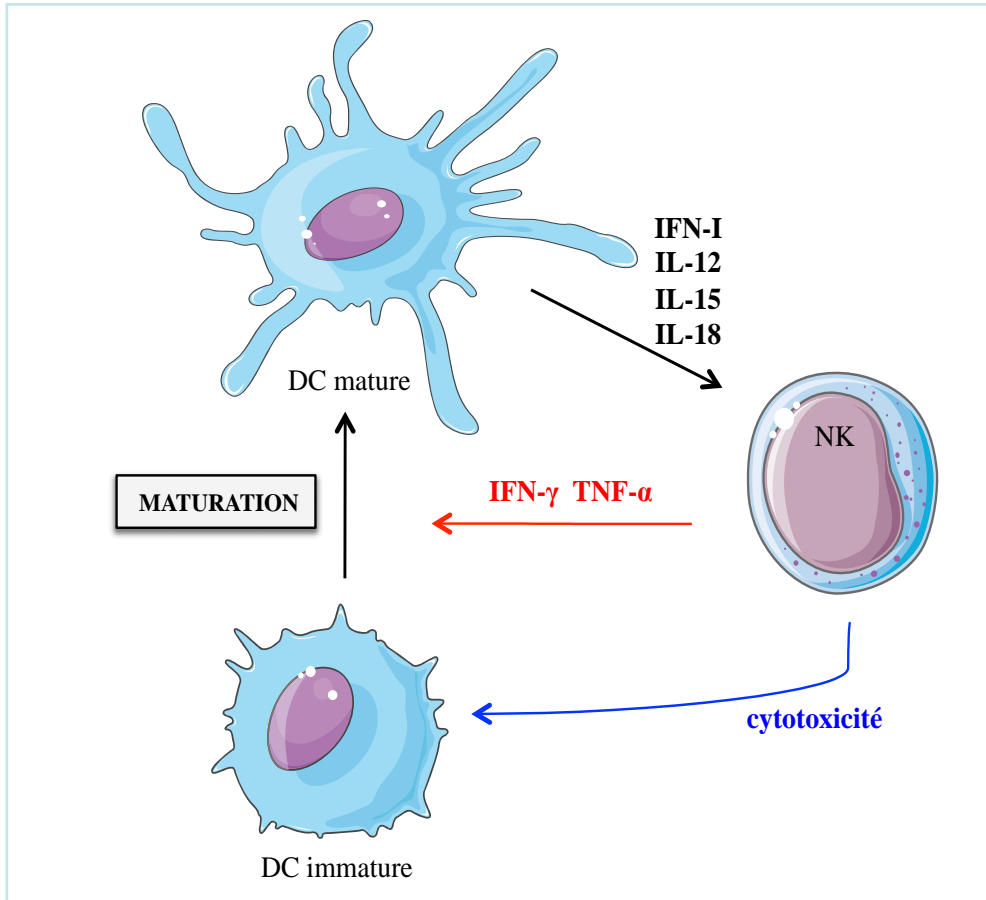
### 2.5.2. Lyse des DCs par les cellules NK

A des ratios élevés de NK:DC, les cellules NK sont capables de lyser les DCs immatures (iDCs) *in vitro*. La lyse des iDCs par les NK *in vivo* n'est pas clairement établie, mais une des hypothèses est que ceci participerait à la régulation de la réponse immune (*Chiesa MD et al. 2003*). La lyse des DCs induite par les cellules NK est dépendante du contact entre ces deux types de cellules et plus particulièrement de la

liaison des récepteurs inhibiteurs et activateurs de cellules NK à leurs ligands. Les iDCs expriment de faibles niveaux de CMH de classe I et donc de molécules HLA-E. Elles sont par conséquent sensibles à la lyse médiée par les cellules NK malgré l'expression du récepteur inhibiteur NKG2A. En revanche, les DC matures (mDCs) expriment fortement le CMH de classe I les rendant plus résistantes à la lyse médiée par les cellules NK. La lyse des DCs requiert la présence de récepteurs activateurs dont NKp30, NKp46 et DNAM-1 sur les cellules NK (*Spaggiari GM et al. 2001; Ferlazzo G et al. 2002*). Après engagement de ces récepteurs activateurs, les cellules NK induisent l'apoptose des iDCs via la voie TRAIL-DR4 (*Hayakawa Y et al. 2004; Melki MT et al. 2010*) ou par dégranulation via la voie perforine/granzymes (*Laffont S et al. 2008*) (**Figure 6**).

### **2.5.3. Les DCs activent les cellules NK**

Les mDCs ont la capacité d'activer les cellules NK au repos. Cette activation dépend à la fois du contact cellulaire et de la production de cytokines par les DCs. La sécrétion d'IFN-I, d'IL-12 et d'IL-18 par les DCs active les cellules NK et permet la sécrétion principalement d'IFN- $\gamma$  (*Gerosa F et al. 2005; Nguyen KB et al. 2002*). De plus, la présentation en trans de l'IL-15 par l'IL-15R $\alpha$  à la surface des DCs est cruciale pour la survie et la prolifération des cellules NK exprimant les chaînes IL-15R $\beta$  et  $\gamma$  (*Brilot F et al. 2007; Huntington ND et al. 2007*). D'autres mécanismes dépendants du contact cellule-cellule, notamment la reconnaissance de ligands par le NKG2D (*Jinushi M et al. 2003*) ont été également décrits comme étant important pour l'activation des cellules NK par les DCs (**Figure 6**).



**Figure 6. Régulation des réponses immunes par les interactions entre les cellules NK et les cellules dendritiques (DC).**

#### **2.5.4. Exemples d'interactions NK et DCs dans le contrôle d'infections virales**

Plusieurs exemples viennent illustrer le rôle majeur de la coopération des NK avec les DCs au cours des infections virales. Les NK reconnaissent les DCs infectées par le virus de la grippe par le biais des récepteurs NKp46 et NKG2D (*Draghi M et al. 2007*). Les interactions avec les DCs infectées permettent l'activation des NK et la sécrétion d'IFN- $\gamma$ . Au cours de l'infection par le VIH-1, il a été montré que les NK ILT-2<sup>+</sup> sont capables de contrôler la réplication virale dans les DCs par le biais d'un contact direct NK-DCs impliquant ILT2 (*Scott-Algara D et al. 2008*). Chez des patients chroniquement infectés par le VHB, il a été démontré que la capacité des DCs à activer les cellules NK est réduite. Ceci semble être lié à la faible production de cytokines pro-inflammatoires par les DCs après stimulation du TLR3. Au contraire, certaines infections n'induisent pas la fonctionnalité des interactions NK/DCs. C'est le cas par exemple, du virus de Lassa (LASV). Des études récentes ont montré que les cellules NK sont activées par LASV mais qu'elles ne sont pas capables de sécréter d'IFN- $\gamma$ , ne tuent pas les cellules cibles et ne contrôlent pas l'infection. En contrepartie, il a été observé que les DCs n'étaient pas non plus activées au cours de cette infection (*Russier M et al. 2012*).

## 2.6. Échappement viral à la reconnaissance par les cellules NK

Cinq catégories de mécanismes capables d'inhiber l'activation des cellules NK ont été mis en évidence: (i) l'expression d'homologues des molécules du CMH de classe-I codées par les virus, (ii) la modulation de l'expression des molécules du CMH de classe-I par des protéines virales, (iii) l'inhibition médiée par les virus des récepteurs NK activateurs (iv) la production de protéines virales se liant aux cytokines ou production d'antagonistes se liant aux récepteurs des cytokines et (v) l'effet direct du virus sur les cellules NK.

(i) La production par les virus de molécules homologues aux molécules du CMH de classe I représente le premier mécanisme identifié d'échappement aux cellules NK. Un intérêt particulier a été porté à l'étude de l'échappement aux réponses NK par le HCMV. Ces travaux ont montré que le virus code une glycoprotéine homologue des molécules HLA de classe I, la molécule UL18 (*Beck S et al. 1988*). Cette protéine lie la  $\beta 2m$  et fixe le récepteur inhibiteur ILT2 avec 1000 fois plus d'affinité que les molécules HLA de classe-I, inhibant ainsi les cellules NK ILT2<sup>+</sup> (*Cosman D et al. 1997; Chapman T et al. 1999*). Le VHC et VIH-1 ont également développé des stratégies similaires pour inhiber l'activité NK. La protéine E2 du VHC lie le CD81 qui bloque la sécrétion de cytokines et des granules cytotoxiques (*Scalzo A et al. 2002*). L'infection par le VIH-1 interfère également avec les fonctions antivirales NK en modulant l'expression des ligands des récepteurs activateurs de cellules NK à la surface des cellules infectées.

(ii) La modulation de l'expression des molécules de classe I est une caractéristique commune à de nombreux virus. Généralement, les virus diminuent l'expression des molécules HLA-A et HLA-B, impliquées dans la présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes T-CD8 et au contraire, augmentent l'expression des molécules HLA-C et HLA-E, les principaux ligands reconnus par les récepteurs NK inhibiteurs. C'est le cas par exemple du VIH-1 qui, par le biais de la protéine virale Nef diminue préférentiellement l'expression des molécules HLA-A et HLA-B mais pas celle des molécules HLA-Cw (*Cohen GB et al. 1999*). A l'inverse, de nombreuses études ont montré que les flavivirus augmentent l'ensemble des molécules de classe I inhibant ainsi la lyse par les cellules NK (*Ye J et al. 2013*).

(iii) L'interférence avec les récepteurs activateurs des cellules NK constitue également un mécanisme d'échappement efficace pour les virus. Un exemple bien connu est celui de la protéine UL16 du HCMV qui se lie aux molécules ULBPs et MICB, des ligands du récepteur NKG2D/DAP10. L'interaction entre le récepteur et ses ligands est ainsi bloquée ce qui a pour conséquence d'inhiber la réponse NK (*Cosman D et al. 2001*). Le virus influenza utilise le biais des NCRs pour échapper aux cellules NK en modifiant la glycosylation de l'Hémagglutinine HA, un des ligands de NKp46 et NKp44. Le virus diminue ainsi la reconnaissance par les cellules NK (*Owen RE et al. 2007*).

(iv) Les virus peuvent également échapper à la reconnaissance NK en codant pour des protéines virales qui modulent l'interaction entre les cytokines ou chimiokines avec leurs récepteurs. De nombreux poxvirus ou herpesvirus codent pour des homologues de cytokines et chimiokines avec des fonctions agonistes ou antagonistes. Ils peuvent également sécréter des protéines ou récepteurs se liant avec une grande affinité aux cytokines et chimiokines (*Lalani AS et al. 2000*). Ainsi plusieurs exemples montrent une inhibition ou un antagonisme des cytokines IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha/\beta$  et IL-15, impliquées dans l'activation de la production d'IFN- $\gamma$  ou de la cytotoxicité par les cellules NK (*Biron CA et al. 1999*). Ils peuvent aussi, alternativement, faciliter la surproduction ou coder des homologues de cytokines ayant une activité inhibitrice sur les cellules NK telle que l'IL-10 (*D'Andres A et al. 1993*).

(v) Les cellules NK peuvent être infectées par le virus d'Epstein-Barr (EBV), ce qui constitue un mécanisme supplémentaire d'échappement au contrôle par le système immunitaire. Des cellules NK ont été détectées dans le sang de nombreux patients souffrant de mononucléose et plusieurs cas de lymphomes ou de proliférations chroniques de cellules NK ont été corrélés avec une infection par l'EBV. Les cellules NK acquièrent la molécule CD21, récepteur d'entrée du virus, au cours de leur interaction avec des lymphocytes B infectés (*Tabiasco J et al. 2003*).



Ainsi, nous avons mis en évidence dans cette première partie que les cellules NK étaient fortement impliquées au cours des infections virales. La réponse NK est capitale dans la réponse initiale aux infections et notamment au cours des infections virales aiguës. La réponse NK reste encore peu caractérisée au cours des infections par le CHIKV et DENV. Nous développerons, dans cette troisième partie, les caractéristiques de ces deux virus et des maladies qu'ils induisent.

### **3. Le Chikungunya et la dengue : unité et divergences de deux arbovirus**

#### **3.1. Caractérisation des virus**

Le Chikungunya et la Dengue sont deux arbovirus (*arthropod-borne virus*) transmis à l'homme par les moustiques du genre *Aedes*. Ils sont responsables de deux maladies tropicales émergentes entraînant des syndromes aigus fébriles dont les diagnostics cliniques initiaux sont souvent difficiles à distinguer. Le virus du Chikungunya (CHIKV) et le virus de la Dengue (DENV) appartiennent néanmoins à deux familles de virus différentes et présentent des caractéristiques qui leurs sont propres.

##### **3.1.1. Taxonomie et classification**

- **Le virus du Chikungunya**

Le CHIKV est un arbovirus de la famille des *Togaviridae*, du genre *Alphavirus* (**Powers AM et al. 2000**). Le groupe des alphavirus comprend au moins 30 virus divisés en deux sous-groupes, les alphavirus de l'Ancien Monde qui provoquent principalement des arthralgies, et les alphavirus du Nouveau Monde qui provoquent principalement des encéphalites (**Strauss JH et al. 1994**). Le CHIKV appartient aux alphavirus de l'Ancien Monde et fait partie du complexe antigénique Semliki Forest. On y retrouve les virus O'Nyong-Nyong, Ross river et Mayaro, des pathogènes également important en Afrique, Australie et Amérique du Sud respectivement (**Smith DW et al. 2009**).

Des études phylogénétiques ont montré que les souches de CHIKV appartiennent à trois lignages différents selon des considérations génotypiques et antigéniques : 2 lignages africains, Afrique de l'Ouest et Afrique de l'Est/Centrale/Sud (ECSA) et un lignage asiatique (**Yergolkar PN et al. 2006; Arankalle VA et al. 2007**). Ces résultats supportent l'hypothèse que le CHIKV est originaire d'Afrique et introduit en Asie par l'Afrique de l'Est.

- **Le virus de la Dengue**

Le DENV est responsable de l'arbovirose la plus fréquente et la plus largement répandue. Il appartient à la famille des *Flaviviridae*, du genre *Flavivirus*. Actuellement plus de 70 flavivirus ont été identifiés. Avec le DENV, les virus de la Fièvre Jaune, du West Nile, de l'Encéphalite Japonaise et de l'Encéphalite à tique sont les plus connus (*Gubler DJK et al. 2007 DMKaPM Howley Editor*).

Quatre sérotypes de DENV sont décrits : DENV-1, -2, -3 et -4, lesquels sont sérologiquement liés mais antigéniquement distincts. Chaque sérotype comprend une variété de sous-types classés par l'analyse phylogénétique de leur génome, essentiellement sur des parties ou sur la totalité de la séquence du gène d'enveloppe E (*Kalayanarooj S et al. 1997*).

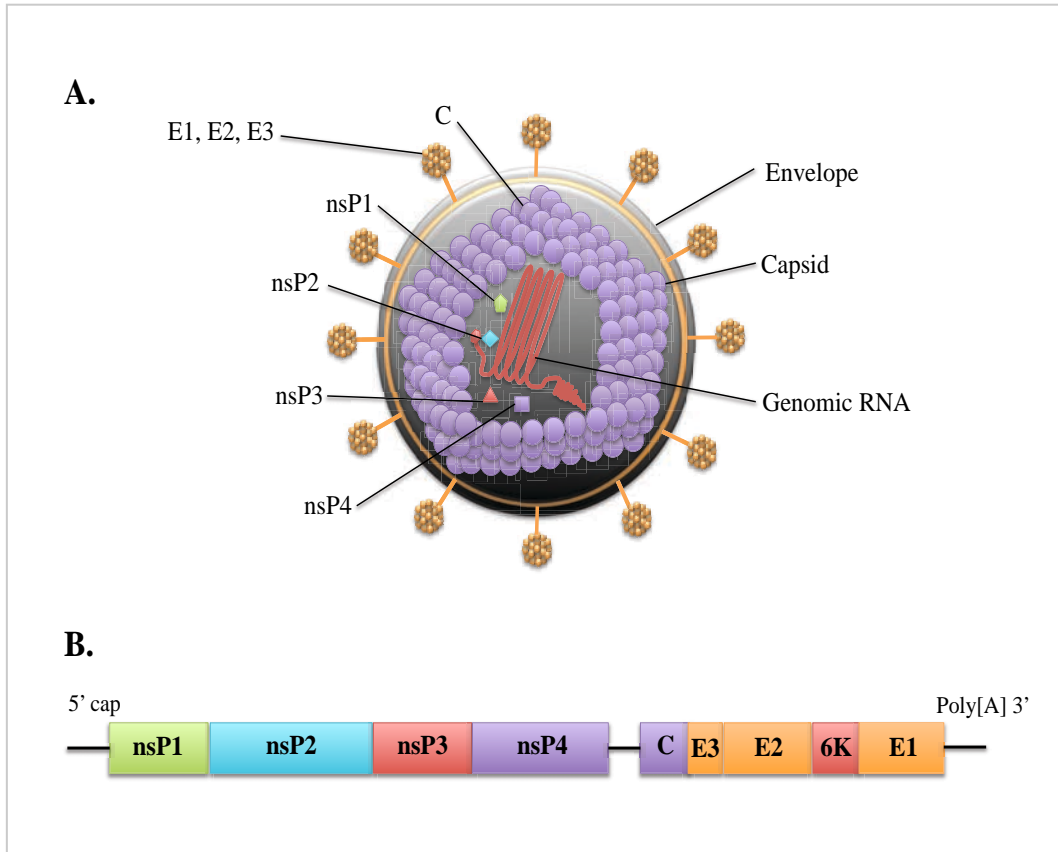
### 3.1.2. Structure, organisation des génomes et cycles de réplication

- **Le virus du Chikungunya**

L'étude du CHIKV en microscopie électronique a permis d'identifier des particules virales ayant les caractéristiques morphologiques des alphavirus. C'est un virus enveloppé, sphérique de 60 à 70 nm de diamètre, possédant une capsidie icosaédrique.

Comme les autres alphavirus, le CHIKV est un virus à ARN linéaire simple brin de polarité positive, pourvu d'une coiffe à l'extrémité 5' et d'une queue poly-(A) à l'extrémité 3' (*Sourisseau M et al. 2007*). Son génome fait environ 11,8 kb et code deux phases de lecture ouvertes (ORF), une ORF non structurale et une ORF structurale. La première (7424 nt) code pour les protéines nécessaires à la transcription et à la réplication de l'ARN viral et la seconde (3732 nt) code pour quatre protéines de structure : la protéine de capsidie C, les glycoprotéines d'enveloppe E1, E2 et E3 (*Simizu B et al. 1984*). Les protéines non structurales NSP1, NSP2, NSP3 et NSP4 sont codées par 2 polyprotéines traduites à partir de l'extrémité 5' du génome et constituent l'hélicase, la protéase et l'ARN polymérase virale (*Fros JJ et al. 2010*). Ces protéines virales assurent la réplication du génome qui passe par la synthèse d'un brin ARN de polarité négative complémentaire à l'ARN génomique. L'ARN viral est infectieux, et peut donc à lui seul initier la réplication (**Figure 7A**).

Le CHIKV se fixe aux membranes des cellules sensibles par l'intermédiaire de ses protéines d'enveloppe. La glycoprotéine E2 est principalement impliquée dans l'interaction avec le récepteur cellulaire tandis que E1 permet l'internalisation du virus dans une vésicule d'endocytose où le faible pH induit un changement de conformation des protéines d'enveloppe permettant la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane vésiculaire (*Solignat M et al. 2009*). Le récepteur cellulaire reste cependant encore non identifié. Après traduction de l'ARN viral, la protéine précurseur d'E2, p62, forme des hétérodimères avec E1 au niveau du réticulum endoplasmique. Elles interagissent avec les nucléocapsides afin d'initier le bourgeonnement des virions au niveau de la membrane cytoplasmique sur laquelle sont fixées les glycoprotéines de l'enveloppe (*Garoff H et al. 1974*) (**Figure 7B**).



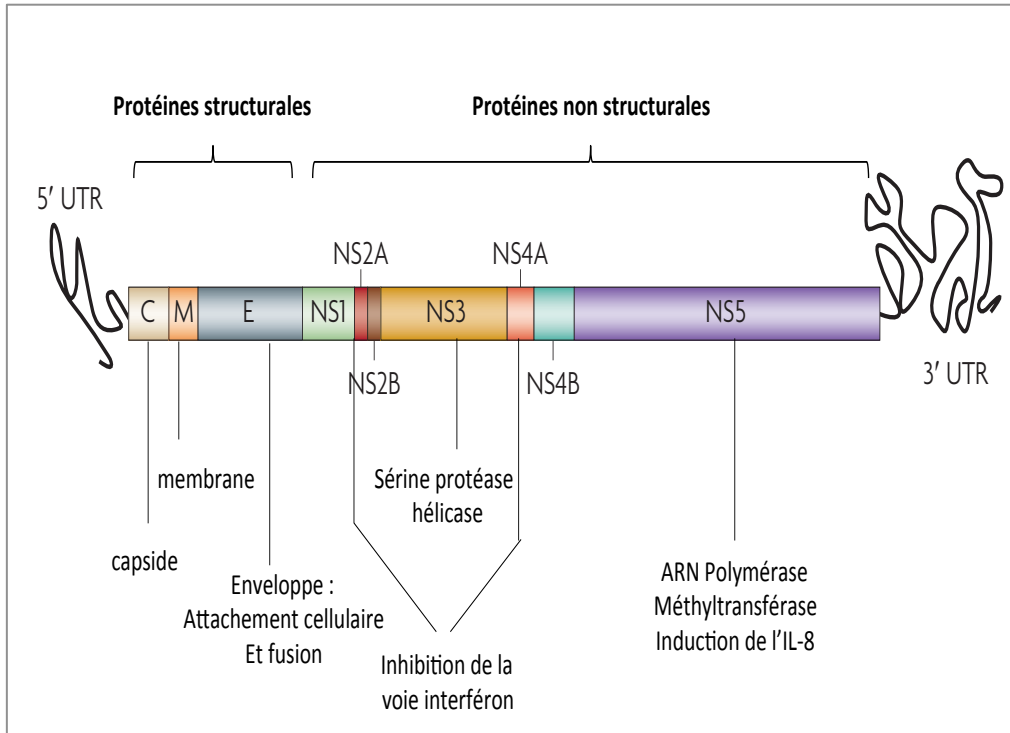
**Figure 7. A. Représentation de la particule virale du Chikungunya.** 4 protéines non-structurales (nsP1 à nsP4) codent pour la synthèse d'ARN, la protéase hélicase, les polymérases et 3 protéines structurales (C, E1, E2). Deux petits peptides (E3 et K6) codent pour les glycoprotéines d'enveloppe et pour la capsid. **B.** Représentation du génome du CHIKV.

Un nouveau variant de CHIKV isolé en 2006, présente une mutation dans la glycoprotéine membranaire E1. Cette mutation A226V aurait permis l'adaptation du virus à une nouvelle espèce de moustique *Aedes albopictus* devenu le principal vecteur impliqué dans les épidémies récentes (*Arankalle VA et al.; Schuffenecker L et al. 2006; Santhosh SR et al. 2008*).

- **Le virus de la dengue**

Les virions sont petits, sphériques, d'environ 50 nm de diamètre. Le core du virus est composé d'une nucléocapside entourée d'une membrane, l'enveloppe virale.

Le génome est constitué d'une molécule d'ARN simple brin, d'environ 11 kb, coiffée en 5' et avec une séquence poly-(A) en 3' (*Lindenbach BD et al. 2003; Harris E et al. 2006*). L'ARN génomique présente une seule ORF qui est traduite en une polyprotéine précurseur contenant l'ensemble des protéines virales. Les clivages co- et post-traductionnels de la protéine précurseur sont assurés par des protéases d'origine cellulaire ou virale (NS2B/NS3B). Les virions matures sont formés de trois protéines structurales : la protéine de capsid C, la protéine précurseur de membrane PrM et la protéine d'enveloppe E. La protéine C et le génome forment la nucléocapside qui présente une symétrie icosaédrique et s'entoure d'une enveloppe lipidique dans laquelle les protéines M et E sont ancrées (*Kuhn RJ et al. 2002*). Le génome encode également sept protéines non structurales : NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5. Ces protéines participent à la réplication du génome, à l'assemblage des virions ainsi qu'à la modulation des réponses immunitaires de l'hôte et à la pathogénicité (*Liu WJ et al. 2003; Munoz-Jordan JL et al. 2005*) (**Figure 8**).



**Figure 8. Génome du virus de la Dengue.** Le génome code pour 3 protéines structurales et 7 protéines non-structurales. Une coiffe en 5' et deux régions non-traduites (UTR) en 3' et 5'. (Adaptation de Guzman GM *et al. Nature Review Microbiology*).

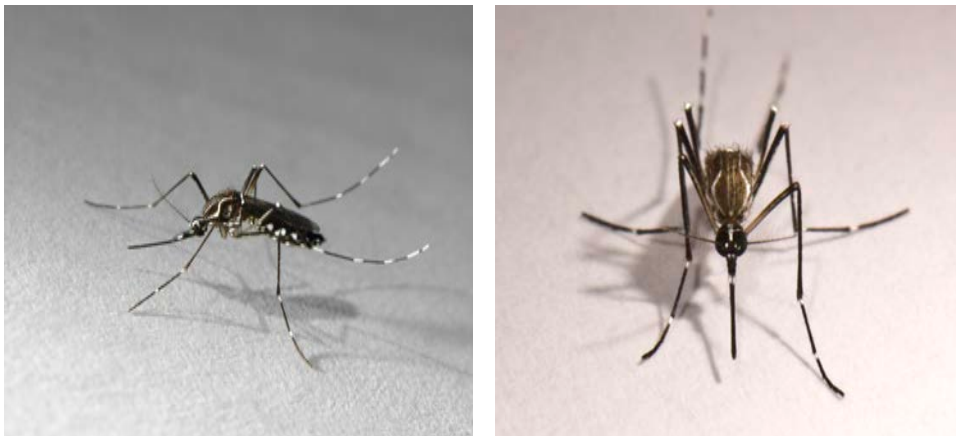


Le virus entre dans la cellule cible par endocytose après fusion avec la membrane de la cellule cible. Différents récepteurs cellulaires ont été proposés tels que des glycoprotéines (sulfates d'héparines), DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) une lectine de type C localisée à la surface des DCs ou encore le récepteur au mannose (**Chen Y et al. 1997; Tassaneetrihep B et al. 2003; Miller JL et al. 2008**). Dernièrement, des travaux *in vitro* ont permis d'identifier deux familles de récepteurs cellulaires (protéines TIM et TAM) qui semblent jouer un rôle important dans l'entrée du virus (**Meertens L et al. 2012**). Après internalisation, l'ARN viral est traduit et la polyprotéine est clivée au niveau du réticulum endoplasmique. Suite à l'assemblage de la capsid-ARN, il se produit une association entre les protéines prM et E formant un hétérodimère. Une fois formés, les virions sortent par bourgeonnement en utilisant la bicouche lipidique comme enveloppe (**Kuhn RJ et al. 2002**).

### 3.2. Vecteurs et réservoirs

#### 3.2.1. Vecteurs

Le vecteur est un facteur primordial dans l'émergence ou la réémergence d'une maladie. Les vecteurs impliqués dans la transmission du CHIKV et DENV sont les moustiques femelles *Aedes*, principalement *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*. Le moustique *Ae. aegypti* est urbain, anthropophile et possède la capacité de piquer à plusieurs reprises au cours d'un cycle gonotrophique. Au contraire *Ae. albopictus*, surnommé le moustique tigre à cause de ses pattes rayées et de son corps ponctué de tâches blanches, colonise préférentiellement des habitats péri-domestiques et se nourrit aussi bien sur les hommes que sur les animaux (**Figure 9**).



**Figure 9.** *Aedes albopictus*

Pendant longtemps, *Ae. aegypti* a été considéré comme le vecteur épidémique du CHIKV. Néanmoins, depuis les dernières épidémies dans le sud-ouest de l'Océan Indien (SOOI), la capacité d'*Ae. Albopictus* à transmettre efficacement le CHIKV a été mise en évidence (*Pagès F et al. 2006; Vazeille M et al. 2007*). *Ae. Albopictus*, originaire des forêts d'Asie du Sud-Est s'est progressivement adapté à l'environnement humain qui représente une source de sang et des réserves d'eau propices au développement des larves (*Smith CE et al. 1956*). Aujourd'hui, *Ae. Albopictus* est présent dans de nombreuses îles du Pacifique, en Australie, sur le continent Américain depuis 1985 et en Afrique depuis 1989 (*Gratz NG et al. 2004; Cornel AJ et al. 1991*). L'Europe n'est pas épargnée et plusieurs pays ont récemment été colonisés par le moustique. La compétence vectorielle vis-à-vis du CHIKV varie en fonction de la souche virale et de la population de moustiques (*Vazeille M et al. 2007*). Ainsi, des moustiques récoltés

pendant le pic épidémique de la Réunion (mars 2006) se sont montrés extrêmement réceptifs vis-à-vis d'une souche virale correspondant au génotype majoritaire de cette épidémie, qui présentait un changement d'acide aminé en position 226 dans la glycoprotéine d'enveloppe E1, par rapport au génotype circulant en début d'épidémie (*Schuffenecker I et al. 2006*). Une réplication plus importante de ce génotype pourrait expliquer l'extrême efficacité de transmission observée au cours de cette épidémie.

Concernant le virus **DENV**, *Ae. aegypti* est le vecteur principal impliqué dans sa transmission. *Ae. albopictus* joue également un rôle majeur dans la transmission mais reste considéré comme vecteur secondaire du DENV. En général, *Ae. aegypti* est moins susceptible que *Ae. albopictus* à l'infection par le DENV, ce qui peut être considéré comme un mécanisme de sélection afin de permettre la transmission de souches DENV plus virulentes. En effet, une plus faible susceptibilité requiert un titre viral plus fort chez l'hôte afin de pouvoir ensuite infecter le moustique et poursuivre le cycle de transmission. Des titres viraux élevés ont été associés à des formes hémorragiques sévères de dengue chez l'homme. Au contraire, *Ae. albopictus* transmettrait des souches de DENV ne se répliquant pas à des titres aussi élevés donnant lieu à des formes cliniques moins sévères. Ainsi *Ae. albopictus* pourrait être impliqué dans une transmission « silencieuse » opérant pendant les périodes inter-épidémiques (*Benedict MQ et al. 2007*). Les analyses phylogénétiques des souches circulantes de type DENV-1 à 4 ont révélé que la recombinaison génétique intra-sérotypique est possible chez le vecteur moustique qui serait alors le site privilégié pour l'évolution de ces virus. La recombinaison génétique du DENV pourrait être à l'origine de nouveaux variants viraux, mieux adaptés à leurs vecteurs/hôtes et présentant une virulence accrue (*Seligman SJ et al. 2004 ; Holmes EC et al. 2003*).

Récemment, lors d'une double épidémie de Chikungunya et Dengue survenue en 2009 au Gabon, il a été montré qu'*Ae. albopictus* était capable de transmettre le Chikungunya et la Dengue simultanément (*Caron M et al. 2012*). Le cas n'a pas encore été observé avec *Ae. aegypti*. L'introduction et la propagation des moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* dans la région européenne sont des problèmes croissants, dont les ressorts sont la mondialisation des échanges et des voyages, l'urbanisation et les changements climatiques. En outre de plus en plus de voyageurs revenant de pays où le Chikungunya et la Dengue sont endémiques introduisent ces virus dans la région européenne.

### 3.2.2. Réservoirs

- **Les réservoirs du CHIKV**

En période épidémique, l'homme est le seul réservoir du CHIKV. Dans les périodes inter-épidémiques, plusieurs animaux servent de réservoirs. On retrouve principalement les singes, les rongeurs, les oiseaux et d'autres vertébrés non identifiés (*Tsetsarkin KA et al. 2007*). En Afrique, la transmission suit un cycle sylvatique et enzootique. Les infections chez l'homme sont dues à des débordements occasionnels et ont lieu, la plupart du temps, dans des zones rurales. Les épidémies endémiques sont assurées par la présence des vecteurs *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*. En Asie, les hommes ont longtemps été considérés comme le seul réservoir. Récemment, l'existence potentiel d'un cycle de transmission sylvatique zoonotique impliquant les singes a été envisagé (*Yusoff AF et al. 2013; Rozilawati H et al. 2011*).

Le CHIKV sévit sous deux formes: endémique et épidémique. La forme endémique est africaine et rurale, considérée par une grande variété d'espèces vectorielles et de réservoirs avec une transmission forte et durable à des populations largement immunisées (*Diallo M et al. 1999; McIntosh BM et al.*). La forme épidémique est plutôt asiatique et urbaine, transmise par *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* à des populations peu immunisées. Le virus se maintient alors par un cycle moustique-homme-moustique. Chez l'homme, le virus provoque des épidémies soudaines et massives avec des taux d'attaque élevés (*Padbidri VS et al. 1979*). Dans ce modèle, les épidémies fléchissent puis s'arrêtent progressivement à mesure que la population s'immunise.

- **Les réservoirs du DENV**

Le DENV est un des rares arbovirus à ne pas avoir de cycle enzootique. Le virus est maintenu par un cycle de transmission moustique-homme-moustique. Un cycle sylvatique existe dans les forêts d'Asie et d'Afrique de l'ouest entre primates et moustiques mais la contribution de ce cycle semble mineure en comparaison au cycle épidémique urbain (*Whitehead SS et al. 2007*). Grâce à la virémie élevée occasionnée lors de l'infection chez l'homme le virus ne nécessite pas d'hôte intermédiaire amplificateur.

### 3.3. Historique des épidémies

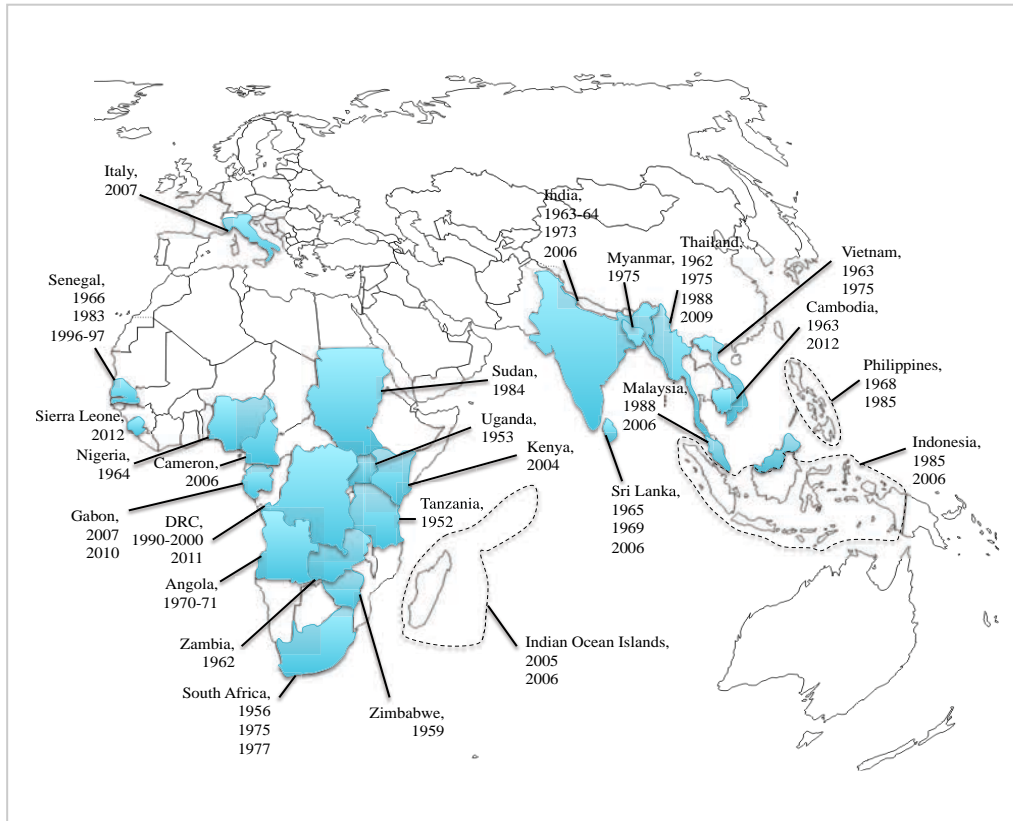
- **Les épidémies de Chikungunya**

La première épidémie de CHIKV a été rapportée en 1952 entre l'actuelle Tanzanie (ex Tanganyika) et le Mozambique (*Robinson MC et al. 1955*). Des études rétrospectives ont suggéré que des épidémies de CHIKV auraient pu avoir lieu dès 1779 mais elles étaient alors documentées comme des épidémies de Dengue (*Carey DE et al. 1971*). Le virus a été isolé pour la première fois à partir de sérum de patients fébriles en 1952 (*Ross RW et al. 1956*).

Entre 1960 et 1990, des épidémies mineures de Chikungunya ont été reportées dans plusieurs régions du monde (faible prévalence). Le CHIKV a ainsi été isolé dans plusieurs régions d'Afrique Centrale et d'Afrique du Sud. Des épidémies ont été reportées en Ouganda (*Weinbren MP et al. 1958*), Afrique du Sud (*McIntosh et al. 1963*) Zimbabwe, Zambia, Nigeria (*Moore DL et al. 1974*), Sudan (*McIntosh BM et al. 1963*) et République Démocratique du Congo (*Muyembe Tamfum JJ et al. 2003*). En Afrique de l'Ouest, des épidémies ont été observées au Sénégal, Côte d'Ivoire, République de Guinée et Nigéria (*Powers AM et al. 2007; Ivanov AP et al. 1992*) En Asie, durant cette période, des épidémies ont fréquemment été reportées en Thaïlande, Inde, Malaisie, Indonésie, Vietnam, Philippines, Sri Lanka, Cambodge et dans les Iles du Pacifique (*Nimmannitya S et al. 1969; Porter KR et al. 2004; Deller JJ Jr et al. 1968; Sam IC et al. 2006; Mackenzie JS et al. 2001*). Les épidémies les plus importantes sont celles de Bangkok en 1960 et celles d'Inde de 1963 à 1973 (*Shah KV et al. 1964*).

Entre 1999 et 2000, une grande épidémie a lieu en République démocratique du Congo avec plus de 50 000 cas cliniques répertoriés (*Muyembe-Tamfum JJ et al. 2003*). Quatre Années plus tard, en 2004, une épidémie majeure débute en Afrique de l'Est, sur l'Ile de Lamu puis au Kenya à Mombasa (*Sergon K et al. 2007*). En 2005, une dissémination du CHIKV s'en suit au niveau de plusieurs Iles de l'Océan Indien : les Iles Comores, La Réunion, Les Seychelles, l'Ile Maurice et Madagascar (*Sissoko D et al. 2008*). En 2006, La Réunion est touchée à son tour et un tiers de sa population est infectée donnant lieu à environ 266 000 cas symptomatiques (*WHO, 2007*). Cette épidémie touche ensuite le Cameroun en 2006 puis le Gabon en 2007 (*Peyrefitte CN et al. 2007; Leroy EM et al. 2009*). Au Gabon, l'épidémie touche principalement Libreville et donne lieu à 17 618 cas. Au même moment en Inde, une large épidémie touche 1,39 million de cas sur 16 états. Durant cette période, le CHIKV a également

causé des épidémies à Andaman dans les Iles Nicobar, en Malaisie, Indonésie et au Sri Lanka. Cette année a également été marquée par la première transmission connue de cas autochtones dans la province de Ravenne en Italie (*Angelini P et al. 2008; Watson R et al. 2007*). Depuis ces quatre dernières années, des épidémies mineures ont été reportées au Gabon (2010), en République démocratique du Congo (2011), au Cambodge (2012) et en Sierra Leone (2012) (*Caron M et al. 2012; Duong V et al. 2012; Ansumana R et al. 2013*). Actuellement, des cas importés de Chikungunya ont été décrits dans plusieurs pays d'Europe (*Napoli C et al. 2012; Schwartz O et al. 2010; Hochedez P et al. 2007*). Le CHIKV représente donc de plus en plus une menace pour les pays d'Europe et d'Amérique, déjà colonisés par les moustiques *Aedes* (**Figure 10**).



**Figure 10. Distribution géographique des épidémies de Chikungunya dans les régions d’Afrique et d’Asie. Les pays touchés par des épidémies sont colorés en bleu et le nom du pays ainsi que l’année sont détaillés.**

- **Les épidémies de Dengue**

Endémique dans 112 pays en Afrique, aux Amériques, en Méditerranée, en Asie du Sud-Est et dans l'Ouest Pacifique, le DENV et ses vecteurs ont une distribution très large dans de nombreux pays tropicaux depuis plus de 200 ans (*Gubler DJ et al. 1998*). La première épidémie ressemblant fortement à la Dengue fut décrite en Philadelphie en 1780. Durant les 18<sup>ème</sup> et 19<sup>ème</sup> siècles, des épidémies furent reportées en Amérique du Nord, aux Caraïbes, en Asie et en Australie (*Gubler DJ et al. 2004; Ehrenkranz NJ et al. 1971; Hayes GR et al. 1957*). Le virus fut isolé pour la première fois en 1944 (*Sabin AB et al. 1945*). Du fait de l'exposition limitée des populations non immunisées à de nouveaux sérotypes, les premières épidémies étaient espacées par de longs intervalles de temps allant de 10 à 40 ans. En 1954, la forme hémorragique fut reportée pour la première fois durant une pandémie touchant l'Asie du Sud-Est (*Halstead S et al. 1988*). A partir des années 1970, les infections à DENV sont devenues cause fréquente de morbidité et de mortalité, notamment chez les enfants. Une pandémie majeure affecta 56 pays en 1998 touchant 1,2 million de personnes (*Rigau-Perez JG et al. 1998*).

Durant les 30 dernières années, la fièvre Dengue (FD) est devenue la plus importante pathologie arbovirale humaine. Les quatre sérotypes circulent actuellement à l'état endémique dans toutes les régions tropicales selon une distribution suivant celle du vecteur moustique. On estime chaque année entre 50 à 100 millions le nombre de cas de FD, et 500 000 le nombre de cas de formes hémorragiques avec un taux de mortalité moyen de 5% mais qui peut parfois monter à 20% lors de certaines épidémies (*Halstead SB et al. 1999*). Les populations à risque habitent les régions tropicales et subtropicales et représentent 40% de la population mondiale. Cette dernière décennie a aussi vu la fréquence des épidémies à multiples sérotypes augmenter (*Chaturvedi UC et al. 2004*) (**Figure 11**).





### **3.4. La maladie**

#### **3.4.1. Les manifestations cliniques**

Les cycles de l'infection du CHIKV et DENV suivent le schéma suivant: (i) le moustique prend son repas sanguin à partir d'un hôte infecté, devant contenir une concentration suffisante de virus afin de lui permettre de passer du tube digestif aux autres tissus (cycle extrinsèque), (ii) il s'ensuit une période d'incubation allant de quelques jours à quelques semaines durant laquelle le virus se réplique dans les glandes salivaires qui deviennent infectées de façon persistante, permettant au virus d'être transmis à différents hôtes durant toute la vie du moustique (iii) l'infection des hôtes vertébrés conduit à une multiplication virale, voire à une virémie, avec une symptomatologie clinique (*Ryman KD et al. 2008*).

#### **Le Chikungunya chez l'homme**

##### **La forme classique**

Le terme Chikungunya signifie dans la langue Makondé de la Tanzanie et du Mozambique « celui qui marche courbé », faisant référence à la posture des patients souffrant des douleurs articulaires invalidantes. La première description clinique a été rapportée par Marion Robinson lors de l'épidémie de 1952-1953 en Tanzanie (*Robinson MC et al. 1955*). Il s'agit alors d'un syndrome dengue-like classiquement décrit comme bénin, d'évolution aigüe ou subaigüe (*Deller JJ et al.; Jeandel P et al. 2004*).

Après une période d'incubation silencieuse de 4 à 7 jours (extrêmes 1 à 12 jours), on observe l'apparition des symptômes cliniques caractérisés par une forte fièvre ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ), des frissons, céphalées, myalgies, polyarthralgies atteignant classiquement les genoux, les chevilles et les petites articulations et enfin un rash maculo-papuleux. Ce dernier peut toucher le visage, le cou, le tronc ou les membres mais surtout le thorax qui peut être associé à un œdème facial (*Deller JJ et al. 1967; Simon F et al. 2007; Fourie ED et al. 1979*). Des hémorragies minimales (purpura et gingivorragies) sont rarement observées et concernent surtout les enfants (*Brighton SW et al. 1973*). Les atteintes articulaires sont très caractéristiques du Chikungunya et peuvent entraîner une incapacité fonctionnelle importante. Elles sont aggravées chez le sujet âgé par la

déshydratation. Plus récemment, deux études réalisées chez l'adulte ont montré qu'environ 60% des patients présentaient des arthralgies chroniques 15 à 18 mois après l'infection (*Borgherini G et al. 2008; Sissoko D et al. 2009*). Les tableaux d'arthrites post-infectieuses ressemblent beaucoup à ceux décrits dans le cas d'une infection RRV (*Clarris BJ et al. 1975*). Les formes asymptomatiques constituent environ 5-15% des cas, taux relativement bas comparé à d'autres viroses (*Biggerstaff B et al. 2003; Gerardin P et al. 2008*).

Sur le plan biologique, paradoxalement à la forte fièvre observée, les paramètres biologiques et inflammatoires classiques (ALAT, ASAT, CRP, fibrinogène, complément) sont peu ou pas augmentés (*Fourie ED et al. 1979 ; Kennedy AC et al. 1980, Borgherini G et al. 2007; Taubitz W et al. 2007*). Néanmoins une lymphocytose et une thrombopénie caractérisent la phase aigüe initiale (**Figure 12, 14**).

### **Les formes graves**

Mis à part les atteintes articulaires qui peuvent persister pendant plusieurs mois et être très invalidantes, l'évolution générale est la plus souvent bénigne, en moins de 10 jours (*Jeandel P et al. 2004; Brighton SW et al. 1983*). Aucun décès ni forme clinique grave n'avaient été rapportées jusqu'à l'épidémie de la Réunion en 2006 (*Pialoux G et al. 2006*). Parmi les formes graves on peut citer des cas d'encéphalites, des cas de syndrome de Guillain-Barré, des hépatites graves avec indication de greffe dans près de la moitié des cas, quelques cas de péricardite et myocardite, des complications iatrogènes, des surinfections bactériennes probablement fortuites sous forme de septicémie à *Listeria*, des pneumonies et des chocs septiques (*Schuffenecker I et al. 2006; Obeyesekere I et al. 1973*). Les formes graves ont été observées chez des patients présentant de multiples comorbidités (pathologies cardiovasculaires, diabète) (**Figure 12**).

<b>Manifestations cliniques</b>	<b>fréquence</b>
Fièvre	Habituel
Eruption	J1-J4
Douleurs rétro-orbitaires	Peu fréquent
Myalgies	Habituel
Arthralgies	Constant
Arthrites	Habituel
Ténosynovites	Habituel
Hypotension	Peu fréquent
Saignements mineurs	Exceptionnel
Thrombopénie	Précoce et modérée
Lymphopénie	Habituel
Evolution	Arthralgies chroniques

**Figure 12. Manifestations cliniques observées chez les patients infectés par le CHIKV (D'après Simon F et al. 2011).**

- **La dengue chez l'homme**

La dengue se manifeste par un large spectre de manifestations cliniques variant de la forme asymptomatique, à une forme classique de fièvre non différenciée jusqu'aux infections sévères avec les formes de dengue hémorragique ou de dengue associée à un syndrome de choc (DHF/DSS, *Dengue Hemorrhagic Fever/ Dengue Shock syndrome*). Les formes cliniques de dengue étaient précédemment décrites selon des stades I-IV mais une classification simplifiée a été proposée en 2009 par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) regroupant les formes DHF et DSS sous forme de « dengue sévère » (*WHO, 2009*) (**Figure 13**).

### **Forme classique : fièvre Dengue**

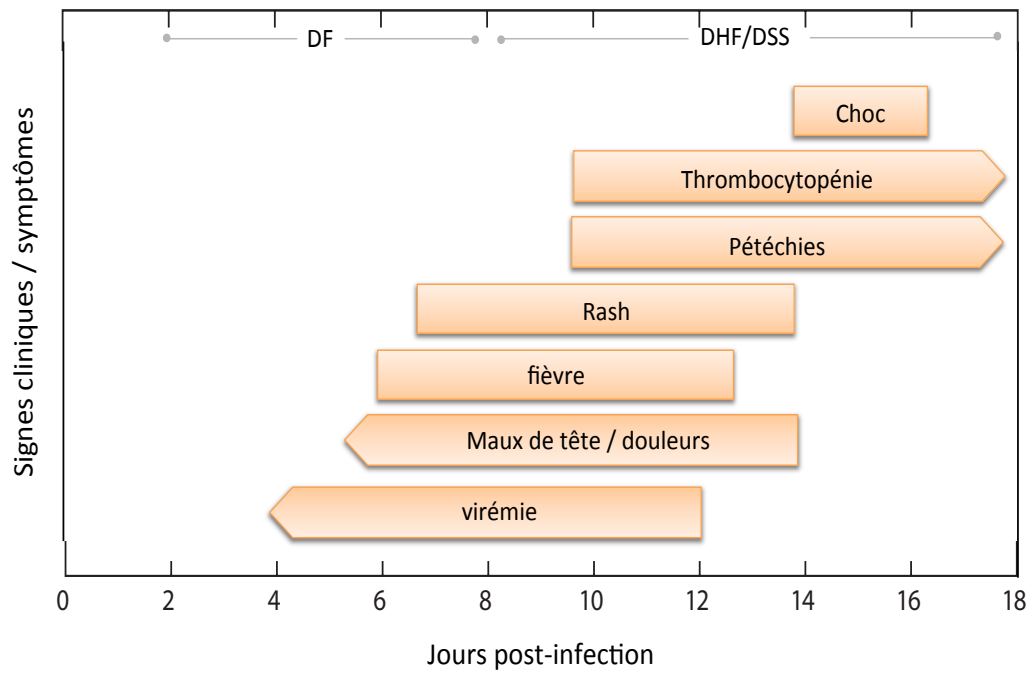
Après une période d'incubation allant de 3 à 8 jours (extrêmes 2 à 15 jours) la forme classique de fièvre Dengue (DF, *Dengue fever*) se manifeste par une fièvre élevée ( $\geq 39^{\circ}\text{C}$ ) qui apparaît brutalement, des céphalées, myalgies ou lombalgies et une congestion des conjonctives. Durant la phase fébrile, la déshydratation peut causer des troubles neurologiques ainsi que des convulsions chez les enfants (*WHO, 2009*). Les manifestations dermatologiques sont fréquentes et apparaissent généralement 3 à 5 jours après le début de la fièvre. Elles incluent des érythèmes de la face et du cou ou encore un rash maculo-papuleux de la face, des bras et des jambes (*Henchal EA et al. 1990*). La DF est parfois nommée « maladie qui casse les os » en référence aux douleurs musculaires et articulaires très invalidantes ou encore « fièvre des sept jours » en référence aux symptômes qui perdurent généralement pendant sept jours (*Rush B et al. 1789*). La fièvre peut néanmoins être biphasique sur cette période et la convalescence reste longue, asthénie et douleurs pouvant persister pendant plusieurs semaines (*Qui FX et al. 1993; Armien B et al. 2008*).

Sur le plan biologique, une leucopénie, une thrombocytopénie et une cytolyse hépatique sont observées dans une proportion significative de patients (**Figure 15**).

### **Formes sévères et complications inhabituelles**

On ne peut discerner les symptômes initiaux des formes classiques et formes sévères mais la forme DHF est par la suite associée à des manifestations hémorragiques, une fuite plasmatique résultant d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et une thrombocytopénie ( $< 100\ 000$  plaquettes/ $\text{mm}^3$ ). La fuite plasmatique est caractérisée par

une hémococoncentration, le développement d'ascite ou d'effusion pleurale. La forme DSS se distingue de la forme DHF par la présence d'une insuffisance cardiaque. Des effusions séreuses dans les cavités pleurale et abdominale associées à des hémorragies internes peuvent aboutir à un choc hypovolémique puis au décès du malade en moins d'une semaine après le début de la fièvre. Les formes sévères sont par ailleurs 15 à 80 fois plus fréquentes au cours d'une infection secondaire (*Halstead SB et al. 1982*). Chez le nourrisson elles peuvent apparaître lors d'une infection primaire, à cause d'anticorps anti-dengue acquis par la mère (*Halstead SB et al. 2002*) (**Figure 13**).



**Figure 13. Signes cliniques et symptômes au cours de temps.** (D'après Murphy BR, *Annu. Rev. Immunol*)

### 3.4.2. Le diagnostic biologique

- **Détection du virus : isolement viral par culture cellulaire**

La mise en évidence du virus par isolement sur cellules à partir de sérums n'est réalisable que pendant la phase virémique, du 1<sup>er</sup> au 7<sup>ème</sup> jour de la maladie. Elle s'effectue pour le CHIKV et le DENV sur des lignées stables de cellules de moustiques *Aedes C6/36* ou *AP61* ou sur des cellules Vero (cellules rénales de singe vert africain) (*Pastorino B et al. 2005*). L'effet cytopathogène (ECP) est observé après 2 à 3 jours de culture pour le CHIKV mais n'est pas toujours présent pour le DENV (*Pastorino B et al. 2004*). La virémie peut atteindre des taux très élevés allant jusqu'à  $10^{10}$  copies d'ARN/ml pour le CHIKV et  $10^7$  copies d'ARN/ml pour le DENV (*Grivard P et al. 2007; Vaughn DW et al. 2007*). Cette technique permet de poser un diagnostic dans un délai de 3 à 10 jours et n'est donc pas adaptée aux situations d'urgence. Elle est réservée aux laboratoires spécialisés et reste très utile pour confirmer avec certitude la nature du virus.

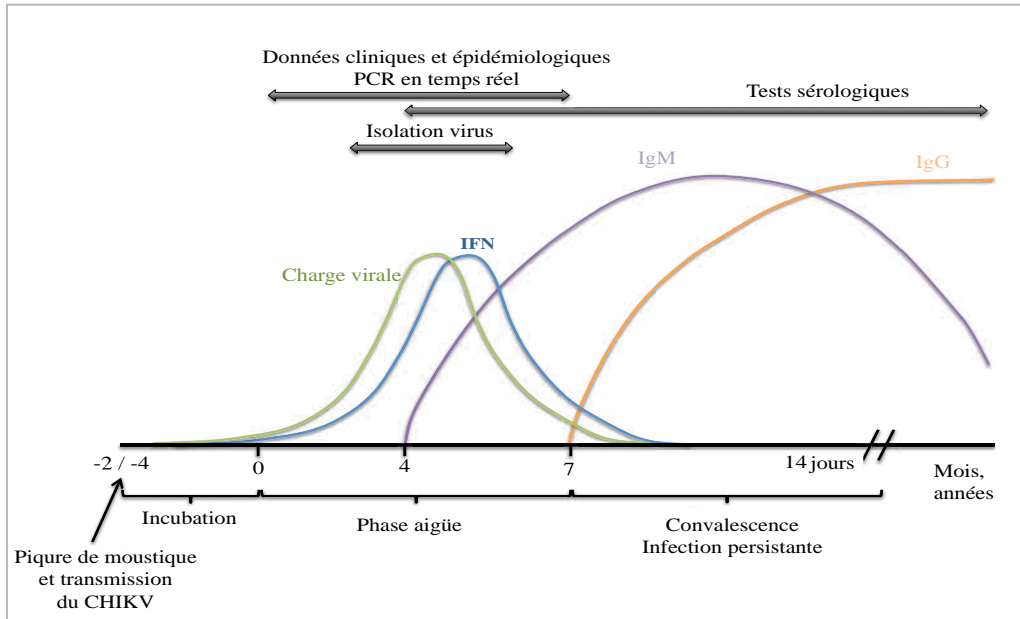
- **Détection du génome viral : RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) et RT-PCR en temps réel**

La confirmation du diagnostic au cours de la phase aigüe est basée sur la détection de l'ARN viral par RT-PCR, à partir du sérum ou du plasma, en phase virémique (entre le 1<sup>er</sup> et 7<sup>ème</sup> jour). Cette technique permet un diagnostic rapide en phase aigüe avant l'apparition des anticorps (*Pfeffer M et al. 2002; WHO, 2009*). Plusieurs outils de RT-PCR (*SYBR green, Taqman probe-based technology*) ont été développés sur la base du gène de la protéine non structurale *nsp1* ou du gène de la protéine d'enveloppe E1 du CHIKV (*Chen et al. 2013*). D'autres méthodes sont en cours de développement pour le diagnostic de la Dengue comme par exemple la méthode NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*) (*WHO, 2009*). Même si la détection de l'ARN viral n'est possible qu'en phase virémique, la RT-PCR reste la méthode de référence en laboratoire pour la détection du CHIKV et DENV. Les avantages sont la sensibilité et la rapidité (**Figure 14, 15**).

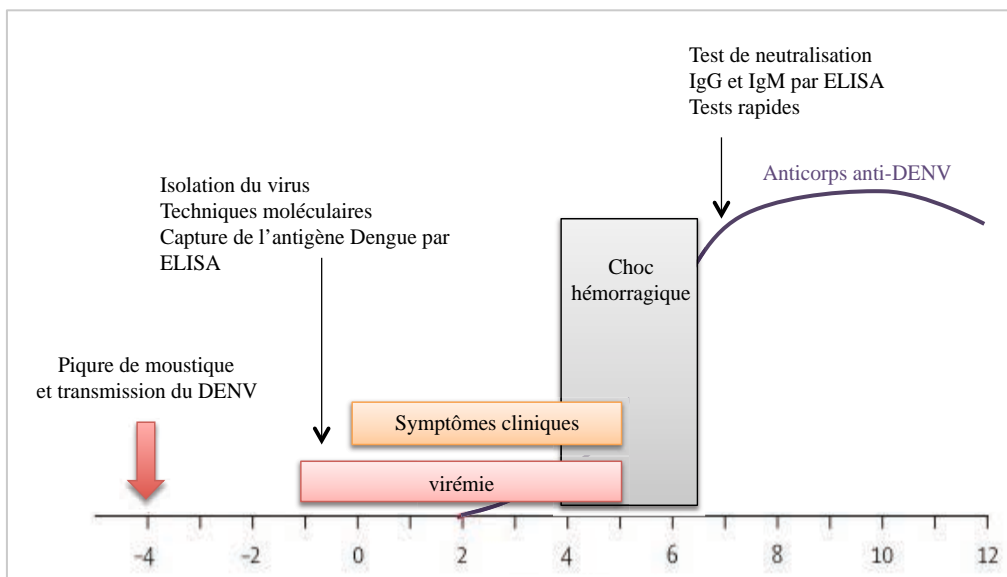


- **Les tests sérologiques**

Le diagnostic sérologique repose sur la détection d'IgM et IgG dans le plasma ou le sérum des patients en phase aigüe ou convalescente. Il repose sur les méthodes suivantes: le test d'inhibition de l'hémagglutination (HIA – *Hemmagglutination-Inhibition Assay*), la fixation du complément, l'immunofluorescence indirecte et le test immuno-enzymatique ELISA. La mise en évidence des anticorps débute par celle des IgM détectables à partir du 4<sup>ème</sup> ou 5<sup>ème</sup> jour puis est poursuivie par la séroconversion avec l'apparition des IgG vers le 10<sup>ème</sup> jour (*Panning M et al. 2008*). Les IgM sont présents en moyenne 8 à 12 semaines mais peuvent être encore détectés plusieurs mois après le début de la maladie alors que les IgG apparaissent en 15 ou 20 jours et persistent pendant des années. Le diagnostic d'une infection aigüe est confirmé par la séroconversion ou l'augmentation significative du taux d'IgG sur deux sérums réalisés à deux semaines d'intervalle. Néanmoins, il faut prendre en compte la possibilité de faux positifs due à des réactions croisées avec les IgM dirigés contre d'autres arbovirus (*Blackburn NK et al. 1995*). Plusieurs études s'accordent sur le fait que la persistance des IgM chez des sujets souffrant d'arthrite post-CHIK serait liée à la persistance de matériel viral dans des gîtes sanctuaires (*Kuno G et al. 2001; Malvy D et al. 2009*). Les inconvénients des méthodes sérologiques ont poussé au développement de méthodes alternatives comme par exemple pour le DENV, la détection de la protéine virale NS1. La quantité de protéine NS1 sécrétée dans le sérum du patient corrèle avec la virémie et la pathogénèse. La protéine NS1 est détectable dans le sérum par ELISA à partir du 1<sup>er</sup> jour et jusqu'à 9 jours après le début de l'infection (*Libraty DH et al. 2002, Alcon S et al. 2002*). Cette méthode est devenue un outil de diagnostic important pour les échantillons en phase aigüe pour lesquels les IgM ne sont pas détectables et lorsque la PCR n'est pas disponible. Des kits commerciaux basés sur l'antigène NS1 sont commercialisés. Le typage de DENV est effectué par tests sérologiques et éventuellement par RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques pour chacun des sérotypes. La cinétique d'apparition des IgM et des IgG étant différente en cas d'infection secondaire et d'infection primaire, le ratio IgM/IgG peut être utilisé pour différencier une dengue primaire d'une dengue secondaire (*WHO, 2009*) (**Figure 14, 15**).



**Figure 14. Evolution de l'infection par le CHIKV et diagnostic clinique.** Après transmission du CHIKV par une pique de moustique infecté débute une période d'incubation qui dure en moyenne de 2 à 4 jours. Après cela on observe l'apparition de manifestations cliniques qui peuvent durer entre 7 et 14 jours. Pendant cette période, la charge virale peut être très élevée avec une estimation de  $3.3 \times 10^9$  copies de virus/ml dans le sang. Il s'en suit une activation de l'immunité innée avec des taux élevés d'IFN. Les anticorps anti-CHIKV sont détectés peu de temps après le début des symptômes, généralement à partir du jour 2 jusqu'au jour 6 pour les IgM, par Elisa ou IIF. Les IgG sont détectables seulement quelques jours plus tard (7-15 jours) et peuvent persister des semaines après l'infection.



**Figure 15. Diagnostic clinique de l'infection par le DENV.** Le virus peut être détecté par culture, techniques moléculaires ou test ELISA pendant la phase virémique. Les anticorps sont le plus souvent détectables à la fin de la période fébrile par test ELISA ou test rapide.

### 3.4.3. Traitements et pistes vaccinales

#### 3.4.3.1. Traitements

Il n'existe pas de traitement préventif ni de traitement spécifique pour le Chikungunya et la Dengue. En l'absence de traitement antiviral spécifique, la prise en charge est centrée sur la surveillance et les traitements symptomatiques par la prescription d'antalgiques et antipyrétiques. Le traitement des formes graves (neurologiques, hépatiques, dermatologiques) associe à ces médicaments le maintien des fonctions essentielles. L'aspirine est contre-indiquée en raison de l'aggravation potentielle des manifestations hémorragiques (*Simon F et al. 2007*).

Dans le cas du Chikungunya, un des objectifs majeurs est de pouvoir améliorer la prise en charge des douleurs articulaires. Plusieurs traitements sont actuellement en cours de développement, tel que la Ribavirine, les IFNs ou l'immunothérapie passive. Des études ont montré que l'association de la Ribavirine/IFN- $\alpha$  induit un effet antiviral synergique *in vitro* (*Briolant S et al. 2004*). L'inconvénient de ce traitement est que la combinaison des deux molécules est difficile à administrer et qu'il est compliqué à mettre en place rapidement dans le cadre d'une épidémie. Des expériences basées sur le transfert passif de sérum de sujets immunisés ont suscité un intérêt, en particulier chez le nouveau-né dont la mère serait virémique ainsi que chez certains sujets à risque (*Couderc T et al. 2009*).

#### 3.4.3.2. Pistes vaccinales

Aucun vaccin n'est disponible pour le Chikungunya et la Dengue. Néanmoins plusieurs pistes vaccinales ont déjà été testées ou sont en cours de développement.

Un vaccin vivant atténué contre le CHIKV a été développé par l'institut de recherche médicale de l'armée américaine des maladies infectieuses (USAMRIID- U.S. *army Medical Research Institute of Infectious Diseases*) (*Levitt N et al. 1986*). Ce vaccin, nommé CHIKV 181/25, fut basé sur la souche virale 181/25 dérivée de la souche 15561 (souche isolée à partir d'un patient infecté par le CHIKV en Thaïlande) avec atténuation par passages successifs sur des cultures de cellules M5-C. Les tests ont montré une protection après challenge par le CHIKV chez des souris et des macaques rhésus. Ce vaccin a ensuite été testé chez l'homme et 8,5% des participants développaient des douleurs articulaires modérées (*Edelman R et al. 2000*). Même si ce vaccin paraissait

prometteur, des études récentes ont montré que cette souche n'était atténuée que de deux mutations suggérant un potentiel de réversion trop élevé en raison de l'instabilité du génome ARN. Plus récemment, d'autres types de vaccins, ADN synthétique ou virus chimérique, ont été testés chez la souris et semblent être prometteurs. Dernièrement, un vaccin a également été développé sur la base de l'insertion d'une séquence IRES (*Internal Ribosome Entry Sequence*) entre des gènes non structuraux et structuraux du CHIKV. Le premier effet de ce vaccin CHIK-IRES est d'empêcher la transmission du virus par le moustique infecté puisque les moustiques n'ont pas la capacité de traduire les protéines à partir des régions IRES. Le deuxième effet est de permettre l'inactivation de la production des protéines structurales en remplaçant le promoteur par des régions IRES. Ce vaccin a été testé chez la souris et aucun signe de morbidité ou mortalité n'a été observé (*Plante K et al. 2011*). Enfin, des vaccins basés sur des particules virales (VLP- *Virus-Like-Particles*) ont également été développés. Des protéines de structures du CHIKV ont été transfectées dans des cellules HEK293 et ensuite exprimées afin de former des VLPs. Ils ont été testés chez le singe et les résultats ont montré des titres élevés d'anticorps neutralisants ainsi qu'une protection contre la virémie après challenge (*Akahata W et al. 2010*). Ce vaccin est actuellement en phase I d'essai clinique chez l'homme.

Concernant le DENV, le challenge est d'autant plus grand du fait que la vaccination doit protéger contre les quatre sérotypes et éviter le phénomène d'amélioration dépendante des anticorps à l'infection (ADE- *Antibody Dependent Enhancement*).

Historiquement largement touché par des cas de dengue lors de ses campagnes dans des pays endémiques, l'armée américaine a soutenu de nombreuses recherches pour la fabrication d'un vaccin atténué. En 1971, un candidat vaccin vivant atténué tétravalent est développé par GSK/WRAIR. Il est composé d'un mélange de quatre souches vaccinales (*Simasathien S et al. 2008*). Parallèlement l'université de Mahidol à Bangkok, en association à Aventis puis Sanofi/Pasteur, a mis au point le vaccin ChimeriVax-DEN tétravalent composé d'un mélange de quatre souches vaccinales chimériques, exprimant les gènes prM et E des virus DEN-1, -2, -3 et -4 (*Guirakhoo F et al. 2004*). Ces vaccins vivants atténués, qui ont été les premiers candidats prometteurs, se sont heurtés à de nombreuses difficultés d'atténuation ou d'interaction entre sérotypes pour atteindre un équilibre satisfaisant entre immunogénicité et réactogénicité. Il ne semble plus que ce type de vaccin représente l'avenir de la vaccination contre la dengue.

Parallèlement d'autres candidats vaccins ont été élaborés tels que (i) les vaccins recombinants rDEN1r30 et rDEN2/4r30(M/E), des vaccins recombinants/chimérique en essais cliniques de phase I et II (ii) le vaccin ADN plasmidique élaboré par l'US Navy Medical Research Center qui exprime les protéines prM et E (iii) un vaccin sous-unité tétravalent de Hawaii Biotech composé des protéines E et NS1 des différents sérotypes de dengue ou encore (iv) un vaccin vecteur basé sur le vaccin de la rougeole qui permettrait une double vaccination rougeole/dengue en utilisant comme machine répliquative l'adénovirus (*Men R et al. 1996 ; Widman DG et al. 2008; Raviprakash K et al. 2008*).

La vaccination contre la dengue a largement progressé depuis une quinzaine d'années grâce à l'amélioration des techniques et plusieurs candidats pourraient se positionner dans des stratégies vaccinales. Une meilleure compréhension des mécanismes immuno-pathologiques entre le virus et les cellules cibles reste nécessaire à l'élaboration d'un vaccin efficace.

#### **3.4.4. Mesures de prévention**

En l'absence de vaccins et de traitements spécifiques, seules les mesures de protection individuelle contre les piqûres de moustiques et la lutte anti-vectorielle jouent un rôle préventif pour le Chikungunya et la Dengue.

Les moyens de protection physique incluent vêtements, répulsifs et moustiquaires. Les moustiques incriminés étant diurnes, les moustiquaires sont peu efficaces mais leur utilisation est recommandée pour les enfants et les femmes enceintes. En raison de la forte virémie pendant la maladie, il faut également insister sur la nécessité d'isoler les malades afin de limiter la dissémination du virus.

La lutte anti-vectorielle est mécanique, chimique et biologique. Différentes actions de lutte sont menées pour réduire le nombre de gîtes larvaires telle que la suppression des réserves d'eau stagnante à proximité des maisons. Des larvicides chimiques de type organophosphorés, pyréthrinoides ou encore des larvicides biologiques tel que *Bacillus thuringiensis israelensis* sont aussi utilisés. La difficulté de la lutte anti-vectorielle relève de l'éducation et du maintien de la sensibilisation de la population, ce qui nécessite régulièrement des rappels (*Delatte H et al. 2008*). Malgré tous ces moyens, le contrôle vectoriel est difficile à mettre en place et peu efficace. Ces échecs sont généralement attribués au manque de connaissance de la bio-écologie de l'insecte

vecteur et de la stratégie inappropriée du contrôle vectoriel. Il doit aussi tenir compte du niveau socio-culturel, de l'éco-épidémiologie ainsi que des changements climatiques.

### 3.5. Physiopathologie des infections

#### 3.5.1. Physiopathologie du Chikungunya

- **Dissémination du virus et atteinte des différents organes cibles.**

Suite à l'inoculation intradermique par les moustiques infectés, le virus entre directement au niveau des capillaires sanguins sous-cutanés et débute immédiatement sa réplication. Différents types de cellules résidentes sont susceptibles d'être infectées telles que les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales (*Kupper TS et al. 2004; Sourisseau M et al. 2007; Labadie K et al. 2010*). Le virus pourrait également se répliquer dans les cellules progénitrices du muscle et dans les cellules satellites, cependant, il ne se réplique pas dans les lymphocytes et monocytes (*Ozden S et al. 2007; Sourisseau M et al. 2007*). Bien que l'immunité innée intervienne immédiatement pour contenir la dissémination virale, le CHIKV réussit malgré tout à se propager via des cellules immunes migratrices, ou sous forme libre, gagnant ainsi la circulation sanguine et les ganglions lymphatiques. Une fois dans le sang, le virus a alors accès à différentes parties du corps et atteint certains organes tels que le foie, les muscles, les articulations et le cerveau (*Rinaldo C et al. 1975; Ozden S, et al. 2007; Ziegler S et al. 2008; Kam Y et al. 2009*). Les événements associés à l'infection avant même l'apparition des symptômes se situent dans le foie (apoptose des hépatocytes) et dans les organes lymphoïdes (adénopathie) alors que l'infiltration des cellules mononuclées et la réplication virale au niveau des muscles et des articulations sont associées aux fortes douleurs articulaires.

- **Immunophysiopathologie**

La phase aigüe de l'infection par le CHIKV est typique d'une infection virale aigüe avec une production précoce et fulgurante d'IFN-I. Les IFNs jouent un rôle essentiel dans la pathologie du CHIKV. L'IFN- $\alpha$  est détectable dans les premiers jours suivant l'infection et sa concentration est corrélée à la charge virale (*Borgherini G et al. 2007*). Un modèle souris a montré que contrairement aux souris sauvages, des souris IFN- $\alpha/\beta^{-/-}$  étaient sensibles à l'infection par le CHIKV et développaient une pathologie entraînant

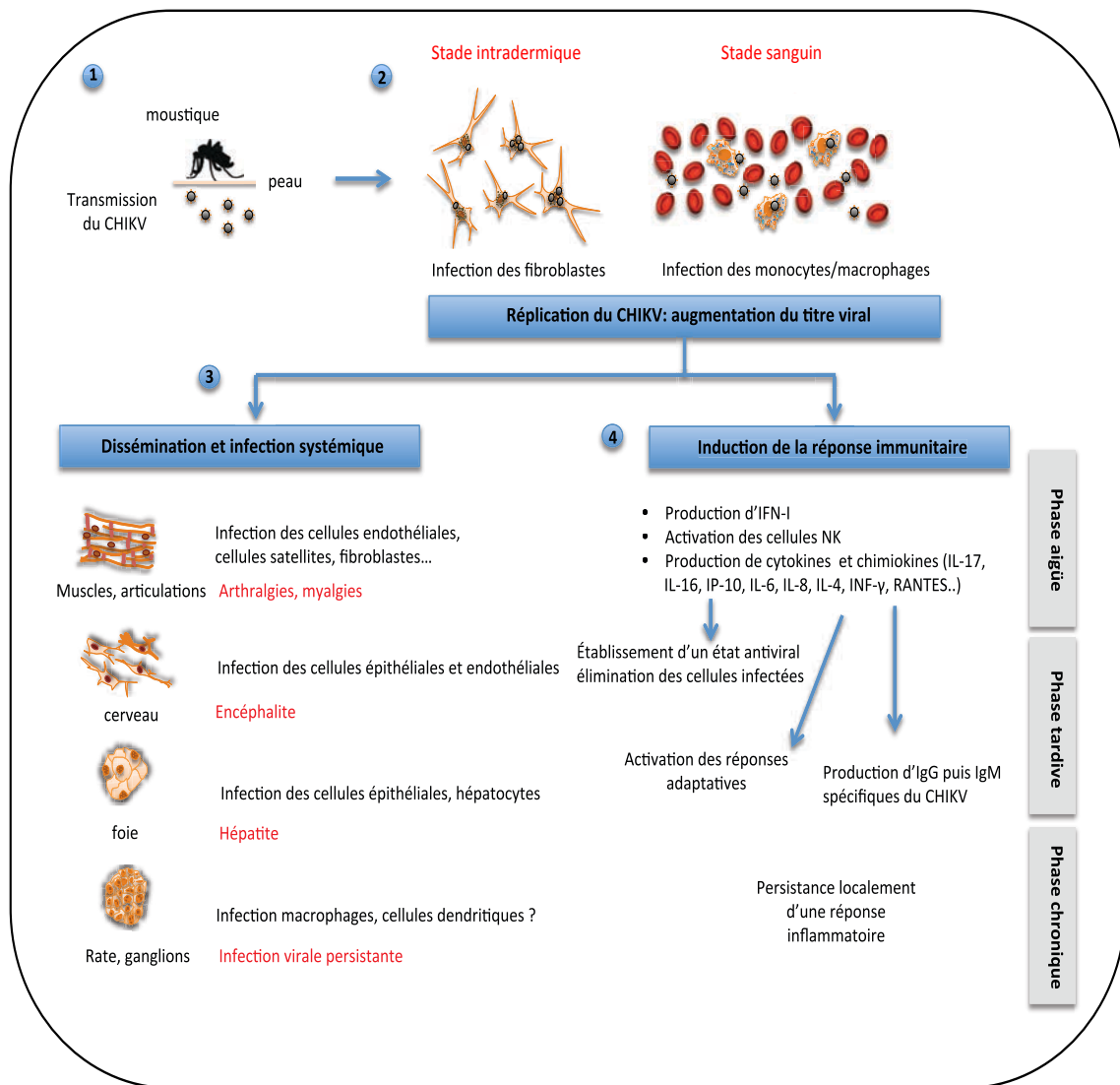
la mort de l'animal (*Couderc T et al. 2008*). De plus, une étude récente chez des patients infectés montre que le CHIKV induit une production importante de médiateurs inflammatoires avec notamment un niveau élevé d'IFN- $\alpha$  (*Wauquier N et al. 2011*). Les données publiées par *Schilte et al.* mettent en évidence l'implication majeure des fibroblastes dans la production des IFN- $\alpha/\beta$  (*Schlite C et al. 2010*). Au cours de la phase aigüe, en parallèle de cette production élevée d'IFN-I, une réponse inflammatoire importante est observée avec une production initiale d'IL-16, IL-17, MCP-1, IP-10 et RANTES (*Sourisseau M et al. 2007*). La cytokine pro-inflammatoire IL-12 est aussi rapidement détectée après le début de l'infection (*Her Z et al. 2010*). Avec l'IFN- $\alpha$ , elle participe à l'activation des cellules NK (*Gherardi MM et al. 2003*). L'implication des cellules NK dans l'infection par le CHIKV reste peu documentée et ambiguë. *Hoarau et al.* ont récemment montré que les cellules NK sont activées et semblent jouer un rôle important dans la réponse antivirale aigüe. A posteriori elles pourraient également contribuer à des mécanismes immunopathologiques en infiltrant les tissus synoviaux et en maintenant, avec les macrophages infectés résidents, un état inflammatoire persistant qui pourrait contribuer aux douleurs articulaires chroniques (*Hoarau JJ et al. 2010*). La fin de phase aigüe est marquée par une production d'autres cytokines tels que MIF, MIP-1 $\beta$ , SDF-1 $\alpha$ , IL-6 et IL-8 (*Sourisseau M et al. 2007*). Ces facteurs sont impliqués dans l'activation cellulaire et la stimulation de la migration des leucocytes sur le site inflammatoire. La réponse immune cellulaire est alors fortement impliquée avec notamment, le relargage d'IFN- $\gamma$ , IL-4 et IL-7, des cytokines impliquées dans la mise en place de l'immunité adaptative (*Wauquier N et al. 2011*). Les cytokines IL-4 et IL-10 sont augmentées dans les premiers jours suivant l'infection et sont impliquées dans l'activation des lymphocytes B qui initient la production d'IgG spécifiques du CHIKV. Il s'ensuit une activation des lymphocytes T-CD8<sup>+</sup>. *Wauquier et al.* ont montré, par cytométrie en flux, une activation des LT-CD8<sup>+</sup> circulants au stade précoce de l'infection, suivi d'un switch vers une réponse médiée par les LT-CD4<sup>+</sup> à un stade plus tardif (*Wauquier N et al. 2011*).

Généralement, le Chikungunya est une infection qui se résout spontanément en une dizaine de jours, avec une réponse immune adaptative efficace conférant une protection contre les réinfections. Cependant, dans certains cas, une forme chronique peut s'établir, marquée par la persistance des douleurs articulaires. Les symptômes chroniques persistent après élimination du virus au niveau de la circulation sanguine, mais il pourrait exister des réservoirs au niveau des articulations où le virus persisterait localement. Des mécanismes régulateurs sont nécessaires afin de stopper le processus

inflammatoire et d'éviter l'établissement d'une forme chronique. L'absence de ces mécanismes contribuerait aux arthralgies chroniques. La présence de marqueurs de l'inflammation (IFN- $\alpha$ , IL-8 et MMP-2) dans les fluides synoviaux a été mise en évidence chez des patients de la Réunion avec des douleurs chroniques et non chez les patients ayant résolu l'infection (*Hoarau JJ et al. 2010*). Ces résultats sont en concordance avec un modèle macaque mettant en évidence la présence de CHIKV dans des macrophages des tissus articulaires 90 jours après le début de l'infection (*Labadie K et al. 2010*). De plus, *Hoarau et al.* ont également rapporté des concentrations d'ARNm importantes d'IL-12 et d'IFN- $\alpha$  dans les cellules mononuclées du sang, 6 mois à 1 an après l'infection. Récemment, une équipe a développé un modèle souris qui évoque la contribution des LT-CD4<sup>+</sup> dans la persistance de l'inflammation. Des LT-CD4<sup>+</sup> infiltrés au niveau des articulations pourraient contribuer au développement des douleurs articulaires (*Teo TH et al. 2013*). Ainsi, la forme chronique du Chikungunya serait plutôt associée à une dérégulation de l'inflammation pendant les phases précoces et tardives de l'infection. L'absence de régulation résulterait en un processus inflammatoire qui pourrait perdurer jusqu'à un an ou plus après la fin des signes cliniques (*Dupuis-Maguiraga L et al. 2012*) (**Figure 16**).

Actuellement, les mécanismes sous-jacents à l'infection par le CHIKV en phase aiguë et chronique restent encore assez mal compris. Il semblerait néanmoins que la réponse immune mobilisée soit bénéfique, entraînant l'élimination du virus. La forte charge virale observée chez certains patients pourrait être la cause d'arthralgies persistantes, évoluant vers un tableau clinique d'arthrite inflammatoire de type rhumatoïde en lien avec la présence possible du virus dans les macrophages synoviaux.





**Figure 16. Modèle de la physiopathologie de l'infection par le CHIKV.** 1) Le virus est transmis au niveau de la peau par la pique d'un moustique *Aedes* infecté. 2) Le CHIKV se réplique au niveau de la peau dans les fibroblastes et dans le sang, dans les monocytes/macrophages. 3) Le virus est disséminé dans tout le corps au niveau du foie, des muscles, des articulations, des tissus lymphoïdes et du cerveau. 4) La réponse innée est rapidement mise en place avec des taux d'IFN élevés, une activation des cellules NK et une production de nombreuses cytokines et chimiokines induisant un état antiviral. La réponse adaptative est ensuite mise en place permettant la résolution de l'infection et la mise en place d'une mémoire à long terme. Dans certains cas le virus peut persister au niveau de réservoirs et donner lieu à des formes chroniques.

### 3.5.2. Physiopathologie de la Dengue

- **Tropisme cellulaire et tissulaire**

Après inoculation par un moustique infecté, les premiers cycles de réplication du virus ont lieu au niveau des cellules dendritiques de la peau, les cellules de Langerhans (*Ho LJ et al. 2001; Marovich M et al. 2001*). Ces cellules sont alors activées et migrent vers les ganglions lymphatiques (*Johnston LJ et al. 2000*).

La réplication du virus continue au niveau des ganglions lymphatiques dans des cellules non identifiées. Il pourrait s'agir de cellules mononuclées phagocytaires. L'infection est alors amplifiée au niveau des ganglions lymphatiques et la virémie est détectée une fois que le virus pénètre la circulation via le système lymphatique efférent.

La dissémination aux organes est limitée. Des antigènes de DENV ont été détectés dans les hépatocytes (*Couvelard A et al. 1999; Huerre MR et al. 2001*), au niveau de l'endothélium (*Jessie K et al. 2004; Ramos C et al. 1998*), dans les neurones cérébraux et dans les astrocytes (*Bhoopat L et al. 1996*) (**Figure 17**).

- **La réponse innée**

La majorité des cellules infectées par le DENV produisent des IFN-I. L'activation des DCs notamment entraîne une production robuste d'IFN- $\alpha/\beta$  et de TNF- $\alpha$ , ainsi qu'une forte réponse pro-inflammatoire afin de limiter la dissémination du virus (*Libraty DH et al. 2001*). Plusieurs études ont démontré *in vitro* et *in vivo* l'importance de cette production d'IFN (type I et II) dans la protection contre l'infection à DENV dans des modèles animaux (*Shresta S et al. 2004; Johnson AJ et al. 1999; Ho LJ et al. 2005*). *In vitro*, le prétraitement des cellules en culture par de l'IFN- $\alpha/\beta$  et de l'IFN- $\gamma$ , inhibe l'infection par DENV (*Diamond MS, et al. 2000*). *In vivo*, la souche DENV-2 adaptée à la souris est bien plus virulente chez des souris n'exprimant pas les récepteurs aux l'IFN- $\alpha/\beta$  et IFN- $\gamma$  (*Shresta S et al. 2004*). De nombreux travaux ont également montré la capacité du virus à inhiber la signalisation induite par l'IFN- $\alpha$ . Les protéines virales NS2A, NS4A, NS4B et NS5 bloquent en effet la signalisation en inhibant l'activation de STAT1 (*Munoz-Jordan JL et al. 2003; Ho LJ et al. 2005; Umareddy I et al. 2008; Ashour J et al. 2009*). En plus des IFNs, de nombreuses cytokines proinflammatoires semblent être importantes dans la pathogénicité du DENV. Les études menées jusqu'ici semblent indiquer qu'une production anormale de cytokines et chimiokines durant l'infection entraîne la perte de l'intégrité des endothéliums et participe ainsi au

déclenchement des complications de la dengue. Une augmentation significative des concentrations de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18 et MCP-1 a été observée chez les patients souffrant de DHF ou DSS. (*Greene S et al. 1999; Dong T et al. 2007; Basu A et al. 2008*).

La production de ces cytokines participe également à l'activation des cellules NK. Peu de données sont disponibles sur l'implication de ces cellules au cours de l'infection par DENV. Un modèle de souris a montré que cette infection induisait une augmentation rapide des cellules NK (*Shrestha et al. 2004*). L'augmentation de la fréquence des cellules NK a également été reportée chez des patients infectés par le DENV (*Azaredo EL et al. 2006*). Après activation, les cellules NK produisent de grandes quantités d'IFN- $\gamma$  permettant le contrôle de la réplication virale ainsi que l'activation de l'immunité adaptative subséquente. Les cellules NK semblent également être cytotoxiques vis-à-vis des cellules infectées. *Kurane et al.* ont montré que les NK étaient capables de lyser les cellules infectées via l'ADCC (*Kurane I et al. 1984*). L'implication de l'ADCC dans la dengue reste néanmoins controversée. *Garcia et al.* ont observé que l'ADCC était présent que dans le sérum au stade aigu des patients développant une forme de dengue sévère DHF/DSS mais pas chez ceux développant une forme classique de DF (*Garcia G et al. 2006*). Le développement de l'ADCC en phase aigüe de l'infection pourrait être associé aux manifestations pathologiques des formes sévères et le développement systématique d'ADCC après une infection primaire chez les patients convalescents pourrait être associée aux formes sévères au cours d'une infection secondaire. D'autres études ont cependant montré que l'ADCC pouvait aussi avoir un rôle protecteur dans le cadre d'infections secondaires (*Laoprasopwattana K et al. 2007*).

Néanmoins, plusieurs travaux ont aussi montré que le DENV induit une augmentation des molécules du CMH-I à la surface des cellules infectées ce qui pourrait constituer un mécanisme d'échappement aux cellules NK (*Yossef R et al. 2012; Lobigs M et al. 2003; Hershkovitz O et al. 2008*) (**Figure 17**).

- **La réponse cellulaire T**

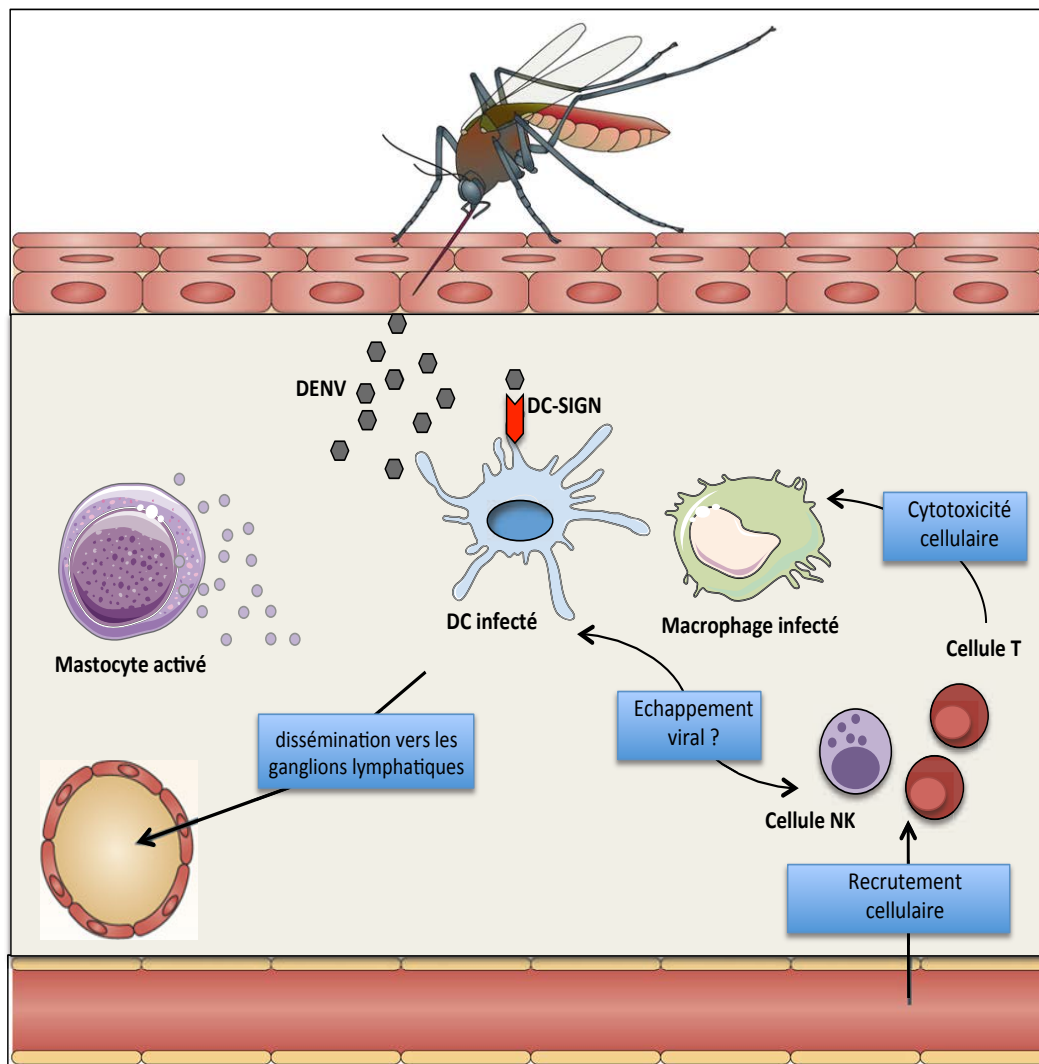
En réponse au DENV, les cellules T prolifèrent, lysent les cellules cibles et produisent diverses cytokines. Les LT peuvent être à la fois protecteurs et délétères. Après stimulation antigénique, les LT CD4<sup>+</sup> produisent de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et du TNF- $\beta$  des cytokines retrouvées à des concentrations élevées dans le plasma de patients développant des formes sévères, suggérant un rôle dans l'immunopathogénèse (*Gagnon SJ et al. 1999*). La production de cytokines de type Th2 tel que l'IL-4 est moins courante (*Mangada MM et al. 2004; Dong T et al. 2007*). Le rôle des LT-CD8<sup>+</sup> dans l'infection n'est pas totalement clair, ils pourraient favoriser l'élimination de l'infection mais aussi avoir un rôle immunopathogène (*Mongkolsapaya J et al.; An J et al. 2004*). Le rôle des LT régulateurs dans la dengue reste également peu clair pour le moment mais une étude a suggéré leur expansion et fonctionnalité en phase aiguë de l'infection (*Luhn K et al. 2007*).

Suite à une infection primaire, des cellules T mémoires spécifiques du sérotype responsable de l'infection et qui cross-réactifs avec les autres sérotypes sont générées. Lors d'une infection secondaire, les LT protecteurs et cross-réactifs sont activés mais les LT mémoires non protecteurs vont amplifier l'infection (*Kurane I et al. 1990*). Ainsi la mémoire de l'infection primaire altère la réponse immune de l'infection secondaire avec des implications cliniques. Plusieurs travaux ont en effet montré une corrélation entre le niveau de réponse T et la sévérité de la maladie (*Zivna I et al. 2002; Mongkolsapaya J et al. 2003*). Ce phénomène nommé signature antigénique originel est l'effet d'une balance entre une issue protectrice et pathologique de l'infection (*Mangada MM et al. 2005*) (**Figure 17**).

- **La réponse humorale**

La réponse humorale semble être vitale pour contrôler l'infection et la dissémination du DENV. L'infection par un sérotype de DENV induit une protection de longue durée contre ce sérotype. Néanmoins, une infection subséquente par un autre sérotype résulte en une protection de courte durée et peut augmenter le degré de sévérité de la maladie (*Thein S et al. 1997; Recker M et al. 2009; Guzman MG et al. 2002; Burke DS et al. 1988*). De nombreux facteurs influençant le phénomène d'augmentation de l'infection par les anticorps (ADE) ont été décrits *in vitro* (*Halstead SB et al. 2003*). Les récepteurs

Fc $\gamma$  présents en surface de nombreuses cellules semblent jouer un rôle majeur. La fixation des complexes virus-anticorps au récepteur Fc $\gamma$  augmente l'efficacité de l'attachement du virus à son récepteur cellulaire et donc le nombre de cellules infectées. Ce phénomène susciterait *in vivo* l'augmentation de la charge virale, la destruction des cellules immunitaires possédant le récepteur Fc, le raccourcissement de la période d'incubation et l'augmentation de la sévérité de la maladie.



**Figure 17. Réponses de l'hôte suite à l'infection par le virus de la Dengue.** Le moustique infecté relargue des particules virales au niveau de la peau. Ces particules virales peuvent infecter les cellules présentes localement et principalement les cellules dendritiques. Les cellules résidentes telles que les mastocytes sont aussi activées. La réponse inflammatoire locale induit le recrutement de leucocytes, dont les cellules NK et les lymphocytes T qui participent à l'élimination des cellules infectées par le virus. Le DENV peut être disséminé au niveau des ganglions lymphatiques établissant une infection systémique. Cette réponse inflammatoire locale se déroule avant l'apparition de signes cliniques sévères.

### 3.6. Modèles animaux

#### 3.6.1. Expérimentation chez la souris

- **Chikungunya**

Le modèle récemment décrit par Gardner *et al.* montre que les souris C57BL/6 adultes (six semaines) sont susceptibles au CHIKV (Gardner *et al.* 2010) Chez la souris nouveau-née et de moins de 14 jours, l'injection sous-cutanée entraîne un tableau de léthargie avec difficulté à la marche, faiblesse des pattes arrière et perte de poids (Ziegler SA *et al.* 2008). Comme chez l'homme, des virémies élevées sont observées, de l'ordre de  $10^6$  à  $10^8$  PFU (*Particle Forming Unit*) /ml de sang. L'inflammation par la souche réunionnaise de CHIKV est plus importante que celle obtenue avec la souche asiatique avec des virémies identiques (Gardner *et al.* 2010). La sévérité est généralement corrélée à l'importance de la virémie et à la dissémination au SNC (Couderc *et al.* 2008). Le modèle C57BL/6 a permis de nombreuses avancées en ce qui concerne les manifestations arthralgiques du CHIKV mais l'efficacité et la protection ont encore besoin d'être explorées dans des modèles de souris qui reproduisent les symptômes aigus de l'infection, et notamment la réplication virale initiale. De plus, les modèles souris ne sont pas les plus efficaces pour étudier l'efficacité d'un vaccin (Ziegler SA, 2008).

- **Dengue**

Les souris sont peu susceptibles à l'infection par la dengue et ne sont donc pas un bon modèle d'étude. De nouveaux modèles de souris ont été développés afin de rendre les souris plus susceptibles mais aucune n'est capable de reproduire les réponses immunes anti-DENV. Les différentes approches sont : les modèles de souris immunocompétentes, des modèles de souris avec un syndrome SCID (*Severe combined immunodeficient*), des modèles de souris humanisées et enfin des modèles de souris déficientes en interférons. Ces différents modèles ont néanmoins contribué à comprendre certains mécanismes de la pathogénèse DEN (Mota J *et al.* 2011).

### 3.6.2. Expérimentation chez les primates non humains

- **Chikungunya**

Plus proches et plus représentatifs de la maladie humaine, les primates sont sensibles à l'infection par le CHIKV (*Binn et al. Harrison 1967; Paul et al. 1968*). Ces travaux ont permis d'étudier la transmission et la physiopathologie du CHIKV mais aussi de tester des molécules à visée thérapeutique ainsi que des vaccins (*Harrison et al. 1967, Edelmann et al. 2000*).

Récemment, Labadie *et al.* ont développé un modèle de macaques (*Macaca fascicularis*) infectés par une souche réunionnaise de CHIKV, qui a permis de préciser les caractéristiques virales, cliniques et pathologiques de la maladie (*Labadie et al. 2010*). Ainsi, comme chez l'homme, une virémie pouvant dépasser  $10^{10}$  copies /ml a été observée, avec une négativation au bout de 10 jours, témoignant d'une réponse immunitaire efficiente. Sur le plan clinique, on retrouve une fièvre supérieure à 39°C à J1-J2, un rash morbilliforme une semaine après l'inoculation ainsi que des atteintes muqueuses comme les gingivorragies. Les autres atteintes telles que les arthralgies, céphalées ou myalgies sont difficiles à évaluer chez l'animal. Au pic de la virémie, tous les animaux présentaient une monocytopénie, une lymphopénie, une thrombopénie et une granulocytose. L'importance de la virémie et l'intensité des signes cliniques s'avèrent clairement dépendantes de la dose d'inoculation. Ce modèle a également permis de mettre en évidence l'importance des macrophages dans la physiopathologie du CHIKV. Les macrophages semblent en effet être des acteurs clés dans la nécrose musculaire et un réservoir possible pour la persistance du virus.

- **Dengue**

Les modèles primates non humains ne développent pas de dengue hémorragique mais seulement des infections peu sévères. L'induction d'une infection type dengue a longtemps échoué dans d'autres modèles animaux et les primates non humains ont donc pendant longtemps été le seul modèle animal valable. Ces modèles ne permettent pas vraiment d'explorer les mécanismes moléculaires de la pathogénèse DENV mais ils ont été beaucoup utilisés pour les tests vaccinaux car ils sont capables de développer des anticorps neutralisants en réponse à l'infection (*Weaver KA et al. 2010*).



**- OBJECTIFS -**

Pendant longtemps le Chikungunya et la Dengue étaient restreints géographiquement aux pays en voie de développement et sont donc restées très peu étudiées. Depuis la flambée épidémique qui a touché l'île de la Réunion en 2005, et l'apparition des virus dans certains pays d'Europe, ces maladies font de plus en plus l'objet de recherches. Les études menées jusqu'à présent suggèrent un rôle clé de l'immunité innée dans le contrôle de ces infections. Elles décrivent un rôle particulièrement important de l'IFN- $\alpha$  et d'autres cytokines pro-inflammatoires au cours de la phase aiguë. Des travaux préliminaires ont également mis en évidence l'activation des cellules NK chez des patients infectés par le CHIKV ou le DENV, mais aucun n'indique clairement le rôle de ces cellules dans le développement de la pathogénèse ou dans le contrôle de l'infection. En plus de leurs fonctions cytotoxiques directes et indirectes, les cellules NK possèdent des fonctions immunorégulatrices qui influent sur les réponses adaptatives et représentent donc un élément clé des réponses immunitaires précoces. L'objectif de mes travaux de thèse a été de caractériser la réponse des cellules NK au cours des infections par le CHIKV et DENV-2 et d'en étudier les mécanismes.

Le Gabon a récemment connu de nouvelles émergences virales et pour la première fois en 2007, une épidémie simultanée de Chikungunya et Dengue (sérotype 2) a touché la capitale, Libreville. Pour la première fois, des cas de coinfections sont alors observés en Afrique. En 2010, une deuxième large épidémie de CHIKV et DENV-2 a lieu au Gabon, à Franceville, avec un nombre croissant de patients coinfectés répertoriés. L'emplacement du Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF) et sa capacité à prendre en charge rapidement les épidémies a rendu possible l'accès à de nombreux échantillons en phase aiguë et en phase de convalescence de patients infectés par le CHIKV, DENV-2 ou coinfectés par ces deux virus.

Le premier projet a eu pour objectif de caractériser les cellules NK au cours de ces deux infections. Il a été mené à partir des prélèvements des deux épidémies qui ont lieu successivement au Gabon. Les prélèvements de patients infectés par le CHIKV obtenus au cours de l'épidémie de 2007 nous ont permis de mener une large étude phénotypique et fonctionnelle des cellules NK au cours de l'infection par le CHIKV et de mettre en évidence l'expansion d'une population « clonale » NK spécifique.

Les échantillons de l'épidémie de 2010 nous ont permis de mener une étude longitudinale des cellules NK en comparant des échantillons provenant de patients infectés par le CHIKV, DENV-2 ou coinfectés par ces deux virus. De plus, au cours de ce travail, nous avons également caractérisé la réponse des lymphocytes T.

Dans le deuxième projet, nous nous sommes intéressés à la signature génétique des cellules NK au cours de ces deux infections. En effet, différents travaux ont montré que l'interaction entre les récepteurs KIRs présents sur les cellules NK avec leurs ligands, certaines molécules du HLA de classe-I, peut influencer sur la susceptibilité ou la résistance aux infections. L'objectif de cette étude a également été d'établir un lien éventuel avec les données phénotypiques obtenues lors des études menées dans le cadre du projet 1.

Les cellules NK n'agissent pas seules mais en interaction avec d'autres populations cellulaires, dont les DCs. Ainsi, l'objectif de ce troisième projet était d'étudier le dialogue entre les cellules NK et les DCs au cours de l'infection par le DENV-2, les DCs étant une cible privilégiée du DENV. Afin d'étudier le rôle de ces interactions au cours de l'infection par le DENV-2, nous avons développé un modèle *in vitro* d'infection de DCs par le DENV-2. A partir de ce modèle, nous avons dans un premier temps caractérisé les modifications phénotypiques et identifié les ligands des récepteurs NK modulés après infection. Nous avons ensuite étudié les modifications fonctionnelles des cellules NK co-cultivées en présence de DCs infectées afin d'étudier le rôle des interactions cellulaires au cours de l'infection.

Le quatrième projet avait pour but d'étudier les mécanismes sous-jacents aux coinfections CHIKV/DENV-2. L'étude virologique des patients coinfectés au cours de l'épidémie de 2010 a soulevé la question d'une éventuelle compétition au niveau de la réplication virale entre ces deux virus. Pour répondre à cette question, nous avons développé un modèle expérimental de coinfection CHIKV/DENV-2 chez le macaque Rhésus. L'analyse des échantillons étant en cours, seules des données préliminaires seront présentées dans ce manuscrit.

L'ensemble de ces travaux avait pour objectif d'apporter des éléments de réponses quant à l'implication des cellules NK au cours des infections par le CHIKV et DENV-2. La collaboration et les moyens mis en œuvre entre les différentes équipes impliquées dans ces projets a permis une approche complète avec des études *ex vivo* à partir des prélèvements de patients, *in vitro* par un modèle de co-culture et *in vivo* par la mise en place d'un modèle macaque pour l'étude des coinfections. Au delà d'une meilleure compréhension de la physiopathologie de ces deux infections virales, ces résultats ont également contribué à apporter des connaissances supplémentaires sur le fonctionnement des cellules NK au cours des infections.

## **- RESULTATS -**

**PROJET 1A :** Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules NK chez des patients infectés par le CHIKV au cours de l'épidémie de 2007 à Libreville, Gabon.

**Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity**

*Caroline Petitdemange, Pierre Becquart, Nadia Wauquier, Vivien Béziat, Patrice Debré, Eric Leroy, Vincent Vieillard.*

Les études menées chez l'homme et dans des modèles animaux ont montré que le CHIKV est éliminé rapidement, avant même la production d'IgG ou la mise en place d'une réponse T. Ceci suggère le rôle important joué par la réponse immune innée dans l'élimination de ce virus. Suite à l'infection, les IFN-I sont détectés très rapidement et à des niveaux élevés dans le sérum des individus, avec des concentrations qui sont corrélées avec la charge virale. En plus des IFN-I et des cytokines pro-inflammatoires, les cellules NK représentent une composante majeure de la réponse innée antivirale. Seule une augmentation de la proportion et de l'état d'activation des cellules NK au cours de l'infection par le CHIKV avait été décrite avant la réalisation de notre étude. De plus les cellules NK ont également été très peu caractérisées au cours d'infection par les autres alphavirus.

Le but de cette étude était de réaliser une analyse phénotypique et fonctionnelle détaillée des cellules NK en phase aigue afin de pouvoir caractériser le rôle de ces cellules au cours de l'infection par le CHIKV. Pour cela, une cohorte de 25 patients gabonais, infectés au cours de l'épidémie de 2007 à Libreville, a été analysée en comparaison à 15 individus gabonais ou 15 individus caucasiens non infectés. L'état d'activation et l'expression d'un ensemble de récepteurs NK ont été analysés par cytométrie de flux. Les capacités cytotoxiques des cellules NK ont également été évaluées à l'aide d'un test de polyfonction mesurant la dégranulation et la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK. Enfin, l'analyse génétique des récepteurs KIRs et des molécules HLA de quelques patients a permis d'établir des corrélations entre les données génétiques et les données phénotypiques obtenues.

Ces travaux ont mis en évidence une modulation du répertoire des cellules NK par le CHIKV. Les résultats mettent en avant l'expansion d'une population de cellules NK co-exprimant NKG2C et certains KIR spécifiques des allèles HLA-C1, et ce en corrélation avec la charge virale. Les caractéristiques phénotypiques particulières observées sont associées à des modifications importantes de l'état d'activation et de différenciation des cellules NK ainsi qu'à l'augmentation de leurs fonctions cytolytiques et à la diminution de produire de l'IFN- $\gamma$ . L'ensemble de ces résultats suggère donc que les cellules NK réagissent précocement et fortement à l'infection par le CHIKV, participant ainsi à l'élimination du virus.

# Unconventional Repertoire Profile Is Imprinted during Acute Chikungunya Infection for Natural Killer Cells Polarization toward Cytotoxicity

Caroline Petitdemange<sup>1,2,3</sup>, Pierre Becquart<sup>3,4,5</sup>, Nadia Wauquier<sup>1,2,3,5</sup>, Vivien Béziat<sup>1,2</sup>, Patrice Debré<sup>1,2</sup>, Eric M. Leroy<sup>3,4</sup>, Vincent Vieillard<sup>1,2\*</sup>

**1**INSERM UMR-S 945, Immunité et Infection, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France, **2**Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, **3**Unité des Maladies Virales Emergentes, Centre International de Recherches Médicales de Franceville, Franceville, Gabon, **4**UMR 224 IRD/CNRS/UM1, Montpellier, France

## Abstract

Chikungunya virus (CHIKV) is a worldwide emerging pathogen. In humans it causes a syndrome characterized by high fever, polyarthritides, and in some cases lethal encephalitis. Growing evidence indicates that the innate immune response plays a role in controlling CHIKV infection. We show here that CHIKV induces major but transient modifications in NK-cell phenotype and function soon after the onset of acute infection. We report a transient clonal expansion of NK cells that coexpress CD94/NKG2C and inhibitory receptors for HLA-C1 alleles and are correlated with the viral load. Functional tests reveal cytolytic capacity driven by NK cells in the absence of exogenous signals and severely impaired IFN- $\gamma$  production. Collectively these data provide insight into the role of this unique subset of NK cells in controlling CHIKV infection by subset-specific expansion in response to acute infection, followed by a contraction phase after viral clearance.

**Citation:** Petitdemange C, Becquart P, Wauquier N, Béziat V, Debré P, et al. (2011) Unconventional Repertoire Profile Is Imprinted during Acute Chikungunya Infection for Natural Killer Cells Polarization toward Cytotoxicity. *PLoS Pathog* 7(9): e1002268. doi:10.1371/journal.ppat.1002268

**Editor:** Wayne M. Yokoyama, Washington University School of Medicine, United States of America

**Received:** March 21, 2011; **Accepted:** July 27, 2011; **Published:** September 22, 2011

**Copyright:** © 2011 Petitdemange et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported in part by the Agence National pour la Recherche (ANR, appel MIME 2006, n°ANR-06-MIME-022-01), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and the Université Pierre et Marie Curie, Paris, France. The CIRMF is supported by the government of Gabon, Total-Fina-Elf Gabon, and the Ministère des Affaires Étrangères, France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: vincent.vieillard@upmc.fr

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Emerging and re-emerging viral infectious diseases can cause devastating illnesses in humans and are accordingly one of the principal challenges in global health care today. Among these viruses, arthropod-borne arboviruses are especially important because many of them cause fatal diseases in humans and animals [1,2]. Chikungunya virus (CHIKV) is an *Aedes* mosquito-borne alphavirus from the *Togaviridae* family. Typically, a silent incubation period of 2–4 days usually follows infection by CHIKV, and symptoms arise afterwards. CHIKV-associated disease is an acute illness characterized by fever, skin rash, and severe incapacitating arthralgia [2–4]. Most clinical symptoms of CHIKV infection generally resolve within a few weeks, except for joint stiffness and pain, the hallmark of chronic CHIKV infection, which can persist for months or years. Intriguingly, CHIKV, which has historically been transmitted by *Aedes aegypti* mosquitoes, has repeatedly been associated in recent years with a new vector, *Aedes albopictus*, which has spread into tropical areas and dispersed worldwide [5]. CHIKV has been identified in nearly 40 countries and is currently present in Asia, the United States, Central Africa and Europe; the US National Institute of Allergy and Infectious Disease (NIAID) listed it as a category C priority pathogen in 2008 [2,6,7]. These recent outbreaks have resulted in more detailed descriptions of its clinical manifestations, including complications

such as maternal-fetal transmission and fatal hemorrhagic and neurologic manifestations [8,9].

Although much is known about this disease, the study of immune response to CHIKV infection is in its infancy. Reports in humans and in a macaque model show that virus elimination occurs very rapidly, before the host can mount IgG and T cell responses and thus suggest an effective innate immune response. Type-1 interferon (IFN) has been detected at high levels in the serum of infected individuals, its concentration correlated with viral load [10–14]. Natural killer (NK) cells are also an important mediator of the innate immune defense during early infectious events. NK cells mediate their antiviral effects through at least three different mechanisms: (1) the release of immunoregulatory cytokines, particularly IFN- $\gamma$ , which enhance the innate immune response and help to shape the subsequent adaptive immune response, (2) the production of cytolytic granules for lysis of infected cells, and (3) the induction of target-cell death through cell surface receptors [15,16].

The variety of signaling pathways to stimulate NK cells equips these cells with multiple detection systems for sensing and responding to infection and thus makes it more difficult for viruses to escape detection and defense. NK-cell function is controlled by the integration of signals from various activating and inhibitory cell surface receptors [17–19]. Its direct cytolytic activity is associated with downregulation of major histocompatibility

### Author Summary

Chikungunya virus (CHIKV) infection, which is responsible for devastating human illness, is rapidly becoming a global concern. The spread of this disease throughout tropical areas, where it now affects nearly 40 countries, underlines the need to improve our understanding of this infection. In 2008, CHIKV was listed as a US National Institute of Allergy and Infectious Disease (NIAID) category C priority pathogen. Natural killer (NK) cells are cytotoxic effector cells that play a vital role in the innate immune system by limiting acute infection, as previously described for several other diseases. This report describes the first phenotypic and functional analysis of NK cells soon after infection by this virus. The key element of this study was the detailed analysis of the expansion of NK cells. Coexpression of NKG2C activating receptors and HLA-C1 ligands is associated with viral load, impaired IFN- $\gamma$  production, and significant cytolytic functions. We found that NK cells were able to sense CHIKV from the beginning of infection and contributed to the clearance of the infected cells through the expansion of a unique NK-cell subset.

complex (MHC) class I molecules. Different types of NK-inhibitory receptors have been identified, including the killer cell immunoglobulin (Ig)-like receptor (KIR) family, CD94/NK2A, and ILT-2. These inhibitory receptors recognize self-molecules constitutively expressed on host cells. NK cells, however, are only activated when activating receptors, including NKG2C, NKG2D, DNAM-1, and the natural cytotoxicity receptors (NKP30, NKP44 and NKP46), are triggered on NK cells at the same time that inhibitory receptors engage. NK functions are therefore finely tuned by crosstalk between the expression of activating and inhibitory receptors, and NK cells serve as important sentinels of the immune system, working as first responders and alerting the host of the presence of infectious organisms [18,19].

Different studies have demonstrated the importance of NK cells in controlling human viral infections, such as EBV, CMV, and HSV [20]. Nonetheless, the involvement of these cells in response to alphaviruses has not been characterized either thoroughly or consistently. For example, the *in vitro* culture of Ross River virus was reported to result in enhanced rather than depressed NK cell activity [21]. More recently, Alsharifi *et al.* [22] demonstrated that NK cells without marked cytotoxic T cell involvement control the acute virulent Semliki Forest virus infection of the central nervous system in C57BL/6J mice. The frequency and activation rate of NK cells increase during acute CHIKV infection [23]. In another arboviral infection, Azeredo *et al.* [24] observed that most NK cells from dengue-infected patients display early activation markers and cell adhesion molecules during the acute phase of the disease. More recently, Hershkovitz *et al.* [25] showed that interaction of the NKP44 activating NK receptor with the flavivirus envelope protein mediates the triggering of NK cells in both West Nile and dengue viruses. Intriguingly, several flaviviruses may attenuate NK cell cytotoxicity by increasing cell surface expression of MHC class-I molecules to overcome susceptibility to NK cell mediated lysis [26,27].

The aim of this study was to conduct a detailed phenotypic and functional analysis of NK cells during acute infection by this emerging disease, to characterize the role of NK cells during CHIKV infection. Our data, collected at a very early point post-infection, showed engagement of a clonal expansion of CD94/NKG2C<sup>+</sup> NK cells that expressed receptors for HLA-C1 alleles. We describe their functional features.

### Results

#### Changes in the proportion and activation status of different lymphocytic subsets from CHIKV-infected patients

Flow cytometry was used to assess the frequency of CD3<sup>+</sup> T and CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK subsets in CHIKV-infected patients as well as in healthy Caucasian and Gabonese individuals. These lymphocyte subsets were found at similar frequencies in both healthy control groups, regardless of their origin. In contrast, and consistently with previous studies [14,23], the percentage of CD3<sup>+</sup> T cells was significantly lower in CHIKV-infected patients ( $p < 0.0001$ ) than in controls (Figure 1A). Infection-associated profound T lymphopenia tended to spare CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells, and the proportions of these cells increased significantly after CHIKV infection, to  $13.0 \pm 3.9\%$  compared with  $8.4 \pm 4.3\%$  in healthy Gabonese controls ( $p = 0.0006$ ) (Figure 1A). The increase in NK-cell frequency was directly correlated with viral load ( $r = 0.7337$ ;  $p = 0.0005$ ) (Figure 1B). However, the absolute count of NK cells from the Caucasian CHIKV-infected patients ( $233 \pm 48$  per  $\text{mm}^3$ ) was similar to that among the healthy Caucasian controls ( $275 \pm 66$  per  $\text{mm}^3$ ). In contrast, the CD3<sup>+</sup> T cell count was sharply lower in CHIKV-infected patients than in controls (Supplementary Table S1). These data are in line with a previous published study [23]. Of note, the modulation of frequencies of both CD3<sup>+</sup> T and CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells was transient and rapidly returned to baseline levels after a two month-period (Figure 1C).

NK cells can be divided into CD56<sup>bright</sup> and CD56<sup>dim</sup> populations, based on the cell-surface density of the CD56 molecules; these subgroups present distinct phenotypic and functional properties [28]. Intriguingly, the percentage of CD56<sup>bright</sup> NK cells was very significantly lower in CHIKV-infected patients than in healthy controls ( $p < 0.0001$ ) (Figure 1D), a finding that supports the hypothesis of profound upheavals of the NK cell subset after CHIKV infection.

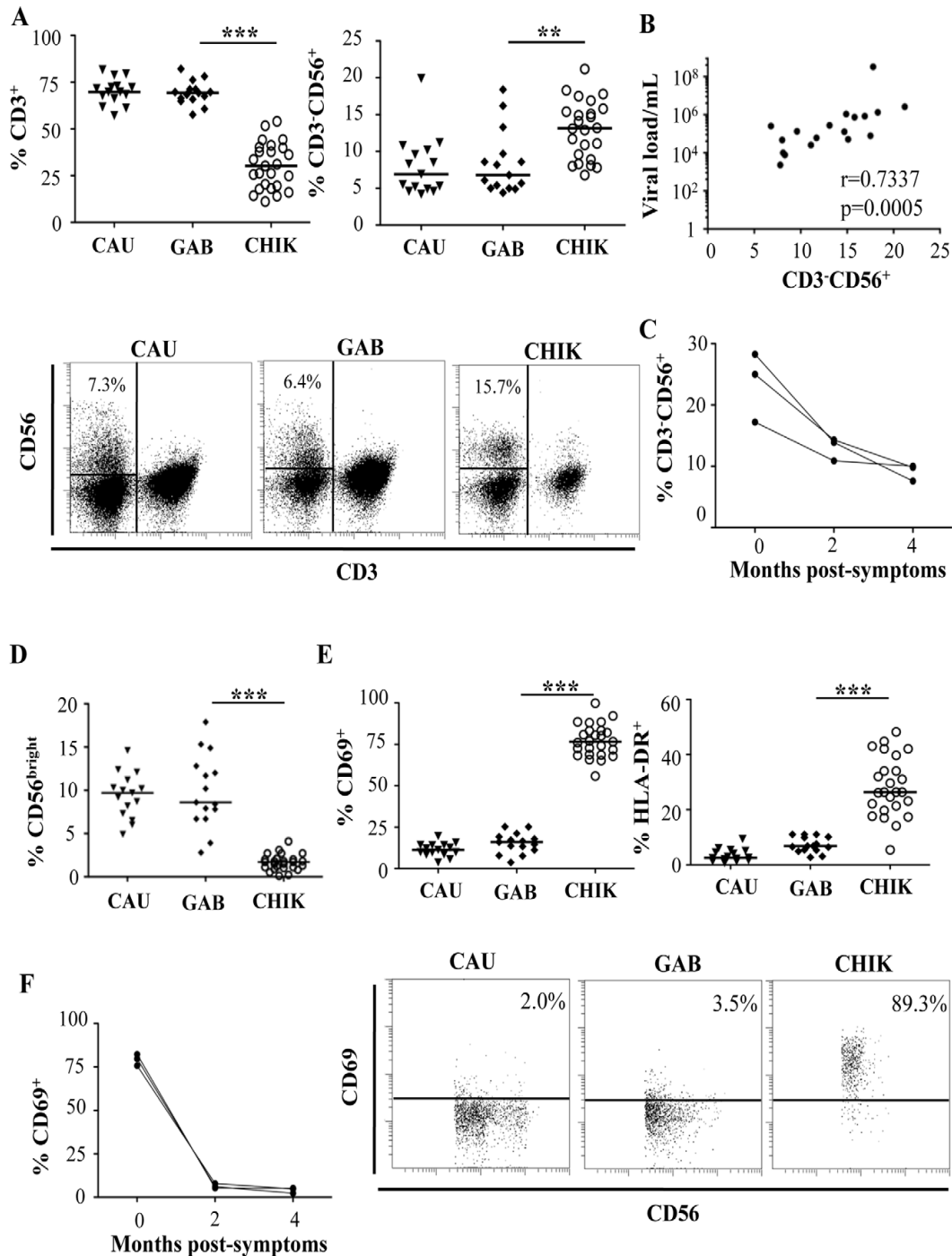
The percentage of activated NK cells was also assessed by flow cytometric determination of the early activation marker CD69. As shown in Figure 1E, the NK cells from CHIKV-infected patients were activated;  $77.2 \pm 9.9\%$  of the NK cells expressed CD69 vs  $15.4 \pm 6.2\%$  in healthy donors ( $p < 0.0001$ ). Similar results were observed with HLA-DR, another activation marker (Figure 1E). Furthermore, within two months, the rate of NK cell activation reverted back to that of healthy donors (Figure 1F), in association with viral clearance (Supplementary Table S1).

#### Major phenotypic features of NK cells from CHIKV-infected patients

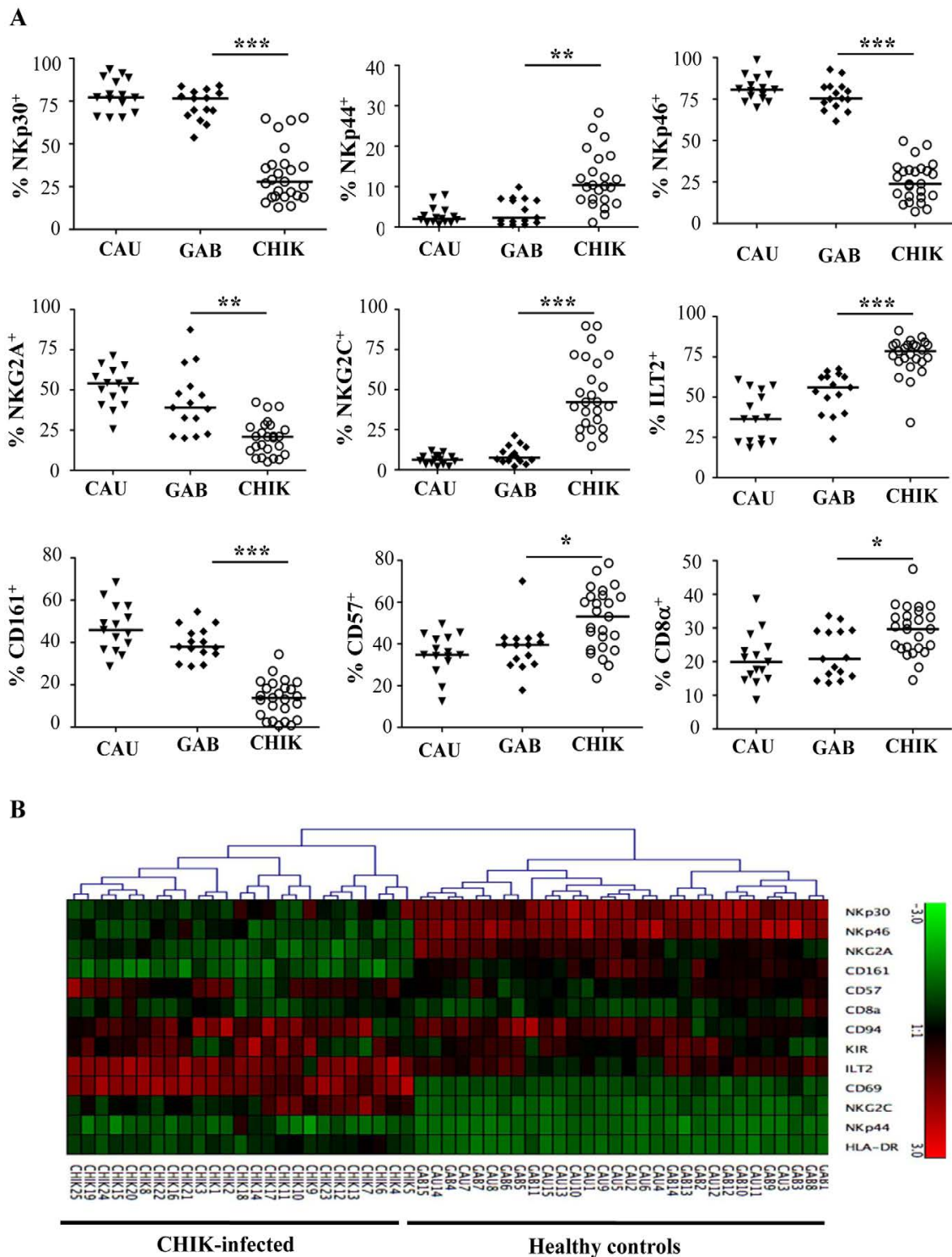
To explore whether CHIKV infection was associated with the pattern of natural killer receptor (NKR) expression, flow cytometric analysis was performed with anti-CD3 and anti-CD56 mAbs, in combination with a panel of reagents for NKR. CHIKV-infected and healthy individuals did not differ significantly in their proportions of NK cells bearing NKG2D, 2B4, LAIR-1, and DNAM-1 (data not shown). In contrast, both the frequency of fluorescence intensity and mean fluorescence intensity (MFI) of NKP30 and NKP46, two specific natural cytotoxic receptors (NCR) constitutively expressed on virtually all NK cells, decreased significantly after CHIKV-infection (Figure 2A and Supplementary Figure S1). In contrast, NKP44, a marker usually expressed only upon activation, was upregulated in most infected patients, as were other CD69 and HLA-DR activation markers (Figures 1E and 2A). More importantly, the balance of inhibitory NKG2A to activating NKG2C cells switched during acute CHIKV infection. Thus, all infected patients showed a significant loss of both the frequency ( $p < 0.0001$ ) and MFI



Clonal Expansion of NK Cells in CHIKV Infection



**Figure 1. Distribution and activation status of NK cells from CHIKV-infected patients.** (A) FACS analysis of percentages of CD3<sup>+</sup> T cells and CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells from 15 Caucasian (CAU) and 15 Gabonese (GAB) healthy donors, and 25 CHIKV-infected patients (CHIK). Samples were gated on the lymphocyte gate for flow cytometric analysis. Horizontal bars represent the median values. Representative samples of each group are presented in the lower panels. Numbers are the percentage of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells in the CD45<sup>+</sup> lymphocyte gate. The region used to determine the proportion of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells is shown. (B) Correlation between viral load and frequency of NK cells from CHIKV-infected patients. (C) Longitudinal studies of the percentage of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells from 3 Caucasian CHIK-infected patients. (D) Frequency of CD56<sup>bright</sup> cells among the CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells. (E) Expression of the activation markers CD69 or HLA-DR on NK cells. Samples were gated on the CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK-cell subset for flow cytometric analysis. Horizontal bars indicate the median. Representative samples of each group are presented in the lower panels. Numbers are the percentage of CD69<sup>+</sup> cells in the CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK-cell gate. (F) Longitudinal study of the percentage of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells expressing CD69, from 3 CHIKV-infected Caucasian patients. \*\*: p<0.001; \*\*\*: p<0.0001. doi:10.1371/journal.ppat.1002268.g001



**Figure 2. Patterns of specific NK receptors on CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells from CHIKV-infected patients.** PBMC were collected from 15 Caucasian (CAU) and 15 Gabonese (GAB) healthy donors, and 25 CHIKV-infected patients (CHIK) to perform large-scale five-color flow cytometric analysis of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells. (A) Frequency of the expression of NK-cell receptors including: NCR (NKp30, NKp44 and NKp46), NKG2A and NKG2C, ILT-2, as well as CD161, CD57, and CD8α. Horizontal bars indicate the median. \*: p < 0.05; \*\*: p < 0.001; \*\*\*: p < 0.0001. (B) Hierarchical clustering of the

13 combinations of NK cell markers from healthy controls (Caucasian, CAU and Gabonese, GAB), and CHIKV-infected individuals (CHIK). Each horizontal line represents a particular NK-cell marker, and the color of each square reflects the percentage of cell-surface expression of the corresponding marker in each healthy or CHIKV-infected sample. Values measured for all samples were color displayed and rank ordered with the median for healthy donors considered the reference: green indicates below the median, and red indicates above the median, with values ranging from -3 and +3. Analysis was performed with the Genesis program (available at [www.genome.tugraz.at](http://www.genome.tugraz.at)). doi:10.1371/journal.ppat.1002268.g002

( $p=0.0005$ ) of NKG2A<sup>+</sup> NK cells, a loss corresponding to the dramatic expansion of NK cells expressing NKG2C activating receptors. The percentage of NKG2C<sup>+</sup> cells increased after CHIKV infection, to  $46.6\pm 22.3\%$  compared with  $9.3\pm 4.3\%$  in healthy Gabonese controls ( $p<0.0001$ ) (Figure 2A and Supplementary Figure S1A). Similarly, MFI of NKG2C increased significantly in CHIKV-infected patients, compared with controls (Supplementary Figure S1B). In addition, both the percentage and the MFI of NK cells expressing ILT-2, an inhibitory receptor that recognizes a broad range of classical MHC class-I molecules on surrounding cells, were higher in CHIKV-infected patients than controls. Specifically, around 77% of the NK cells from infected patients expressed ILT-2, compared with 53% of those from Gabonese and 38% from Caucasian healthy controls (Figure 2A and Supplementary Figure S1). This difference suggests an important expansion of a distinct population of activated NK cells that express NKG2C and ILT-2 but whose expression of NKG2A, NKp30 and NKp46 is skewed.

To address the specific characterization of the NKR repertoire from CHIKV-infected patients, hierarchical clustering analysis of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells was performed. In an important finding, it showed that CHIKV-infected patients were easily distinguished from both sets of healthy controls and expressed homogeneous patterns of cell-surface markers (Figure 2B). This analysis did not distinguish the Caucasian from the Gabonese healthy controls. In addition, Spearman rank correlation analyses tested viral load versus NKR expression, which was modulated on NK cells from CHIKV-infected patients. They showed that only the expression of NKG2A and NKG2C (both their frequency and MFI) was significantly correlated with viral load (Figure 3A and Supplementary Figure S2). It is noteworthy that kinetic studies of the three viremic Caucasian CHIKV-infected patients, during the first four months post-symptoms, demonstrated that the NKR modulation was transient. Figure 3B shows that the overexpression of ILT-2 and NKG2C and the down-modulation of NKG2A, NKp30 and NKp46 were transient in all patients tested; the levels of all of these NKRs returned nearly to baseline within two months after symptoms stopped. Other markers, such as NKG2D, were not modulated after infection and remained consistent over time (Figure 3B). As noted above, the modulation of certain NKRs on NK cells was closely linked to the viral load, which ranged from  $4.3\times 10^6$  to  $6.0\times 10^7$  copies/ml at the time of symptom onset and became undetectable in all patients within two months (Supplementary Table S1).

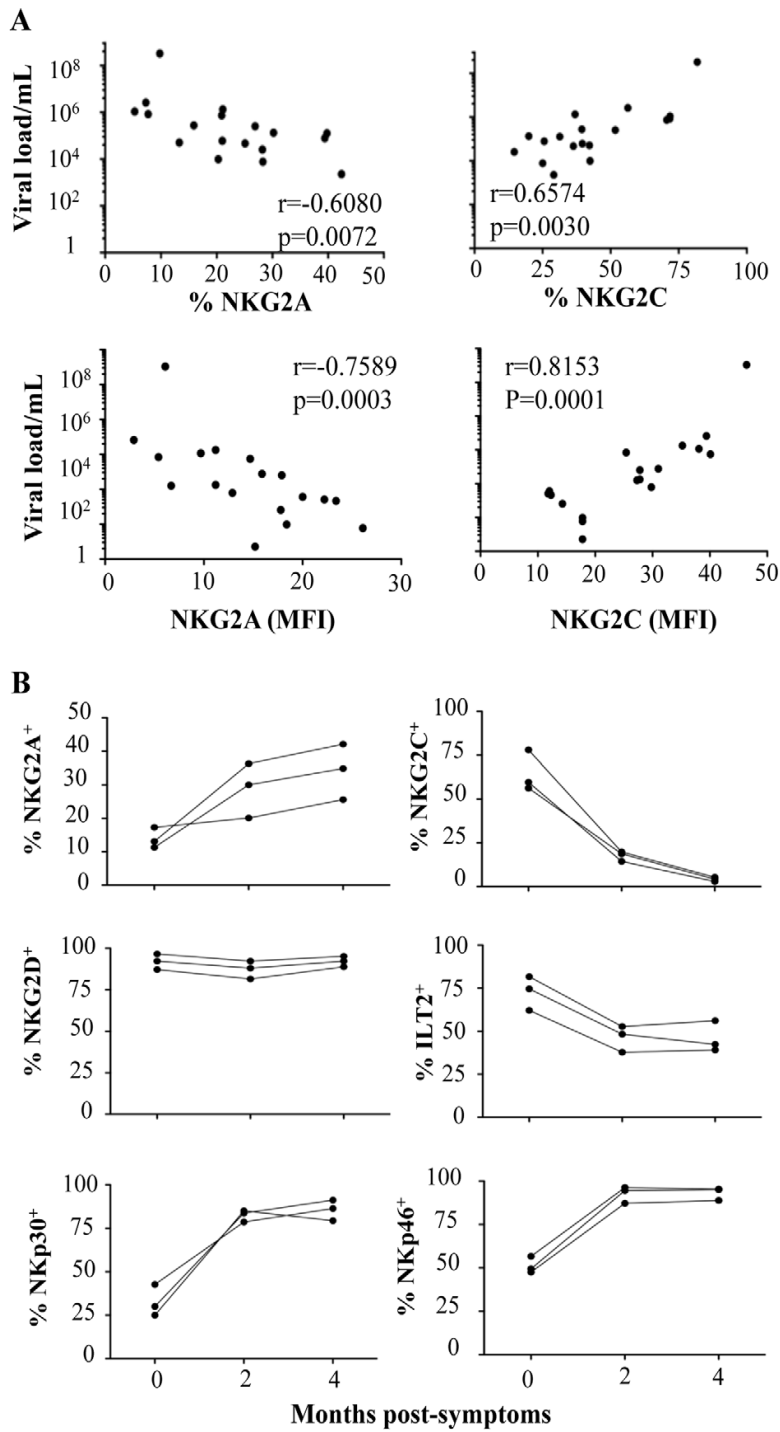
#### Preferential modulation of receptors for HLA-C1 alleles on NK cells from CHIKV-infected patients

As previously shown, KIRs are stochastically expressed on the surface of NK cells and are critical for monitoring alterations in MHC expression during viral infection, as shown in the KIR gene cluster in the NCBI dbLRC database (<http://www.ashi-hla.org/docs/pubs/abstracts/abs05/10.html>). While acute CHIKV infection is associated with a high frequency of NK cells (Figure 1A), as described [23], it is uncertain whether this expansion occurs specifically in KIR-expressing NK cells. We therefore assessed the overall change in KIR<sup>+</sup> NK cells with a pool of antibodies combining CD158a, CD158b, CD158c, and NKb1, and observed

a similar frequency in both CHIKV-infected and healthy individuals (data not shown). However, when KIR markers were split during single KIR analysis, CHIKV-infected and control individuals had significantly different levels of receptors for HLA-C alleles. These included KIR2DL1, specific for HLA-C2 alleles, and KIR2DL2/DL3, specific for HLA-C1 alleles. Profiles for both frequency and MFI of inhibitory ligands for HLA-C molecules were similar (Figure 4A and Supplementary Figure S3A). Thus, compared with healthy controls, NK cells from CHIKV<sup>+</sup> patients expressed significantly less KIR2DL1 ( $p=0.0027$ ) and significantly more KIR2DL2/DL3 ( $p=0.0008$ ) (Figure 4A). Thus, up to 76% of the NK cells in CHIKV-infected patients were stained with an anti-KIR2DL2/DL3 mAb. Importantly, KIR2DL1 expression in NK cells from CHIK-infected patients was significantly inversely correlated with their KIR2DL2/DL3 expression ( $p=0.0318$ ,  $r=-0.5201$ ) (Supplementary Figure S3B). We therefore conducted several analyses to identify the underlying factors that might account for these differences observed in KIR2DL1 and KIR2DL2/DL3 expression during acute CHIKV infection. Intriguingly, we observed significant correlations between these receptors for HLA-C alleles and NKG2C: KIR2DL1 expression was inversely correlated with NKG2C expression ( $r=-0.5398$ ,  $p=0.0053$ ), whereas KIR2DL2/DL3 expression was directly correlated with it ( $r=0.7514$ ,  $p<0.0001$ ) (Figure 4B). These findings were strengthened by significant correlations between the viral load and expressions of both KIR2DL1 ( $r=-0.2397$ ,  $p=0.0438$ ) and KIR2DL2/DL3 ( $r=0.7110$ ,  $p=0.0009$ ) (Figure 4C). Calculation of the MFI of inhibitory ligands for HLA-C molecules produced similar profiles (Figure 4C). Expression levels of other inhibitory KIRs (KIR1DL4, KIR2DL5, and KIR3DL1), and activating KIRs (KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS4, and KIR3DS1) were similar in all samples, irrespective of viral load (Supplementary Figure S3C and data not shown). Importantly, in the nine CHIKV-infected Gabonese patients who had supplemental examinations, HLA-C genotyping revealed that 8 of them were HLA-C1/C1 or HLA-C1/C2 (Table 1). Remarkably, the patients expressing the highest levels of KIR2DL2/DL3 on NK cells were those homozygous for HLA-C1/C1. Concomitantly, all of them expressed low levels of KIR2DL1, specifically recognized by HLA-C2 alleles, in relation to high viral load and NKG2C expression on NK cells (Table 1). It is important to note that Table 1 also shows that all Caucasian CHIKV-infected patients tested were HLA-C1/C1 or HLA-C1/C2, a genotype associated with high expression of NKG2C and KIR2DL2/DL3 and low expression of KIR2DL1.

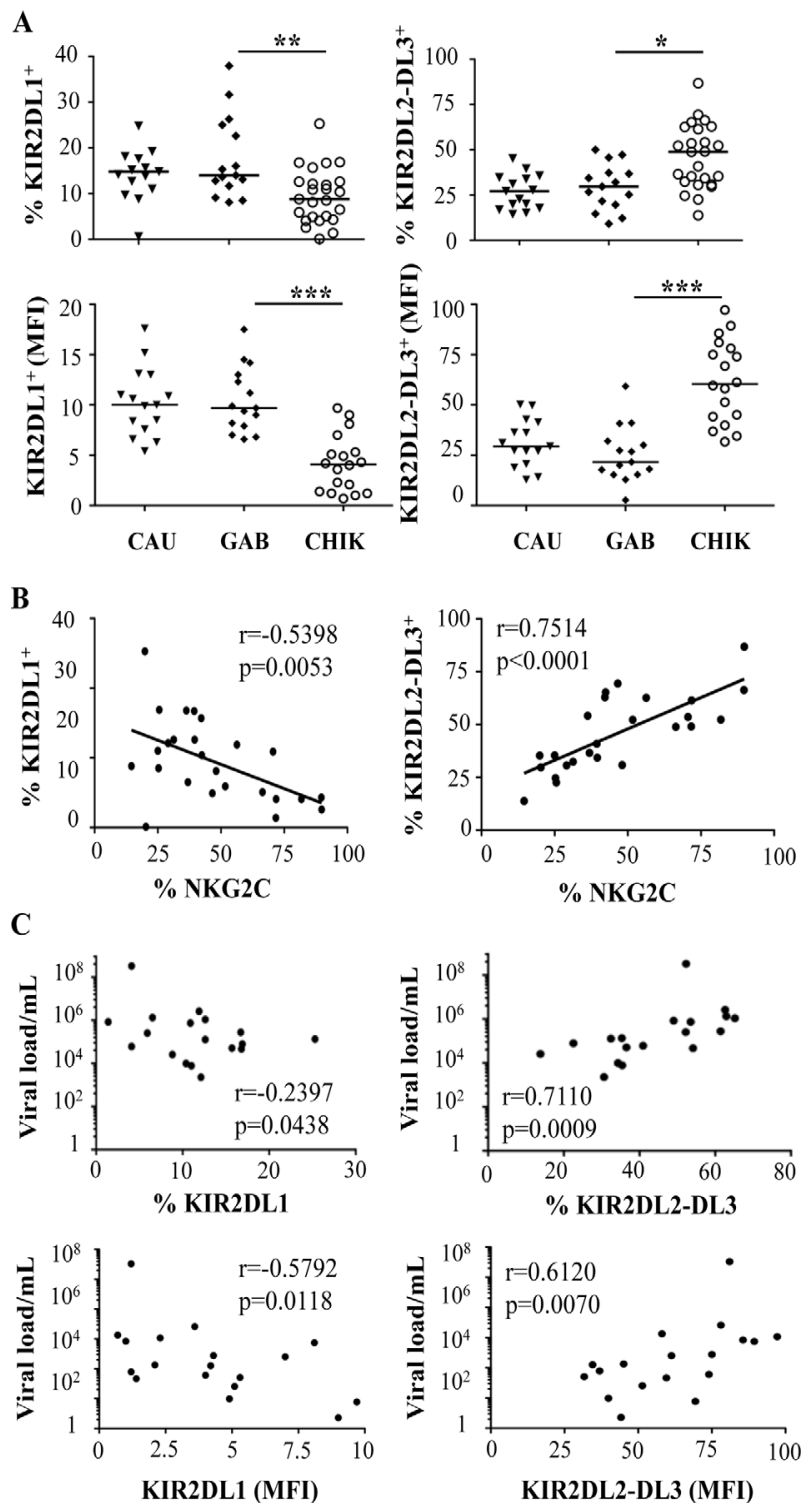
#### Effective cytotoxicity of NK cells from CHIKV-infected patients

To evaluate the functional capacities of NK cells from CHIKV-infected patients, non-activated and IL-2 activated PBMC were analyzed in a degranulation assay against K562, 721.221, and HLA-E-transfected 721.221 (AEH) target cells (Figure 5). In the absence of IL-2 activation, a minimal level of CD107a expression was detected at the surface of NK cells from healthy controls, regardless of the target cell line. In contrast, the degranulation capacity of NK cells from CHIKV-infected patients was strongly enhanced against HLA-class I negative K562 ( $p=0.0005$ ), and



**Figure 3. Correlation between viral load and NKR expression and kinetic expression of NKRs after CHIKV infection.** (A) Correlation between viral load and NKG2A or NKG2C, both in frequency and MFI, on CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells from CHIKV-infected patients. NS: not significant. (B) Three Caucasian CHIKV-infected patients were tested at 0, 2, and 4 months after symptom onset, to determine the frequency of various NKRs, including NKG2A, NKG2C, NKG2D, ILT-2, NKp30, and NKp46, on CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells. doi:10.1371/journal.ppat.1002268.g003





**Figure 4. Specific modulation of HLA-Cw ligands on CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells from CHIKV-infected patients.** PBMC were collected from 15 Caucasian (CAU) and 15 Gabonese (GAB) healthy donors, and 25 CHIKV-infected patients (CHIK). (A) Frequency and MFI of KIR2DL1 and KIR2DL2/DL3 on CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells. Horizontal bars indicate the median. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.001$ . (B) Correlation between expression of NKG2C and HLA-Cw ligands KIR2DL1 and KIR2DL2/DL3 on NK cells from the CHIKV-infected individuals. (C) Correlation between the viral load and KIR2DL1 or KIR2DL2/DL3 on CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells, both in frequency and MFI.  
doi:10.1371/journal.ppat.1002268.g004

**Table 1.** Association between viral load, expression of NKG2C and KIR2DL2/DL3, and HLA-C1 genotype in CHIKV-infected patients.

Samples (#)	Viral Load (copies/mL)	Phenotype (%)*			Genotype HLA-C	
		NKG2C	KIR2DL1	KIR2DL2/DL3	Alleles	Group
<b>Gabonese patients</b>						
1	7.8 E04	25.6	16.9	25.2	0701/0401	C2/C1
2	2.5 E04	14.6	11.5	13.8	1403/0702	C2/C2
3	1.3 E05	19.9	8.8	32.4	1601/0402	C2/C1
5	8.4 E05	71.7	1.4	49.0	1402/0304	C1/C2
6	7.7 E03	25.0	25.3	35.4	1201/1802	C2/C1
12	7.4 E05	70.6	10.9	53.5	0602/1703	C1/C1
13	2.6 E06	56.3	11.9	62.5	0602/0302	C1/C2
18	3.3 E08	81.8	4.1	52.3	0705/1701	C1/C1
20	1.1 E06	71.8	5.9	65.2	0401/0202	C1/C1
<b>Caucasian patients</b>						
1	2.3 E05	52.0	20.3	24.2	0101/0707	C1/C2
2	6.6 E06	55.7	14.8	37.3	0604/1301	C2/C1
3	5.1 E06	75.4	6.9	55.0	0302/0301	C1/C1

\*Cell-surface expression on CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells.  
doi:10.1371/journal.ppat.1002268.t001

721.221 ( $p = 0.0008$ ) target cells (Figures 5A and 5B). More importantly, in the presence of HLA-E<sup>+</sup> target cells, NK cells from CHIKV<sup>+</sup> patients displayed greater cytotoxic activity than did NK cells from healthy donors (Figure 5C). These results are in accordance with the high expression level of major activation markers, including CD69, HLA-DR and NKp44, but also with NKG2C, the receptor of HLA-E. The intracellular production of perforin and granzyme-B did not differ between CHIKV-infected and healthy individuals (data not shown). Following IL-2 activation, CD107a expression on NK cells from CHIKV<sup>+</sup> patients was similar to that in controls in the presence of K562 or 721.221 target cells. In contrast, in the presence of HLA-E<sup>+</sup> target cells, degranulation capacity was enhanced in NK cells from CHIKV<sup>+</sup> patients, compared with those from controls ( $p = 0.0414$ ) (Figures 5C and 5D). To confirm the key role of NKG2C in the lytic capacity of NK cells from CHIKV<sup>+</sup> samples, we repeated these experiments in the presence of neutralizing NKG2C mAb. The degranulation capacity of NK cells from five CHIKV<sup>+</sup> patients decreased strongly in the presence of anti-NKG2C, to less than 12.4±4.6%, compared with 44.6±5.4% in the presence of an IgG isotypic control (Figure 5E).

#### Downmodulation of intracellular IFN- $\gamma$ expression in NK cells from CHIKV-infected patients

In addition to their lytic activity, NK cells release several cytokines and chemokines that play a role in the recruitment and activation of the adaptive immune response [29]. The level of intracellular IFN- $\gamma$  after treatment with IL-12 and IL-18 was significantly lower in CHIKV<sup>+</sup> NK cells ( $p < 0.0001$ ) than among the healthy controls, regardless of their geographic origin or race (Figures 6A and 6B). These data are closely associated with the inverse correlation between the production of IFN- $\gamma$  in the serum of CHIKV-infected patients and the level of NKG2C expression on NK cells ( $r = -0.8000$ ;  $p = 0.0002$ ) (Figure 6C).

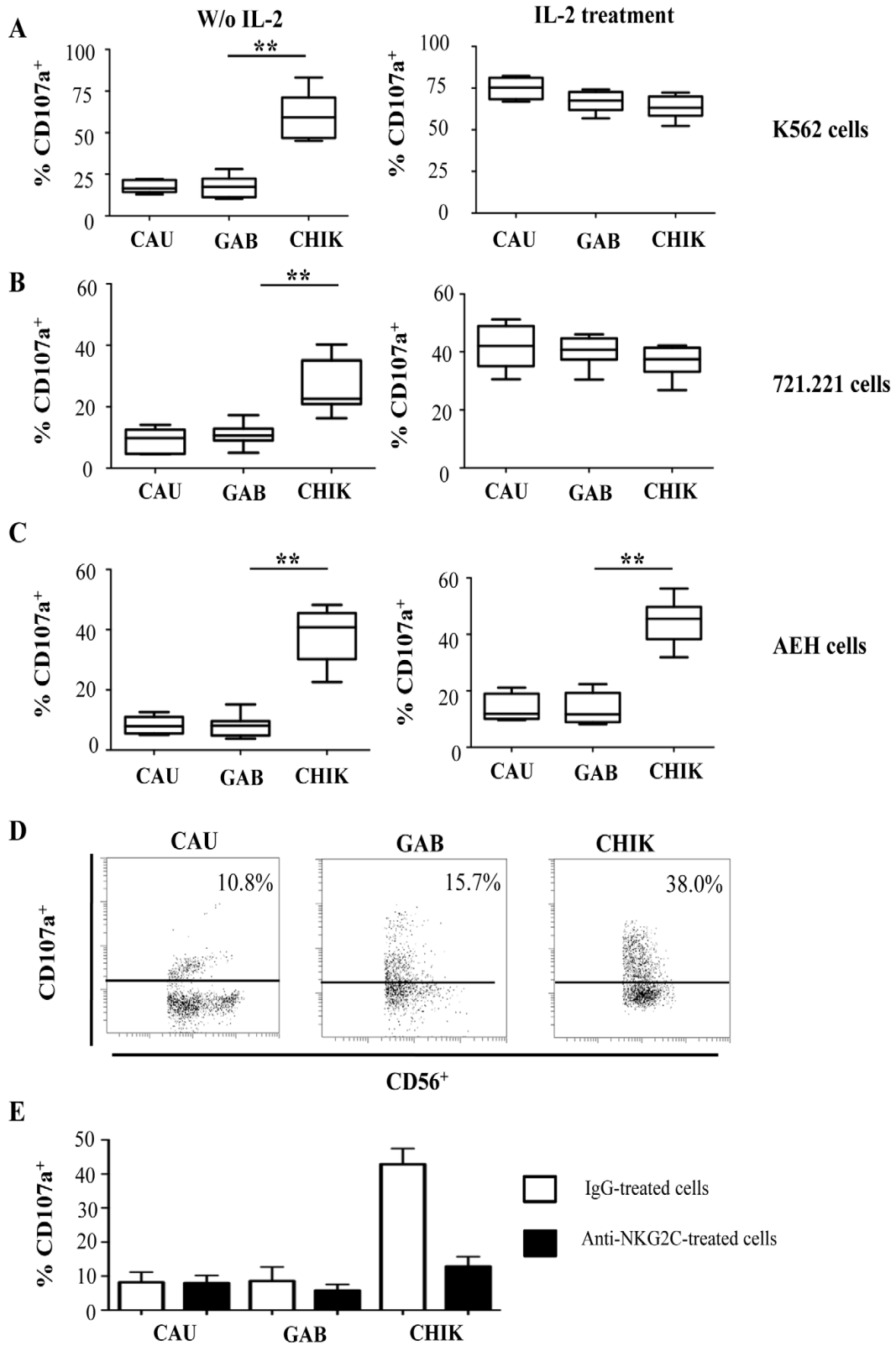
In summary, these results provide strong support for the hypothesis that the expansion of NKG2C<sup>+</sup> NK cells from CHIKV-infected individuals is associated with a dichotomy

between cytolytic and immunoregulatory functions in NK cells during acute infection.

#### Discussion

This paper describes an extensive phenotypic and functional study of NK cells from CHIKV-infected individuals and provides the first evidence that CHIKV infection may selectively shape the NKR repertoire of healthy individuals. NK cells in patients shortly after CHIKV infection had significantly lower levels of NKp30 and NKp46, a reduction undoubtedly linked to their high expression of activation markers (CD69 and HLA-DR), as previously described after HCMV and HIV-1 infections [30–32]. A hierarchical clustering analysis of a large panel of phenotypic markers of the NK cell subset strengthened the evidence of NKR repertoire modulation, showing that CHIKV-infected patients, have phenotypes quite distinct from those of either Caucasian or Gabonese healthy donors. This modulation likely reflects the challenge exerted by CHIKV on the innate immune system and thus may become a useful indicator for exploring the complex host-pathogen relation during the acute phase of infection.

In this study, we also demonstrated that CHIKV infection appears to impair the ability of NK cells to produce IFN- $\gamma$ , as previously reported during such viral infections as HIV-1 and viral hepatitis [30,33,34], particularly at the peak of viremia. This impairment may be linked to the modulation in these patients of the subset of cells that produce IFN- $\gamma$  most effectively — the CD56<sup>bright</sup> NK-cell subset. Experimental evidence indicates that NK-cell development proceeds from a CD56<sup>bright</sup> to CD56<sup>dim</sup> phenotype [35–37]. Several other changes in NKR expression reinforce this concept that NK cells mature following CHIKV infection. For example, expression of CD57, which has been recognized as a marker of replicative senescence of T lymphocytes, increases markedly on NK cells shortly after CHIKV infection. This marker is known to be absent from cord blood NK cells and found at higher levels in the elderly than in young or middle-aged





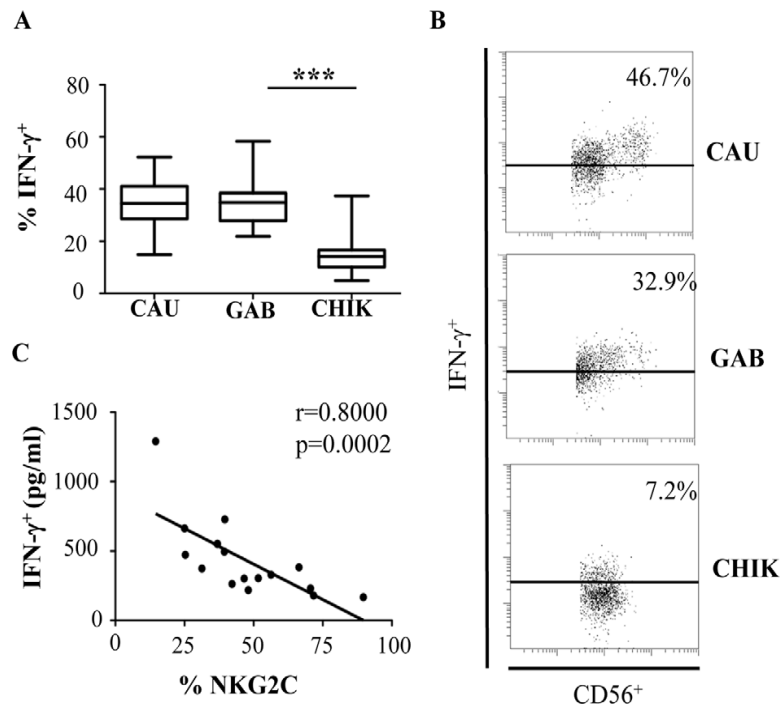
**Figure 5. Robust degranulation efficacy of NK cells from CHIKV-infected patients against HLA-E<sup>+</sup> target cells.** PBMC were collected from 10 Caucasian (CAU) and 10 Gabonese (GAB) healthy donors, and 10 CHIKV-infected patients (CHIK) to determine the cytolytic capacities of NK cells, before and after a two-day treatment with IL-2. Degranulation activity was determined by CD107a expression against K562 (A), 721.221 (B), or HLA-E-transfected 721.221 (AEH-cells) (C) target cells. Results are shown for an effector/target (E/T) cell ratio of 1/1. Horizontal bars indicate the median. \*\*, p<0.001. (D) Representative samples of each group were gated on the IL-2 activated CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK-cell subset in the presence of AEH HLA-E-expressing target cells. Numbers denote the percentage of CD107a<sup>+</sup> cells among the CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells. (E) Neutralization of the degranulation in the presence of anti-NKG2C mAb. PBMC from 5 healthy Caucasian (CAU) and 5 healthy Gabonese (GAB) donors, and 5 CHIKV-infected patients (CHIK) were tested in the presence of neutralizing anti-NKG2C mAb (closed bars) or IgG isotypic control (Open bars) against HLA-E-transfected 721.221. Results are expressed in mean±SD. doi:10.1371/journal.ppat.1002268.g005

subjects [38]. Consistent with these data, CHIKV infection completely shifted the NK-cell repertoire to create a specific subset of highly mature CD56<sup>dim</sup> NK cells mostly unresponsive to cytokine stimulation, but with strong cytolytic capacity for killing diseased host cells, according to their cell-activation phenotype. These data are in line with the recent study of Björkstöm et al [39] showing prompt NK cell activation and expansion in humans infected with hantavirus.

Our data show that NKG2C<sup>+</sup> NK cells expand after CHIKV infection. However we cannot exclude an induction of NKG2C upon preexisting NK cells, or the elimination of NK cells that do not express NKG2C. This is closely associated with major modifications in the activation, differentiation, and cytolytic capacities of NK cells from CHIKV-infected viremic individuals. NKG2 receptor expression switched from inhibitory to activating after acute CHIKV infection, as previously described in other human infections, including HIV-1, CMV, HBV, and HCV [40–42]. The loss of

NKG2A<sup>+</sup> NK cells accompanied the expansion of NKG2C<sup>+</sup> NK cells, which exist at very low frequencies in uninfected individuals. The frequency of NKG2C<sup>+</sup> cells observed among CHIKV-infected individuals varied widely, but it is especially notable that it was significantly correlated with viral load. Interestingly, the rapid increase of NKG2C in response to the acute CHIKV infection was followed by a contraction phase, after viral clearance.

We cannot, however, reach a definitive conclusion about either the expansion of a specific NK cell subset or a difference in the lymphopenia rate in patients after CHIKV-infection, although both have been observed in a restricted population of murine NK cells expressing the activating receptor Ly49H<sup>+</sup> after MCMV infection [43–45]. In this model, NK cells were shown to possess features previously attributed to cells of the adaptive immune system, including the expansion of a specific subset followed by contraction and formation of cells with memory-like characteristics [29,45,46]. NKG2C expression during acute hantavirus and HIV-



**Figure 6. Significant down-modulation of intracellular IFN-γ expression in NK cells from CHIKV-infected patients.** (A) PBMC were collected from 10 Caucasian (CAU), and 10 Gabonese (GAB) healthy donors, and 10 CHIKV-infected patients (CHIK) to determine intracellular production of IFN-γ after overnight treatment with IL-12 and IL-18. Horizontal bars indicate the median. \*\*\*, p<0.0001. (B) Representative samples of each group are shown. Samples were gated on the CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK-cell gate for flow cytometric analysis. Numbers denote the percentage of intracellular IFN-γ<sup>+</sup> production among CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells and IFN-γ production in the sera of CHIKV-infected patients determined with Luminex Technology (Bio-Rad), as recently published [14]. doi:10.1371/journal.ppat.1002268.g006

1 infection has been associated with HCMV, but not EBV or HSV seropositivity [31,39,47]. Here we found that NKG2C expression was associated with HCMV serostatus in the three Caucasian CHIKV-infected patients. Evaluation of the HCMV status of the Gabonese patients was not relevant, as seroprevalence approaches 100% in this country [48].

More intriguingly, the NK cell repertoire appeared to be unusual with strong and specific correlations between NKG2C expression and specific self-inhibitory KIRs. In contrast to the overall NK cell repertoire, which contains a random distribution of KIRs, the NKG2C<sup>+</sup> NK cells in CHIKV-infected patients are associated with HLA-Cw allele receptors. The correlation with KIR2DL1, recognizing C2 HLA-C subtypes, is inverse, while that with KIR2DL2/DL3, recognizing C1 subtypes, is direct. This suggests that NK cells coexpressing NKG2C and receptors for HLA-C1 alleles expand during an acute viral infection. More importantly, HLA-C genotyping revealed that 11/12 CHIKV-infected patients examined in detail had HLA-C1/C1 or HLA-C1/C2 alleles. This finding suggests that expansion of highly cytotoxic NKG2C<sup>+</sup> NK cells is associated with imbalanced expression of unique self-specific receptors and may dampen autoreactivity and limit immunopathology in CHIKV-infected patients.

Analysis of a large number of CHIKV-infected individuals, combining genetic analysis of KIR and HLA, kinetic study of phenotypic and functional features of NK cells, and the long-term evolution of clinical indicators, might make it possible to draw statistically powerful conclusions. The presence of a single inhibitory HLA-C binding KIR showed that the KIR overexpressed during CHIKV-infection mediates NK-cell licensing in the highly functional NKG2C<sup>+</sup> NK cell subset, protecting against autoreactivity. This finding is supported by our recent observation of a persistent indolent proliferation of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> large granular lymphocytes expressing NKG2C<sup>+</sup> [49]. These data are also consistent with a case report of acute HCMV infection in a 3-month-old girl whose genes encoded a deficient alpha-chain of the IL-7 receptor known to be associated with a SCID-phenotype; phenotype characterization showed an extreme transient amplification of NKG2C-bearing NK cells positive for KIR2DL2/DL3, which accounted for more than 80% of the leukocytes [50]. More recently, Björkström *et al* [39] also showed a clonal selection of educated CD56<sup>dim</sup>NKG2C<sup>+</sup>KIR<sup>+</sup> NK cells in 5 hantavirus-infected patients. Taken together, these important data suggest a certain level of clonality in the response of NK cells against acute infection, including CHIKV infection. However, the underlying mechanism mediating this effect remains to be defined.

Collectively, our data suggest that the clonal expansion of a unique subset of NK cells coexpressing NKG2C and receptors for HLA-C1 alleles and correlated with the viral load, suggests that NK cells are able to sense CHIKV from the beginning of infection and may thus contribute to viral clearance. Understanding how these complex innate responses affect the outcome of CHIKV infection will help in the development of vaccines or other therapeutic strategies that could use innate immunity to enhance viral control with minimal pathogenesis.

## Materials and Methods

### Human ethics statement

This study was conducted in accordance with the principles expressed in the Declaration of Helsinki and with French statutory and regulatory law. Patients received information about research performed on biological samples and provided written informed consent to participate. The hospital's institutional review board (Comité de protection des personnes Ile-de-France VI) approved

the study (Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris).

### Patients and healthy controls

Peripheral blood samples from 25 CHIKV-infected patients (mean age 32±15 years, 60% women) were obtained during the CHIKV outbreak that occurred in Gabon, Central Africa, between March and August 2007. The outbreak began first in Libreville, the capital, and then spread to several small towns located on the road towards Cameroon in northern Gabon, generating approximately 20,000 cases. These samples were collected from patients whose symptoms included fever, arthralgia, and asthenia and who visited specific medical centers in Libreville during the first five days after the onset of symptoms. Diagnosis of CHIKV infection was confirmed for each of these patients, as described [7,14]. These CHIKV-infected patients were negative for dengue fever, yellow fever, West Nile fever, Rift Valley fever, and malaria. Gabonese (n = 15) and Caucasian (n = 15) sex- and age-matched healthy volunteers from Franceville (Gabon) and our hospital blood bank (EFS, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France) were used as controls. Kinetic studies were performed on 3 Caucasian CHIKV-infected patients from the Department of Infectious Diseases of the Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France) in 2006.

### Viral RNA extraction and quantification

Viral RNA was extracted from 90 µl of plasma from CHIKV-infected patients with an EZ1 advanced XL system (Qiagen, Courtaboeuf, France) and the EZ1 virus kit V2.0 (Qiagen). With the high capacity cDNA reverse transcriptase kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and according to the manufacturer's recommendations, 25 µl of extracted RNA was immediately reverse transcribed into cDNA. Real-time PCR was carried out in a 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems), with the Universal PCR master mix kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommendations with the specific primers F-CHIK and R-CHIK and the probe P-CHIK (10 mM) designed by Pastorino *et al*. [51]. A quantified synthetic CHIKV RNA transcript, kindly provided by the University of the Méditerranée (Pr X. De Lamballerie, Marseilles, France), was used as a standard. All amplifications were performed in duplicate.

### Flow cytometric analysis

NK cells were analyzed after staining with an appropriate antibody cocktail: anti-CD45 (J33), anti-CD3-ECD (UCHT1), anti-CD56-PC7 (N901), anti-CD8a-APC (B9.11), anti-CD159a/NKG2A-APC (Z199), anti-CD336/NKp44-PE (Z231), anti-CD335/NKp46-PE (BAB281), anti-NKG2D-PE (ON72), anti-CD85j/ILT2-PE (HP-F1), anti-CD69-APC (FN50), and anti-HLA-DR-PE (Immu357), KIR2DL1/KIR2DS1-PE (EB6B), anti-KIR2DL2/KIR2DL3/KIR2DS2-PE (GL183), KIR3DL1/KIR3DS1-PE (Z27) from Beckman Coulter; anti-CD94-FITC (HP-3D9), anti-CD57-FITC (S-HCL-1), and anti-CD161-FITC (DX12) from Becton Dickinson; anti-NKG2C-PE (134591), KIR2DS4-PE (179315), and anti-KIR2DL4-APC (181703) from R&D systems; anti-CD337/NKp30-PE (AF29-4D12), anti-KIR2DL1-APC (11 PB6), anti-KIR2DL2/KIR2DL3-APC (DX27), and anti-KIR3DL1-APC (DX9) from Miltenyi Biotech; and anti-KIR2DL5-Alexa Fluor 647 (UP-R1) from e-biosciences. For intracellular staining, PBMC were fixed and permeabilized with a cytofix/cytoperm kit (Becton Dickinson) and stained with perforin-PE (δG9), or granzyme-B-FITC (GB1), as described [36]. Isotype-matched immunoglobulins served as negative controls. Lymphocytes were identified by characteristic forward and side scatter

parameters and CD45 expression. Populations of interest were gated on patterns of CD56/CD3 staining within the CD45<sup>+</sup> lymphocyte population. Results are expressed as the percentage of positive cells within the gated population. At least 20,000 CD45<sup>+</sup> cells were analyzed on a Navios cytometer (Beckman Coulter). Expression of each NKR was measured as a percentage of the total CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells. Hierarchical clustering was applied, and the results were displayed with the use of the Genesis program (software available at [www.genome.tugraz.at](http://www.genome.tugraz.at)), as previously described [52–54].

### Functional analysis

Degranulation was assessed by the detection of LAMP1/CD107a, on PBMC cultured in the absence or in the presence of 1000 IU/ml of Proleukin-2 (Chiron) for 48 h, against K562, 721.211 or HLA-E-transfected 721.221 (AEH) target cell lines. Briefly, PBMC were resuspended in the presence of anti-CD107a mAb (H4A3, Becton Dickinson) with target cells at an effector:target (E:T) cell ratio of 1:1. After 1 h of incubation, monensin (Sigma Aldrich) was added at 2 mM for an additional 4 h of incubation [36,38].

To stimulate IFN- $\gamma$  production, PBMC were incubated overnight in the presence of IL-12 (10 ng/ml) and IL-18 (100 ng/ml) (R&D Systems). Cells were then fixed and permeabilized with a cytofix/cytoperm kit (Becton Dickinson) and stained with anti-IFN- $\gamma$  mAb (B27; Becton Dickinson), as described [36].

### HLA-Cw typing

Genomic DNA was extracted from PBMC of CHIKV-infected patients with the QIAamp DNA mini kit (Qiagen). HLA-C alleles were sequenced with the SBT kit (Aria Genetics). Sequences were read with a 3100 Genetic analyzer (Applied Biosystems) and computer-assisted Conexio genomics software.

### Statistical analysis

All statistical analyses were performed with Prism-5 software (GraphPad Software). Intergroup comparisons were assessed with the non-parametric Kruskal-Wallis test, with Dunn's post test to define the significance between results from 3 independent groups of subjects. Significance was defined by *P* less than 0.05 with a 2-tailed test. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001. Nonparametric correlations were assessed by determination of the Spearman's rank correlation coefficient.

### Supporting Information

**Figure S1 Cell-surface expression of NK cell markers on NK cells from Caucasian (CAU) and Gabonese (GAB) healthy donors, and CHIKV-infected patients (CHIK).**

### References

- Weaver SC, Barrett AD (2004) Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol* 2: 789–801.
- Schwartz O, Albert ML (2010) Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature Rev Microbiol* 8: 491–500.
- Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M (2007) Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect Dis* 7: 319–327.
- Sourisseau M, Schilte C, Casartelli N, Trouillet C, Guivel-Benhassine F et al (2007) Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog* 3: e89.
- de Lamballerie X, Leroy E, Charrel RN, Tssetsarkin K, Higgs S, et al. (2008) Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *J Virol* 5: 33.
- Rezza GL, Nicoletti R, Angelini R, Romi AC, Finarelli M, et al. (2007) Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370: 1840–1846.

(A) PBMC from one representative sample of each group of samples were stained with specific antibodies against NKG2A, NKG2C, ILT-2, NKp30 and NKp46, and then gated on the CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK-cell gate for flow cytometric analysis. Numbers denote the percentage of positive cells in the CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK-cell gate. (B) MFI of the expression of NK-cell receptors including NKG2A, NKG2C, ILT-2, NKp30 and NKp46. Horizontal bars indicate the median. \*: *p*<0.05; \*\*: *p*<0.001; \*\*\*: *p*<0.0001. (TIF)

**Figure S2 Expression of KIR in CHIKV-infected patients.** (A) Expression of KIR2DL1 and KIR2DL2/DL3 on NK cells from one representative sample of each group, including Caucasian (CAU) and Gabonese (GAB) healthy donors, and CHIKV-infected patient (CHIK). Numbers denote the percentage of positive cells in the CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK-cell gate. (B) Correlation between KIR2DL1 and KIR2DL2/DL3 expression on CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells from CHIKV-infected patients. (C) Frequency and MFI values of KIR2DL4, KIR2DL5, and KIR3DL1 on NK cells from Caucasian (CAU), and Gabonese (GAB) healthy donors, and CHIKV-infected patients (CHIK). (TIF)

**Figure S3 Expression of KIR in CHIKV-infected patients.** (A) Expression of KIR2DL1 and KIR2DL2/DL3 on NK cells from one representative sample of each group, including Caucasian (CAU) and Gabonese (GAB) healthy donors, and CHIKV-infected patient (CHIK). Numbers denote the percentage of positive cells in the CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK-cell gate. (B) Correlation between KIR2DL1 and KIR2DL2/DL3 expression on CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells from CHIKV-infected patients. (C) Frequency and MFI values of KIR2DL4, KIR2DL5, and KIR3DL1 on NK cells from Caucasian (CAU), and Gabonese (GAB) healthy donors, and CHIKV-infected patients (CHIK). (TIF)

**Table S1 Viral load, absolute count and frequency of CD3<sup>+</sup> T and CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells from Caucasian CHIKV-infected patients.** (DOC)

### Acknowledgments

We thank Gilda Gard and Mélanie Caron (CIRMF, Gabon) for technical assistance.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EML VV. Performed the experiments: CP PB NW VB VV. Analyzed the data: CP PB NW VB PD EML VV. Contributed reagents/materials/analysis tools: EML. Wrote the paper: NW EML VV.

- Leroy EM, Nkoghe D, Ollomo B, Nze-Nkoghe C, Beccart P, et al. (2009) Concurrent chikungunya and dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007. *Emerg Infect Dis* 15: 591–593.
- Gérardin P, Barau G, Michault A, Binitner M, Randrianaivo H, et al. (2008) Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. *PLoS Med* 5: e60.
- Sissoko D, Moendandze A, Malvy D, Giry C, Ezzedine K, et al. (2008) Seroprevalence and risk factors of chikungunya virus infection in Mayotte, Indian Ocean, 2005–2006: a population-based survey. *PLoS One* 3: e3066.
- Labadie K, Larcher T, Joubert C, Mannioui A, Delache B, et al. (2010) Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *J Clin Invest* 120: 894–906.
- Ng LF, Chow A, Sun YJ, Kwek DJ, Lim PL, et al. (2009) IL-1beta, IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. *PLoS One* 4: e4261.

Clonal Expansion of NK Cells in CHIKV Infection

12. Schilte C, Couderc T, Chretien F, Sourisseau M, Gangneux M, et al. (2010) Type I IFN controls chikungunya virus via its action on non hematopoietic cells. *J Exp Med* 207: 429–442.
13. Newman KC, Riley EM (2007) Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat Rev Immunol* 7: 279–291.
14. Wauquier N, Becquart P, Nkge D, Padilla C, Ndjoyi-Mbiguino A, et al. (2011) Strong innate immunity and T CD8 cell responses characterize the acute phase of mild chikungunya virus infection in humans. *J Infect Dis* 204: 115–123.
15. Bryceson YT, Long EO (2009) Line of attack NK cell specificity and integration of signals. *Curr Opin Immunol* 20: 344–352.
16. Lanier LL (2008) Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat Rev Immunol* 8: 259–268.
17. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S (2008) Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9: 503–510.
18. Yokoyama WM (2008) Mistaken notions about natural killer cells. *Nat Immunol* 9: 481–485.
19. Lanier LL (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23: 225–274.
20. Lee S-H, Biron CA (2010) Here today – not gone tomorrow: roles for activating receptors in sustaining NK cells during viral infections. *Eur J Immunol* 40: 923–932.
21. Aaskov JG, Dalglish DA (1981) Regulation in vitro of human natural killer (NK) cell activity. *Med Microbiol Immunol* 170: 109–116.
22. Alsharifi M, Lobigs M, Simon MM, Kersten A, Müller K, et al. (2006) NK cell-mediated immunopathology during an acute viral infection of the CNS. *Eur J Immunol* 36: 887–896.
23. Hoarau JJ, Jaffar Bandjee MC, Krejbich Trotot P, Das T, Li-Pat-Yuen G, et al. (2010) Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthrogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. *J Immunol* 184: 5914–5927.
24. Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, et al. (2006) NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol* 143: 345–356.
25. Hershkovitz O, Rosental B, Rosenberg LA, Navarro-Sanchez ME, Jivov S, et al. (2009) NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells. *J Immunol* 183: 2610–2621.
26. King NJ, Kesson AM (2003) Interaction of flaviviruses with cells of the vertebrate host and decoy of the immune response. *Immunol Cell Biol* 81: 207–216.
27. López-Botet M, Bellón T (1999) Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Curr Opin Immunol* 11: 301–307.
28. Poli A, Michel T, Thérèse M, Andrés E, Hentges F, et al. (2009) CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 126: 458–465.
29. Cooper MA, Colonna M, Yokoyama WM (2009) Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *EMBO Rep* 10: 1103–1110.
30. Mavilio D, Benjamin J, Daucher M, Lombardo G, Kottilil S, et al. (2003) Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15011–15016.
31. Gumá M, Angulo A, Vilches C, Gómez-Lozano N, Malats N, et al. (2004) Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 104: 3664–3671.
32. Mavilio D, Lombardo G, Benjamin J, Kim D, Follman D, et al. (2005) Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 2886–2891.
33. Azzoni L, Pappasavvas E, Chehimi J, Kostman JR, Mounzer K, Ondercin J, et al. (2002) Sustained impairment of IFN-gamma secretion in suppressed HIV-infected patients despite mature NK cell recovery: evidence for a defective reconstitution of innate immunity. *J Immunol* 168: 5764–5770.
34. Dunn C, Peppia D, Khanna P, Nebbia G, Jones M, et al. (2009) Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 137: 1289–1300.
35. Romagnani C, Juelke K, Falco M, Morandi B, D'Agostino A, et al. (2007) CD56brightCD16- killer Ig-like receptor-NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* 178: 4947–4955.
36. Béziat V, Descours B, Parizot C, Debré P, Vieillard V (2010) NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS One* 5: e11966.
37. Björkström NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, et al. (2010) Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* 116: 3853–3864.
38. Le Garff-Tavernier M, Béziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, et al. (2010) Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell* 9: 527–535.
39. Björkström NK, Lindgren T, Stoltz M, Fauriat C, Braun M, et al. (2011) Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J Exp Med* 208: 13–21.
40. Mela CM, Burton CT, Imami N, Nelson M, Steel A, et al. (2005) Switch from inhibitory to activating NKG2 receptor expression in HIV-1 infection: lack of reversion with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 19: 1761–1769.
41. Fausther-Bovendo H, Wauquier N, Cherhifs-Vicini J, Cremer I, Debré P, et al. (2008) NKG2C is a major triggering receptor involved in the V[delta]1 T cell-mediated cytotoxicity against HIV-infected CD4 T cells. *AIDS* 22: 217–226.
42. Oliviero B, Varchetta S, Paudice E, Michelone G, Zaramella M, et al. (2009) Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 137: 1151–1160.
43. Dokun AO, Kim S, Smith HR, Kang HS, Chu DT, et al. (2001) Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat Immunol* 2: 951–956.
44. Robbins SH, Tessmer MS, Mikayama T, Brossay L (2004) Expansion and contraction of the NK cell compartment in response to murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 173: 259–266.
45. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL (2009) Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 457: 557–561.
46. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL (2010) Immune Memory redefined: characterizing the longevity of natural killer cells. *Immunol Rev* 236: 83–94.
47. Gumá M, Cabrera C, Erkizia I, Bofill M, Clotet B, et al. (2006) Human cytomegalovirus infection is associated with increased proportions of NK cells that express the CD94/NKG2C receptor in aviremic HIV-1-positive patients. *J Infect Dis* 194: 38–41.
48. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB (2010) Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol* 20: 202–213.
49. Béziat V, Hervier B, Achour A, Boutolleau D, Marfain-Koka A, et al. (2011) Human NKG2A overrides NKG2C effector functions to prevent autoreactivity of NK cells. *Blood* 117: 4394–4396.
50. Kuijpers TW, Baars PA, Dantin C, van den Burg M, van Lier RA, et al. (2008) Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood* 112: 914–915.
51. Pastorino B, Bessaud M, Grandadam M, Murri S, Tolou HJ, et al. (2005) Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. *J Virol Methods* 124: 65–71.
52. Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z (2002) Genesis: Cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18: 207–208.
53. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, et al. (2005) Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 353: 2654–2666.
54. Vieillard V, Fausther-Bovendo H, Samri A, Debré P and French Asymptomatiques à Long Terme (ALT) ANRS-CO15 Study Group (2010) Specific phenotypic and functional features of natural killer cells from HIV-infected long-term nonprogressors and HIV controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 53: 564–573.

**PROJET 1B :** Etude longitudinale des cellules NK et des lymphocytes T chez des patients infectés par le CHIKV, DENV-2 ou co-infectés par les deux virus au cours de l'épidémie de 2010 à Franceville au Gabon.

**Longitudinal Study of NK and T Cell Populations in CHIKV, DENV-2 and CHIKV/DENV-2 Co-Infected Patients**

*Caroline Petitdemange, Nadia Wauquier, Hans Yssel, Philippe Engandja, Illich Mombo, Fabrice Kassa, Dieudonné Nkoghé, Eric Leroy, Vincent Vieillard.*

**Article soumis à publication**

La première étude phénotypique et fonctionnelle des cellules NK menée chez les patients infectés par le CHIKV au cours de l'épidémie de 2007 au Gabon avait permis de mettre en évidence l'expansion d'une population de cellule NK spécifique et effective.

L'épidémie qui a sévi à Franceville en 2010 a donné lieu à de nombreux cas de patients infectés par le CHIKV, DENV-2 ou coinfectés par le CHIKV et DENV-2. Les signes cliniques initiaux des infections par le CHIKV et DENV-2 sont peu discernables et rendent le diagnostic précoce souvent difficile. L'objectif de cette deuxième étude était de pouvoir comparer les réponses innées précoces (cellules NK) et tardives (Lymphocytes T) entre des patients infectés par le CHIKV, DENV-2 ou coinfectés par les deux virus. Pour cela, les trois groupes de patients ont été suivi longitudinalement en phase précoce (J0-J3), en phase tardive (J5-J15) et en phase de convalescence (J>30) pour étudier, par cytométrie en flux, les principaux marqueurs du répertoire des cellules NK et des LT.

Les résultats de cette étude ont mis en évidence que le phénotype des cellules NK est modulé de façon similaire chez les patients infectés par le CHIKV, le DENV-2 ou coinfecté par les deux virus. A l'inverse, le phénotype des LT est différent selon l'infection par le CHIKV ou DENV-2. Il est également important de noter que la réponse des LT des patients coinfectés est plus proche de celle des patients infectés par le DENV-2 que de celle des patients infectés par le CHIKV.

## **Longitudinal Study of NK and T Cell Populations in CHIKV, DENV-2 and CHIKV/DENV-2 Co-Infected Patients**

Caroline Petitdemange<sup>†, #, §</sup>, Nadia Wauquier<sup>§, ¶</sup>, Hans Yssel<sup>†, #</sup>, Philippe Engandja<sup>§</sup>, Ilich Mombo<sup>§</sup>, Dieudonné Nkoghe<sup>§</sup>, Patrice Debré<sup>†, #</sup>, Eric Leroy<sup>§</sup>, Vincent Vieillard<sup>†, #, ¥</sup>.

<sup>†</sup>Sorbone Universités, UPMC, Univ Paris 06, CR7, CIMI-Paris, F-75005, Paris, France; <sup>#</sup>INSERM U1135, CIMI-Paris, F-75013, Paris, France; <sup>§</sup>Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), Franceville, Gabon; <sup>¶</sup>Metabiota, Inc., San Francisco, CA and Washington D.C., USA; <sup>¥</sup>CNRS, ERL8255, CIMI-Paris, F-75013, Paris, France.

This study was supported in part by the Institut National de la Recherche Médicale (INSERM), and the Université Pierre et Marie Curie, Paris, France. CIRMF is supported by the government of Gabon, Total-Fina-Elf Gabon, and the Ministère des affaires Etrangères, France.

Address correspondence to Vincent Vieillard, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Equipe 14 – Cellules NK et Pathologies, Hôpital La Pitié-Salpêtrière, 83 Boulevard de l'Hôpital, Paris, F-75013, France. E-mail: vincent.vieillard@upmc.fr

**Running title:** Extensive Immunological Phenotyping of Arboviral Infections.

**Key words:** Chikungunya, Dengue, NK-cells, T-cells, activation, differentiation, phenotype

## Abstract

Chikungunya (CHIKV) and dengue (DENV) viruses are the most prominent arboviruses worldwide, causing major epidemics in South-East Asia, South America and Africa. In 2010, a simultaneous outbreak of CHIKV and DENV-2 occurred in Gabon, central Africa, leading to the first identification of co-infected cases. Pre-existing immunity and the triggering of the innate and adaptive immune responses during the course of infection are thought to be of primordial importance in the development of CHIKV and DENV-associated pathologies and outcome. In this study, we performed an extensive longitudinal characterization of Natural Killer (NK) and T cell populations in patients infected with either one or both viruses providing the first detailed description of NK cells in the context of DENV infection. We observed a comparable NK cell profile amongst all three patient groups which involved the expansion of a highly activated and differentiated NK cells, whereas the persistence of a fully differentiated NKG2C<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> NK cell population in association with viral load was only observed in CHIKV convalescent patients. Distinct profiles of T cell activation and differentiation emerged from the three groups of patients suggesting, a variable impact of the T cell response during these infections. All together, our data points towards a crucial role of NK cells in the control of both CHIKV and DENV, as well as a divergence in the T-cell response between both infections



## Introduction

Chikungunya virus (CHIKV) and dengue virus (DENV) are both re-emerging mosquito-borne arboviruses. Over the past twenty years, CHIKV and DENV have caused severe worldwide epidemics. They are associated with explosive urban epidemics and have become a major public health problem with significant economical and social impacts (1,2). The two major mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* are responsible for large simultaneous CHIKV and DENV outbreaks (3-5). For instance, during a large outbreak in 2010 in Franceville, Gabon, both viruses were detected in a mosquito caught in the wild, thus leading to evidence of their simultaneous transmission to humans (6).

DENV and CHIKV infections both cause acute illness; after an incubation period of 2-4 days for CHIKV and 5-7 days for DENV, both infections result in a spectrum of similar clinical symptoms, characterized by high fever, myalgia, headache, joint pain, skin rash and vomiting (7,8). Severe incapacitating arthralgia is typical of CHIKV infection (9). Dengue fever (DF) is caused by any of four closely related viruses, or serotypes: dengue 1-4. Infection with one serotype does not protect against the others, and sequential infections put people at greater risk for dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS) (10). Most clinical symptoms resolve within a few weeks, except for CHIKV specific arthralgic pains that can persist for longer periods (11).

The first phase of CHIKV and DENV infections is typical of acute viral infections. A very early type 1 interferon (IFN- $\alpha/\beta$ ) response is detected on the first day of infection and in part responsible for the rapid control of the viremia (12,13). IFN- $\alpha/\beta$  also contribute to the activation of Natural Killer (NK) cells that are a key component of the innate immune defense during early infectious events. The immune-regulatory and cytolytic functions of NK cells are controlled by a sophisticated repertoire of activating and inhibitory NK receptors that allow them to distinguish between healthy and virus-infected cells. Different types of NK inhibitory receptors have been identified, including the killer cell immunoglobulin (Ig)-like receptor (KIR) family, CD94/NKG2A and ILT2, which recognize distinct major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. Moreover, a critical threshold of signaling via activating receptors that exceeds the counterbalancing influence of inhibitory receptors must be reached in order for NK cells to mount a productive response. These activating receptors include NKG2C, NKG2D, DNAM-1 and the natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 (14-18).

Recently, we demonstrated the importance of NK cells in the control of acute CHIKV infection. Through a transversal phenotypic and functional study of NK cells collected from CHIKV-infected individuals, we provided evidence that CHIKV could shape the NK cell

repertoire. Thus, we observed a clonal expansion of a unique subset of NK cells co-expressing NKG2C and KIR2DL2/2DL3 that was correlated with the viral load, in association with elevated cytotoxic capacity and in the absence of IFN- $\gamma$  production (19). This suggested that NK cells are able to sense CHIKV early during the course of infection and may thus contribute to viral clearance. Concerning DENV infection, only few data are available; yet it has been reported that most NK cells from DENV infected patients display early activation markers and cell adhesion molecules (20).

Established by primary activation events, the adaptive immunity plays a critical role in combating viral infections and orchestrating the mounting of an effective memory response (21). Although early immune events seem major to control both CHIKV and DENV acute infections, chronic arthralgic problems associated with CHIKV infection and severe secondary heterologous DENV infections are certainly associated to the cellular adaptive responses triggered during the acute phase. Our understanding of T cell involvement during CHIKV and DENV pathogenesis is still in its infancy. One marked and common feature is the acute lymphopenia observed in both infections (9,20). Overall, studies observed an early-stage proliferation and activation of CD8<sup>+</sup> T cells with a switch to CD4<sup>+</sup> T cell responses at a later stage in CHIKV infected patients (9,22). It was recently demonstrated that CD4<sup>+</sup> but not CD8<sup>+</sup> T cells play a major role in mediating the severity of joint inflammation in a mouse model of CHIKV infection although they had no role in the control of the virus replication and dissemination (23). Regarding DENV infection, the majority of existing studies have focused on the role of T cells in the immuno-pathogenesis of secondary heterologous DENV infections but only limited data are available regarding the implication of T cells in the context of a acute DENV infection (24). Yauch *et al.* (25) have developed a mouse infected DENV-2 model and demonstrated an important contribution of CD8<sup>+</sup> T cells to the anti-DENV immune response. In this model a depletion of CD8<sup>+</sup> T cells resulted in an impaired ability of the mice to clear DENV.

In this study, we longitudinally compared NK and T cell responses in patients infected with CHIKV, DENV-2 or both viruses to determine the *ex-vivo* contribution of these immune subsets in protection *vs* pathogenesis during a primary infection. The results underscore dual clonal expansion of CHIKV and DENV-2-specific immune responses.

## **Materials and Methods**

### *Ethical considerations*

The research unit, Unité des Maladies Virales Emergentes (UMVE) at the Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF) partnered with the Gabonese Ministry of

Health and Sanitation (MoHS) to respond to this outbreak. Epidemiological and clinical inquiries as well as blood sampling for laboratory confirmation were considered as part of the public health response. According to the MoHS directives, written consent was not required due to the necessity for emergency diagnosis and only an oral consent was obtained for each patient during interviews. The Regional Health Director approved this study, including oral individual consent for blood sampling (Authorization n°189).

#### *Patients, healthy controls and sample preparation*

A simultaneous outbreak of CHIKV and DENV occurred in two provinces, Ogooue Lolo and Haut Ogooue, in southeast Gabon, central Africa, between April and July 2010. The study took place in Franceville at the CIMRF. Peripheral blood samples were collected when suspected cases presented at least one of the following symptoms: fever ( $>38.5^{\circ}\text{C}$ ), arthralgias, myalgias, headaches, rash, fatigue, nausea, vomiting, diarrhea or bleeding. Patients who met the case definition were sampled and tested for various arboviral RNA genomes using the TaqMan quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). We performed a kinetics study using early acute samples collected between days 0-3, late acute samples collected between days 5-15 and convalescent samples collected at days  $>30$ , after the onset of symptoms. Isolation of PBMCs was performed by standard histopaque density centrifugation. Control PBMC samples in which no CHIKV and DENV could be detected were collected from healthy volunteers from Franceville, Gabon.

#### *Virological characterization*

RNA was extracted from 140  $\mu\text{L}$  of plasma using the QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen). cDNA was synthesized using qRT-PCR with a 9700 thermocycler (Applied biosystems), and mixing 25  $\mu\text{L}$  of extracted RNA with 25  $\mu\text{L}$  of High Capacity cDNA kit (Applied Biosystems). Finally, 5  $\mu\text{L}$  of newly synthesized cDNA was used as template in 25  $\mu\text{L}$  of Taqman universal PCR Master Mix with specific CHIKV or DENV primers and run in a 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystem), as described (6).

#### *Flow cytometric analysis*

Phenotypes were realized on PBMCs. Cells were stained using the appropriate cocktail of antibodies: anti-CD45-KO (J33), anti-CD3-ECD (UCHT1), anti-CD56-PC7 (N901), anti-NKG2A-APC (Z199), anti-CD57-PB (NC1), anti-NKp44-PE (Z231), anti-CD16-PB (3G8), anti-ILT-2-PE (HP-F1), anti-CD27-PE (1A4CD27), anti-CD45RA-ECD (2H4LDH11LDB9), anti-CD3-APC-Alexa Fluor 750 (UCHT1), anti-HLA-DR-ECD (Immu-357), anti-CD19-PC7 (J3-119), anti-CD20-PB (B9E9) from Beckman coulter; anti-KIR2DL2/3-FITC (CH-L), anti-

CD69-APC-Cy7 (FN50), anti-CD161-FITC (DX12), anti-CD38-APC (HIT2), anti-HLA-DR-Alexa Fluor 700 (G46-6), anti-CD4-FITC (GK1.5), anti-CCR7-PC7 (3D12), anti-CD69-APC (FN50), anti-CD8-V450 (RPA-T8) from Becton Dickinson; anti-NKp30-APC (AF29-4D12) from Miltenyi Biotec. Isotype-matched immunoglobulins served as negative controls. Cells were gated on the CD45<sup>+</sup> lymphocytes gate. At least 20,000 CD45<sup>+</sup> cells were analyzed on a Gallios cytometer (Beckman coulter). Flow cytometry data was analyzed using FlowJo software version 9.

### *Statistical analysis*

All statistical analyses were performed with Prism-5 software (GraphPad Software). Mann-Whitney test were performed for individual comparisons of two independent groups, and the nonparametric Kruskal–Wallis test with Dunn post-test was used to define the significance of results from more than two independent groups of subjects, when compared 2 by 2. Nonparametric correlations were assessed by determination of Spearman rank correlation coefficient. P-values <0.05 were considered significant. \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001.

## **Results**

### *Expansion of highly activated and differentiated NK cell subset in CHIKV, DENV-2 and co-infected patients*

Using multi-color flow cytometry, we performed an extensive characterization of NK cells in peripheral blood cells collected from CHIKV, DENV-2 and co-infected patients as well as healthy Gabonese individuals. As described, NK cell frequency increased early after both CHIKV and DENV-2 infections, but more rapidly in CHIKV-infected patients with a peak between days 0-3. In DENV-2-infected patients, the frequency of NK cells gradually increased and peaked between days 5-15 after onset of symptoms. A similar profile to CHIKV and DENV infected patients was observed in co-infected patients (Fig. 1A).

We then analyzed the expression of the early activation marker CD69 at the surface of NK cells. The proportion of CD69<sup>+</sup> NK cells significantly increased in all patients to reach 58±21% in CHIKV<sup>+</sup>; 55±21% in DENV-2<sup>+</sup> and 42±5% in CHIKV/DENV-2 co-infected patients, as compared to 15±6% in healthy Gabonese controls (Fig. 1B). Activation of NK cells was also confirmed by an increased expression of HLA-DR and NKp44, two markers expressed on late-activated NK cells (Supplemental Fig. 1). Importantly, one month after disease onset, the Frequency of these activation markers returned close to the baseline levels as observed in healthy individuals.

We next assessed the modulation of specific NK cell receptors induced by CHIKV and DENV-2 infections. When compared to that of the non-infected control group, NKp30

expression revealed a substantial decline, irrespective of the patient group (Fig. 1C). Interestingly, acute infection with either CHIKV or DENV-2 was also associated with a significant decrease of NKG2A and CD161, two inhibitory receptors mainly expressed on immature NK cells, whereas, ILT-2 (data not shown) and CD57 (Fig. 1C), mainly expressed on matured NK cells were significantly increased post-infection. This indicates that CHIKV and DENV-2 infections favor the terminal differentiation of NK cells. However, as compared to patients infected with CHIKV samples, these phenotypic modulations seem to occur similarly, but more gradually, in DENV-2<sup>+</sup> patients, with a peak at a later stage of infection. Co-infected patients' NK cell expression profiles showed a combination of both CHIKV and DENV-2 infection features, characterized by a prolonged increase in NKG2A and CD161 expression prior to returning to the baseline as compared as compared to healthy controls

Altogether, this data suggests that both activation and differentiation of NK cells are induced during the acute phase of infection by CHIKV and DENV-2, albeit much faster in CHIKV infection.

#### *Specific association of KIR2DL receptors with NK cells in CHIKV and DENV-2 infected patients*

In addition to the expression of the NK inhibitory receptors, mentioned above, we analyzed, on NK cells of infected patients, the expression of the KIR family members. In patients infected with CHIKV only, the proportion of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells decreased, whereas, simultaneously, the proportion of KIR2DL2/2DL3<sup>+</sup> NK cells significantly increased (48±15 % vs 29±12 % in controls) (Fig. 2). In contrast, a stronger expression of KIR2DL1 was observed in DENV-2-infected patients (40±21 % vs 17±9 % in controls; p<0.05), which was associated with a decrease in KIR2DL2/2DL3-expressing NK cells (16±12 % vs 29±12 % in controls). In co-infected patients the percentage of NK cells expressing KIR2DL1 (35±19 % vs 17±9 % in controls) and/or KIR2DL2/2DL3 (41±4 % vs 29±12 % in controls) increased to the same extent as those from patients infected by CHIKV alone (Fig. 2).

#### *Persistence of a highly differentiated NKG2C<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> NK cell population in association with viral load in convalescent CHIKV-infected patients*

CHIKV and DENV-2 infections were both associated with a rapid and significant increase in frequency of NK cells expressing NKG2C (Fig. 3A), consistent with results reported for CMV, HIV-1 or hantavirus infections (26-28). NKG2C expression after infection has been associated with the terminal stage of NK cell differentiation (14). Supporting this observation, NKG2C<sup>+</sup> NK cells from CHIKV<sup>+</sup> patients mainly expressed CD57. In contrast, in NK cells from DENV-2<sup>+</sup> and co-infected patients, CD57 expression was not associated with that of

NKG2C expression (Fig. 3B), suggesting that contrasting results are observed in regards to the NK differentiation after infection by each of these viruses. It is noteworthy that after CHIKV infection the modulation of high frequency of CD57<sup>+</sup>/NKG2C<sup>+</sup> NK cells was transient in most patients, however, a subset of these NK cell subset persisted in some patients in the convalescent phase, more than 30 days after infection (Fig. 3C). Interestingly, most convalescent patients with a persistent increased frequency of CD57<sup>+</sup>/NKG2C<sup>+</sup> NK cells presented the highest viral load during the early acute phase of the infection (Fig. 3D). Indeed, the set point of the viral load quantified during the early acute CHIKV infection was directly correlated with CD57 expression (Spearman coefficient  $r=0.57$ ;  $p=0.04$ ) and NKG2C expression (Spearman coefficient  $r=0.80$ ;  $p = 0.01$ ), both assessed during the convalescent phase of infection (Fig. 3D). This could suggest a relationship between the initial amount of viral load and the persistence of a specific, highly differentiated NK subset in CHIKV<sup>+</sup> patients.

*Distinct CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell profiles between CHIKV, DENV-2 infected and co-infected patients*

Consistently with previous data (9,19,20), we observed a lymphopenia of CD3<sup>+</sup> T cells in all three patient groups (data not shown). However, the relative proportion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was not profoundly modulated during the first 30 days after CHIKV and DENV-infections, with the exception for CD8<sup>+</sup> T cells which gradually and significantly increased after CHIKV infection (Supplemental Fig. 2).

A strong activation of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was observed in CHIKV<sup>+</sup> patients as shown by the moderate increase in CD69 expression (data not shown) and massive increase in HLA-DR expression (Fig. 4). In contrast, expression levels of both CD69 and HLA-DR did not increase significantly in DENV-2<sup>+</sup> patients but remained within range of the control group. Intriguingly, only CD4<sup>+</sup> T cells were strongly activated whereas the expression of CD69 and HLA-DR did not significantly vary on CD8<sup>+</sup> T cells in co-infected patients (Fig. 4).

We next assessed the differentiation status of CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T cells according to the expression of the CD45RA and CCR7 surface molecules, in order to determine the mobilization of naive ( $T_N = CD45RA^+CCR7^+$ ), effector ( $T_{EFF} = CD45RA^+CCR7^-$ ) and central memory ( $T_{CM} = CD45RA^-CCR7^+$ ) T-cell subsets in all groups of patients. Frequencies of both CD4<sup>+</sup> ( $p<0.05$ ) and CD8<sup>+</sup> ( $p<0.005$ )  $T_{EFF}$  cells were significantly increased in the acute stage of CHIKV infection while only CD8<sup>+</sup>  $T_{EFF}$  cells ( $p<0.005$ ) were significantly increased in acute DENV-2 infection (Fig. 5). Of note, in all patients, the frequencies of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>  $T_N$  and  $T_{CM}$  cells were slightly decreased after infection (Fig. 5).

During the convalescent phase of infection (from day 25 post-infection), the frequency of CD4<sup>+</sup>  $T_{EFF}$  cells remained significantly increased in all infected samples, whereas, the CD8<sup>+</sup>

T<sub>EFF</sub> cells returned close to baseline levels in CHIKV<sup>+</sup> samples. Notably, the level of CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> cells was significantly decreased in DENV-2<sup>+</sup> and co-infected patients, but returned closed the control values after CHIKV infection (Fig. 5).

## Discussion

In this study, we investigated the immunological footprint of NK and T lymphocytes established after CHIKV, DENV-2 infections or CHIKV/DENV-2 co-infections.

Results from various studies have demonstrated the importance of NK cells in controlling viral infections. Yet the involvement of NK cells in response to mosquito-borne arboviruses is poorly appreciated. Here, we provide evidence that NK cells are involved in the earliest stages of the innate response to CHIKV and DENV-2 infections. In agreement with previous studies, we report here that NK cells are rapidly activated after both infections, corroborating earlier reports in the literature (19,20). We observed a shift in the NK cell repertoire towards the accumulation of more mature, terminally differentiated NK cells, expressing more frequently NKG2C, ILT-2 and CD57 and less NKG2A, NKp30 and CD161. We cannot rule out the possibility that the expansion of an NKG2C-expressing subset of NK cells may be linked to other infections such as human cytomegalovirus (HCMV). Indeed, there is growing evidence showing that preferential expansion of NKG2C<sup>+</sup> NK cells occurs not only after HCMV infection (29), but also after HIV-1, Hantavirus and hepatitis infections occurring in HCMV seropositive patients (26,27,30,31). Given that seroprevalence for HCMV reaches 100% in Africa (32), it is likely that the NK cell phenotype observed here in CHIKV and DENV-2 patients is linked to CMV. In all cases, NKG2C population expansion is transient. Interestingly though, in 5 convalescent CHIKV<sup>+</sup> patients that presented chronic arthralgia, we observed a prolonged persistence of the NKG2C<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> NK cell subset. Because of the high viral loads in these patients during the acute stage of infection and their association of that CHIKV infection with high levels of pro-inflammatory cytokines (22), it is tempting to speculate that the acute stage of infection may affect the outcome of the disease and the subsequent development of persistent symptoms by maintaining a particular inflammatory environment that promotes the persistence of the NKG2C<sup>+</sup> NK cell subset. However, further investigations are needed to correlate these different features with disease progression.

Consistent with previous data (19), we also show that CHIKV infection is associated with the expression of inhibitory KIR2DL2/2DL3 receptors, whereas DENV-2 induces expansion of KIR2DL1-expressing NK cells. Interestingly, NK cells from co-infected patients expressed both KIRs. Although the mechanism behind the expansion of NK cells bearing self-specific KIR remains elusive, the observation that the expression of different KIR is associated with CHIKV, as well as DENV-2 infection suggests that these viruses are directly involved in

triggering expansion and differentiation of NK cells. Thus, we can hypothesize that the binding of KIR to HLA-class I molecules could be modulated by HLA-presented CHIKV and DENV-2 peptides, as previously shown in HIV-1 infected patients (33). Hence certain peptides from CHIKV may be restricted to or preferentially presented by HLA-C1, which specifically bind KIR2DL2/2DL3, whereas peptides from DENV-2 may be preferentially associated with HLA-C2 molecules, which recognize KIR2DL1. Further studies will be required to identify these HLA-restricted viral peptides and the functional consequences in regards to the NK cell response.

In addition to an efficient innate immune response, T cells are essential in recovery from viral infections and for the establishment of an effective memory response. With respect to previous studies, both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells seem to be implicated in CHIKV infection while CD8<sup>+</sup> T cells are mostly involved in response to DENV (34). In CHIKV infection, several observations support the hypothesis of an early anti-viral cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cell response to control virus replication, followed by a switch to CD4<sup>+</sup> T cell response to facilitate neutralizing antibody production (9,22). We found that CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from CHIKV<sup>+</sup> and co-infected patients showed a rapid and sustained activated state, up to three months after initial infection, whereas in DENV-2 infections the activation level of T cells rapidly returned close to the initial levels after a month.

Studying T cell activation and differentiation appear critical to understand the mechanisms of immuno-pathogenesis implicated in both infections. It was recently shown that CD4<sup>+</sup> T cells could play a pathogenic role in infiltrating tissues of CHIKV<sup>+</sup> patients (35). Such persistence may contribute to the long-lasting arthralgic symptoms associated with continuing inflammatory responses in association with the virus persistence in certain tissues (36). Concerning DENV infection, there is strong evidence for implication of T-cells in secondary severe dengue infections. A secondary challenge by a heterologous DENV serotype is associated with T cells cross-reacting memory induced by the primary infection and T cells seem to be more implicated in this process than in the primo-DENV infection (37-39). Both infections induce the production of a wide range of Th1 and Th2 cytokines, chemokines and growth factors (13,22,40,41), which further support the role of T cells in mediating pathogenesis. In CHIKV infection, Hoarau *et al.* (9) indicated a link between chronic disease and a stronger inflammatory response in the acute phase of infection. We know from HIV studies (42) that inflammation contributes to the destruction and elimination of viruses, but may also maintain the level of activation required for viral persistence in tissues, particularly in macrophages, a cell target common to HIV-1 and CHIKV (36). Interestingly, recent studies suggest that unlike CHIKV infection, acute DENV-2 infection is associated with an increased frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and over-expression of IL-10 and IL-17,



two cytokines produced by these cells (43). This could impact the T cell activation in response to DENV-2, in line with data reporting impaired cell mediated T cell responses of acute DENV-2 infected patients (44).

Results explored by the current study are more aptly highlighted by the longitudinal exploration of T cell differentiation, beside the data of the activation, in line with those previously published. In CHIKV<sup>+</sup> patients, in addition to a sustained and prolonged activation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, we observed, for the first time, their continued maturation status. This was consistent with persistent virus infection, exhibiting a mature phenotype (45,46).

Much less is known about CD4<sup>+</sup> T cell response during DENV infection but the significant low frequency of CD4<sup>+</sup> central memory DENV-2 T cells reported in this study could potentially explain the weak and short immunity that persist after a primo-DENV infection (47), and that may contribute, together with the CD8<sup>+</sup> T-cell response, to a detrimental immune response.

It is critical to understand and exploit the beneficial and detrimental effects imposed by each arbovirus on host survival in the context of CHIKV/DENV-2 co-infection. To the best of our knowledge, this is the first study to explore the immune response in these co-infected patients. Caron *et al.* (6) have shown that co-infected patients can be subdivided into two groups, relatively to CHIKV and DENV-2 specific cDNA load: one group had high cDNA loads of both CHIKV and DENV-2 and one other group had high DENV-2 cDNA load but low CHIKV cDNA load, the opposite being never observed, suggesting a possible viral competitive mechanism. Under this complex scenario, our data revealed that co-infected patients displayed similarities with both CHIKV and DENV-2 NK cell profiles. However T cells response profiles in co-infected patients seem to be more similar to DENV-2 profiles rather than CHIKV profiles. Understanding the mechanisms underlying the co-infections is interesting and could be apply to other types of co-infections. Emergence of CHIKV and DENV-2 co-infection during recent major concomitant outbreaks is concerning and needs to be closely monitored.

## Acknowledgements

We are very grateful to the Gabonese Ministry of Health and Sanitation, and in particular, Jean Baptiste Atsougou, the Regional Health Director, for their engagements during these outbreaks. We also wish to thank André Délicat from CIRMF for technical assistance.

## Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

## References

1. Gubler, D. J., and M. Meltzer. 1999. [Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world](#). *Adv. Virus Res.* 53: 35-70.
2. Vijayakumar, K., George, B., Anish, T. S., Rajasi, R. S., Teena, M. J., C. M. and Sujina. 2013. [Economic impact of chikungunya epidemic: out-of-pocket health expenditures during the 2007 outbreak in Kerala, India](#). *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 44: 54-61.
3. Reiter, P., Fontenille, D., and C. Paupy. 2006. [Aedes albopictus as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem?](#) *Lancet Infect. Dis.* 6: 463-464.
4. Rezza, G. 2012. [Aedes albopictus and the reemergence of Dengue](#). *BMC Public Health.* 12: 72.
5. Tomasello, D, and P. Schlagenhauf. 2013. [Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007-2012](#). *Travel Med. Infect. Dis.* 11: 274-284.
6. Caron, M., Paupy, C., Grard, G., Becquart, P., Mombo, I., Nso, B. B., Kassa, F., Nkoghe, D., and E. M. Leroy. 2012. [Recent introduction and rapid dissemination of Chikungunya virus and Dengue virus serotype 2 associated with human and mosquito coinfections in Gabon, central Africa](#). *Clin. Infect. Dis.* 55: e45-53.
7. Caglioti, C., Lalle, E., Castilletti, C., Carletti, F., Capobianchi, M. R., L. and Bordi. 2013. [Chikungunya virus infection: an overview](#). *New Microbiol.* 36: 211-227.
8. Simmons, C. P., Wolbers, M., Nguyen, M. N., Whitehorn, J., Shi, P. Y., Young, P., Petric, R., Nguyen, V. V., Farrar, J., B. and Wills. 2012. [Therapeutics for dengue: recommendations for design and conduct of early-phase clinical trials](#). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6: e1752.
9. Hoarau, J. J., Jaffar Bandjee, M. C., Krejbich Trotot, P., Das, T., Li-Pat-Yuen, G., Dassa, B., Denizot, M., Guichard, E., Ribera, A., Henni, T., et al. 2010. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. *J. Immunol.* 184: 5914-5927.

10. Srikiatkachorn, A., Gibbons, R. V., Green, S., Libraty, D. H., Thomas, S. J., Endy, T. P., Vaughn, D. W., Nisalak, A., Ennis, F. A., Rothman, A. L., et al. 2010. [Dengue hemorrhagic fever: the sensitivity and specificity of the world health organization definition for identification of severe cases of dengue in Thailand, 1994-2005](#). Clin. Infect. Dis. 50: 1135-1143.
11. Simon, F., Javelle, E., Oliver, M., Leparc-Goffart, I., C. and Marimoutou. 2011. [Chikungunya virus infection](#). Curr. Infect. Dis. Rep. 13: 218-228.
12. Schilte, C., Couderc, T., Chretien, F., Sourisseau, M., Gangneux, N., Guivel-Benhassine, F., Kraxner, A., Tschopp, J., Higgs, S., Michault, A., et al. 2010. [Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells](#). J. Exp. Med. 207:429-442.
13. Becquart, P., Wauquier, N., Nkoghe, D., Ndjoyi-Mbiguino, A., Padilla, C., Souris, M., E. M. and Leroy. 2010. [Acute dengue virus 2 infection in Gabonese patients is associated with an early innate immune response, including strong interferon alpha production](#). BMC Infect. Dis. 10: 356.
14. Béziat, V., B. Descours, C. Parizot, P. Debré, and V. Vieillard. 2010. NK cellterminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. PLoS ONE 5: e11966.
15. Bottino, C., L. Moretta, and A. Moretta. 2006. NK cell activating receptors and tumor recognition in humans. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 298: 175–182.
16. Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini. 2008. Functions of natural killer cells. Nat. Immunol. 9: 503–510.
17. Sun, J. C., and L. L. Lanier. 2011. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8+ T cells. Nat. Rev. Immunol. 11: 645–657.
18. Hudspeth, K., B. Silva-Santos, and D. Mavilio. 2013. Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. Front. Immunol. 4: 69.
19. Petitdemange, C., Becquart, P., Wauquier, N., Béziat, V., Debré, P., Leroy, E. M., and V. Vieillard. 2011. [Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity](#). PLoS Pathog. 7: e1002268.
20. Azeredo, E. L., De Oliveira-Pinto, L. M., Zagne, S. M., Cerqueira, D. I., Nogueira, R. M., and C. F. Kubelka. 2006. [NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease](#). Clin. Exp. Immunol. 143: 345-356.

21. [O'Hara, G. A., Welten, S. P., Klenerman, P., and R. Arens.](#) 2012. Memory T cell inflation: understanding cause and effect. [Trends Immunol.](#) 33: 84-90.
22. [Wauquier, N., Becquart, P., Nkoghe, D., Padilla, C., Ndjoyi-Mbiguino, A., and E. M. Leroy.](#) 2011. [The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation.](#) [J. Infect. Dis.](#) 204: 115-123.
23. [Teo, T. H., Lum, F. M., Claser, C., Lulla, V., Lulla, A., Merits, A., Rénia, L., L. F. and Ng.](#) 2013. [A pathogenic role for CD4+ T cells during Chikungunya virus infection in mice.](#) [J. Immunol.](#) 190: 259-269.
24. [Rothman, A. L.](#) 2003. [Immunology and immunopathogenesis of dengue disease.](#) [Adv. Virus Res.](#) 60: 397-419.
25. [Yauch, L. E., Zellweger, R. M., Kotturi, M. F., Qutubuddin, A., Sidney, J., Peters, B., Prestwood, T. R., Sette, A., and S. Shresta.](#) 2009. A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. [J. Immunol.](#) 182: 4865-4873.
26. [Gumá, M., Angulo, A., Vilches, C., Gómez-Lozano, N., Malats, N., and M. López-Botet.](#) 2004. [Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire.](#) [Blood.](#) 104: 3664-3671.
27. [Gumá, M., Cabrera, C., Erkizia, I., Bofill, M., Clotet, B., Ruiz, L., M. and López-Botet.](#) 2006. [Human cytomegalovirus infection is associated with increased proportions of NK cells that express the CD94/NKG2C receptor in aviremic HIV-1-positive patients.](#) [J. Infect. Dis.](#) 194: 38-41.
28. [Björkström, N. K., Lindgren, T., Stoltz, M., Fauriat, C., Braun, M., Evander, M., Michaëlsson, J., Malmberg, K. J., Klingström, J., Ahlm, C., et al.](#) 2011. [Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus.](#) [J. Exp. Med.](#) 208: 13-21.
29. [Della Chiesa, M., Falco, M., Podestà, M., Locatelli, F., Moretta, L., Frassoni, F., and A. Moretta.](#) 2012. [Phenotypic and functional heterogeneity of human NK cells developing after umbilical cord blood transplantation: a role for human cytomegalovirus?](#) [Blood](#) 119: 399-410.
30. [Béziat, V., Dalgard, O., Asselah, T., Halfon, P., Bedossa, P., Boudifa, A., Hervier, B., Theodorou, I., Martinot, M., Debré, P., et al.](#) 2012. [CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients.](#) [Eur. J. Immunol.](#) 42: 447-457.
31. [Saghafian-Hedengren, S., Sohlberg, E., Theorell, J., Carvalho-Queiroz, C., Nagy, N., Persson, J. O., Nilsson, C., Bryceson, Y. T., and E. Sverremark-Ekström.](#) 2013. [Epstein-Barr virus coinfection in children boosts cytomegalovirus-induced differentiation of natural killer cells.](#) [J. Virol.](#) 87: 13446-13455.

32. Cannon, M. J., Schmid, D. S., and T. B. Hyde. 2010. [Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection](#). *Rev. Med. Virol.* 20: 202-213.
33. Alter, G., [Heckerman, D.](#), [Schneidewind, A.](#), [Fadda, L.](#), [Kadie, C. M.](#), [Carlson, J. M.](#), [Oniangue-Ndza, C.](#), [Martin, M.](#), [Li, B.](#), [Khakoo, S. I.](#), et al. 2011. HIV-1 adaptation to NK-cell-mediated immune pressure. *Nature* 476: 96-100.
34. An, J., [Zhou, D. S.](#), [Zhang, J. L.](#), [Morida, H.](#), [Wang, J. L.](#), and K. Yasui. 2004. Dengue-specific CD8+ T cells have both protective and pathogenic roles in dengue virus infection. *Immunol. Lett.* 95: 167-174.
35. Teo, T. H., Lum, F. M., Claser, C., Lulla, V., Lulla, A., Merits, A., Rénia, L., and L. F. Ng. 2013. [A pathogenic role for CD4+ T cells during Chikungunya virus infection in mice](#). *J. Immunol.* 190 :259-269.
36. Labadie, K., [Larcher, T.](#), [Joubert, C.](#), [Mannioui, A.](#), [Delache, B.](#), [Brochard, P.](#), [Guigand, L.](#), [Dubreil, L.](#), [Lebon, P.](#), [Verrier, B.](#), et al. 2010. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *J. Clin. Invest.* 120: 894-906.
37. Dung, N. T., Duyen, H. T., Thuy, N. T., Ngoc, T. V., Chau, N. V., Hien, T. T., Rowland-Jones, S. L., Dong, T., Farrar, J., Wills, B., et al. 2010. [Timing of CD8+ T cell responses in relation to commencement of capillary leakage in children with dengue](#). *J. Immunol.* 184: 7281-7287.
38. Guzman, M. G., Alvarez, M., and S. B. Halstead. 2013. [Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection](#). *Arch. Virol.* 158: 1445-1459.
39. Rothman, A. L. 2003. [Immunology and immunopathogenesis of dengue disease](#). *Adv. Virus Res.* 60: 397-419.
40. Fink, J., Gu, F., and S. G. Vasudevan. 2006. [Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever](#). *Rev. Med. Virol.* 16: 263-275.
41. Dupuis-Maguiraga, L., [Noret, M.](#), [Brun, S.](#), [Le Grand, R.](#), [Gras, G.](#), and P. Roques. 2012. Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6: e1446.
42. Deeks, S. G., Lewin, S. R., and D. V. Havlir. 2013. [The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease](#). *Lancet* 382: 1525-1533.
43. [Lühn, K.](#), [Simmons, C. P.](#), [Moran, E.](#), [Dung, N. T.](#), [Chau, T. N.](#), [Quyen, N. T.](#), [Thao, T. T.](#), [Van Ngoc, T.](#), [Dung, N. M.](#), [Wills, B.](#), et al. 2007. Increased frequencies of CD4+ CD25(high) regulatory T cells in acute dengue infection. *J. Exp. Med.* 204: 979-985.

44. Mathew, A., and A. L. Rothman. 2008. [Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis.](#) Immunol. Rev. 225: 300-313.
45. Appay, V., Dunbar, P. R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G. M., Papagno, L., Ogg, G. S., King, A., Lechner, F., Spina, C. A., et al. 2002. [Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections.](#) Nat. Med. 8: 379-385.
46. van Lier, [R. A.](#), [ten Berge, I. J.](#), and L. E. Gamadia. 2003. Human CD8(+) T-cell differentiation in response to viruses. Nat. Rev. Immunol. 3: 931-939.
47. Kurane, I., Matsutani, T., Suzuki, R., Takasaki, T., Kalayanarooj, S., Green, S., Rothman, A. L., and F. A. Ennis. 2011. [T-cell responses to dengue virus in humans.](#) Trop. Med. Health. 39: 45-51.

## Legend Figures

**FIGURE 1.** Activation and differentiation status of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells in CHIKV-, DENV-2- and CHIKV/DENV-2-infected patients. FACS analysis of frequency of **A)** CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells in the CD45<sup>+</sup> lymphocyte gate, **B)** early activation marker CD69 within NK cells, and **C)** NKp30, NKG2A, and CD161 receptors on NK cells. Analysis was performed in 15 Non Infected (NI) Gabonese controls; 5 to 14 CHIKV infected patients; 4 to 7 DENV-2-infected patients, and 3 to 6 co-infected patients, collected in early acute (EA; day (D)0-D3), early late (EA; D5-D15) and convalescence (C; D>30) stages post-symptoms. \* p<0.05, \*\* p<0.001.

**FIGURE 2. Specific** association of KIR2DL expression in CHIKV and DENV-2-infected patients. Frequency of **A)** KIR2DL1 and **B)** KIR2DL2/2DL3 on CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells. Analysis was performed in 15 non-infected (NI) Gabonese controls; 4 to 13 CHIKV-infected patients; 4 to 6 DENV-2-infected patients, or co-infected patients, collected in early acute (EA; day (D)0-D3), early late (EL; D5-D15) and convalescence (C; D>30) stages post-symptoms.\* p<0.05, \*\* p<0.001.

**FIGURE 3.** Persistence of a specific NKG2C<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> NK cell subset in CHIKV-infected patients with high viral load. **(A)** Frequency of NKG2C and CD57 on CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells, in CHIKV, DENV-2 and co-infected patients, collected in early acute (EA; day (D)0-D3), early late (I; D5-D15) and convalescence (C; D>30) stages post-symptoms. NI: non-infected Gabonese healthy controls. **(B)** Frequency of CD57<sup>+</sup> NK cells within NKG2C<sup>+</sup> or NKG2C<sup>-</sup> NK cells. Five, CHIKV, DENV-2 and co-infected patients were analyzed at Day 30 post-symptoms. **(C)** Scatter plot representation of CD57<sup>+</sup> and NKG2C<sup>+</sup> NK cell frequencies collected in early acute (EA; day (D)0-D3) and convalescence (C; D>30) stages post-symptoms in CHIKV-infected patients. Dotted vertical lines represent the baseline levels. **(D)** Correlation between the set point of the viral load quantified during the early acute CHIKV infection and CD57<sup>+</sup> or NKG2C<sup>+</sup> NK cells both assessed during the convalescent phase of infection. Dotted horizontal lines represent the same baseline levels. \* p<0.05, \*\* p<0.001.

**FIGURE 4.** Activation of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T-cells in CHIKV-, DENV-2- and CHIKV/DENV-2-infected patients. Percentage of HLA-DR on CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> or CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-cells within the CD45<sup>+</sup> lymphocyte gate. Analysis was performed in 8 non-infected (NI) Gabonese controls; 3 to 18 CHIKV-infected patients; 4 to 6 DENV-2 infected patients, or co-infected patients, collected in early acute (EA; day (D)0-D12), early late (EL; D25-D40) and convalescence (C; Month>3) stages post-symptoms. \* p<0.05, \*\* p<0.001.

**FIGURE 5.** Differentiation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells from CHIKV, DENV-2 or CHIKV/DENV-2-infected patients. Frequency of CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> naive (T<sub>N</sub>), CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> central memory (T<sub>CM</sub>), and CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> effector memory (T<sub>EM</sub>). Analysis was performed in 8 non-infected (NI) Gabonese controls; 3 to 18 CHIKV infected patients; 4 to 6 DENV-2 infected patients, or co-infected patients, collected in early acute (EA; day (D)0-D12), late acute (LA; D25-D40) and convalescence (C; Month>3) stages post-symptoms. \* p<0.05, \*\* p<0.001.

**SUPPLEMENTAL FIGURE 1.** NK cell activation in CHIKV-, DENV-2- and CHIKV/DENV-2-infected patients. Frequency of HLA-DR, NKp44 and ILT-2 on CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells. Analysis was performed in 15 non-infected (NI) Gabonese controls, 3 to 13 CHIKV-infected patients, 3 to 7 DENV-2-infected patient, and 4 to 5 co-infected patient, collected in early acute (EA; day (D)0-D12), late acute (LA; D5-D15) and convalescence (C; D>30) stages post-symptoms. \* p<0.05.

**SUPPLEMENTAL FIGURE 2.** Distribution of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells within the CD3<sup>+</sup> T cells. Analysis was performed in 4-19 CHIKV-infected patients, 3-18 DENV-2-infected patients, and 4 to 7 CHIKV/DENV-2-infected patients, collected in early acute (EA; day (D)0-D12), late acute (IA; D25-D40) and convalescence (C; Month>3) stages post-symptoms. \* p<0.05.



FIGURE 1

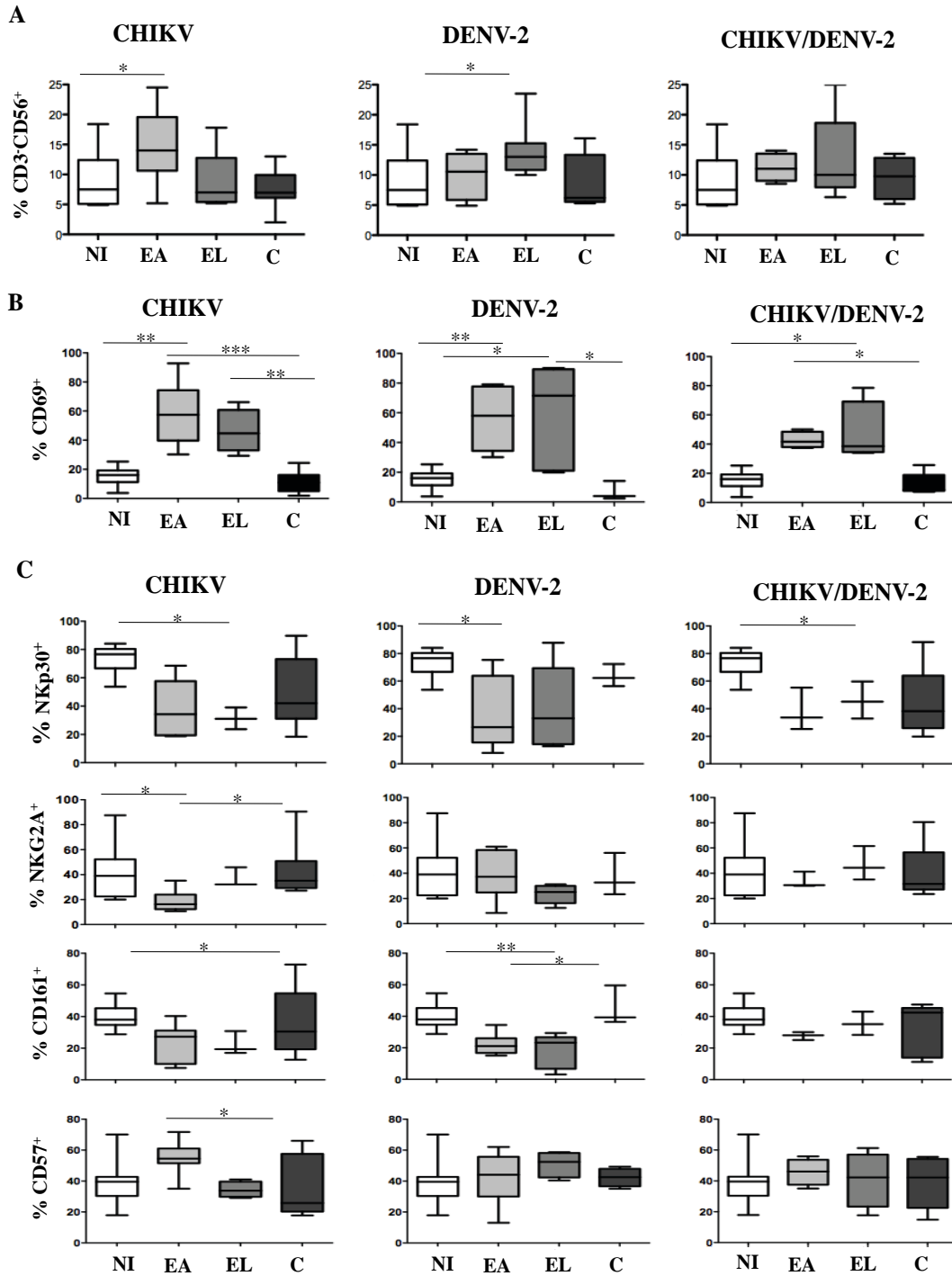


FIGURE 2

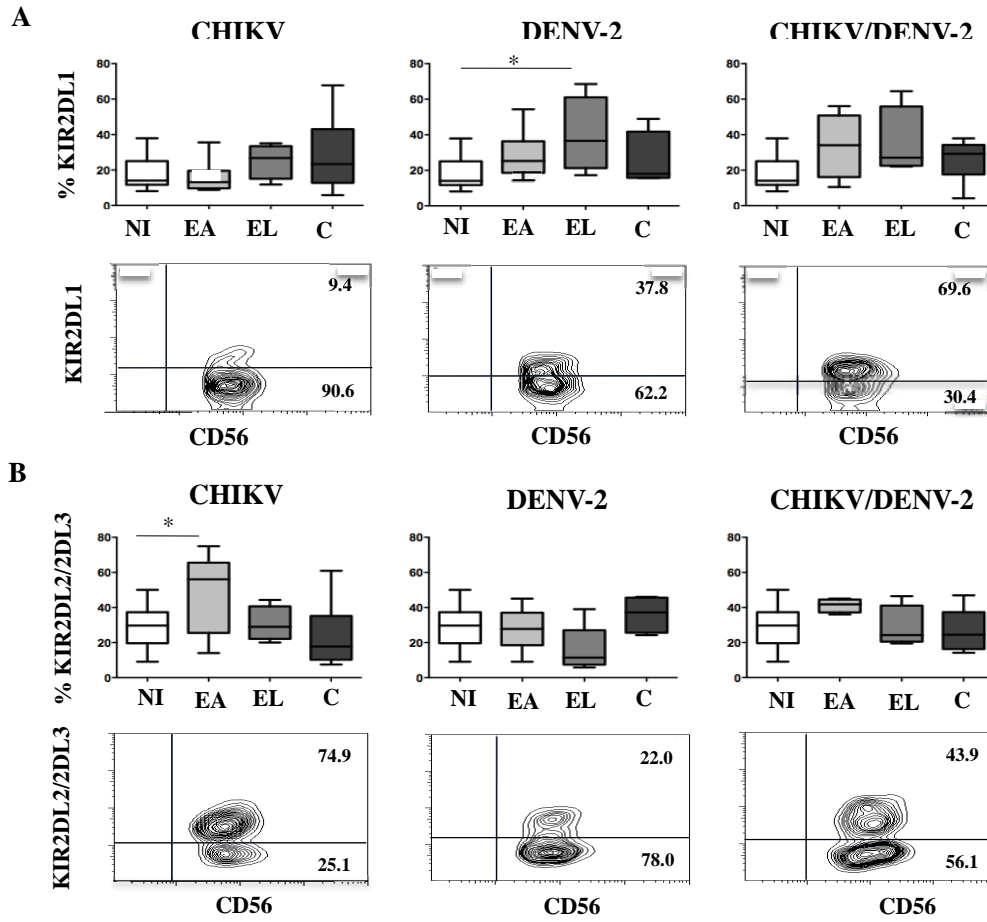
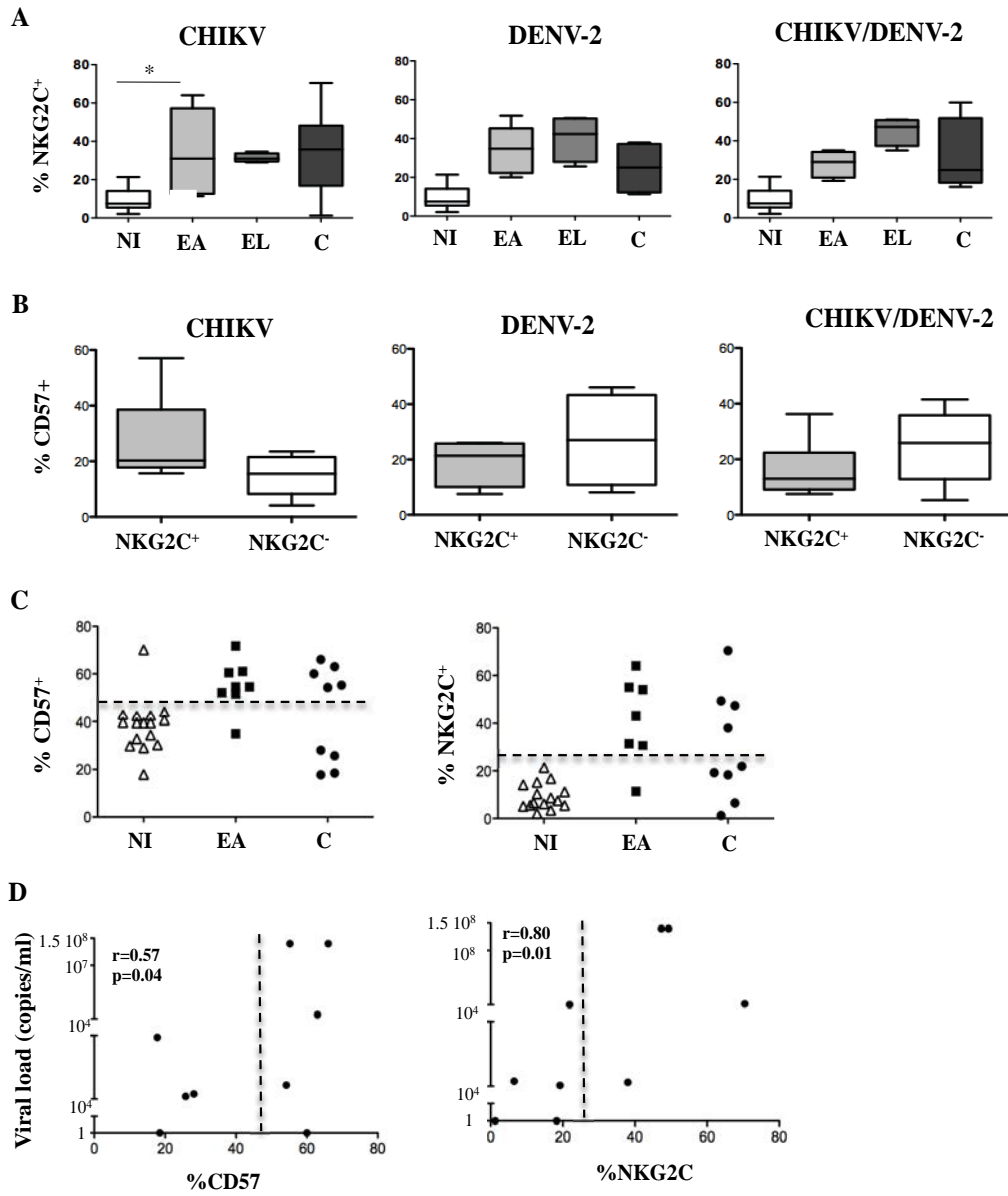


FIGURE 3



**FIGURE 4**

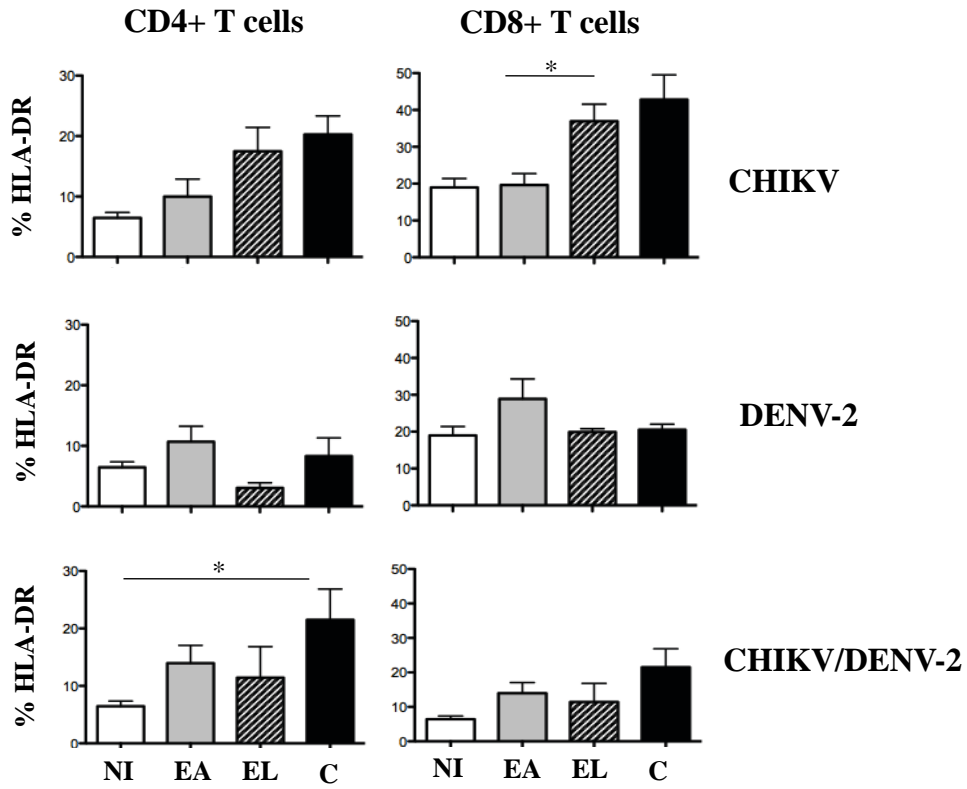
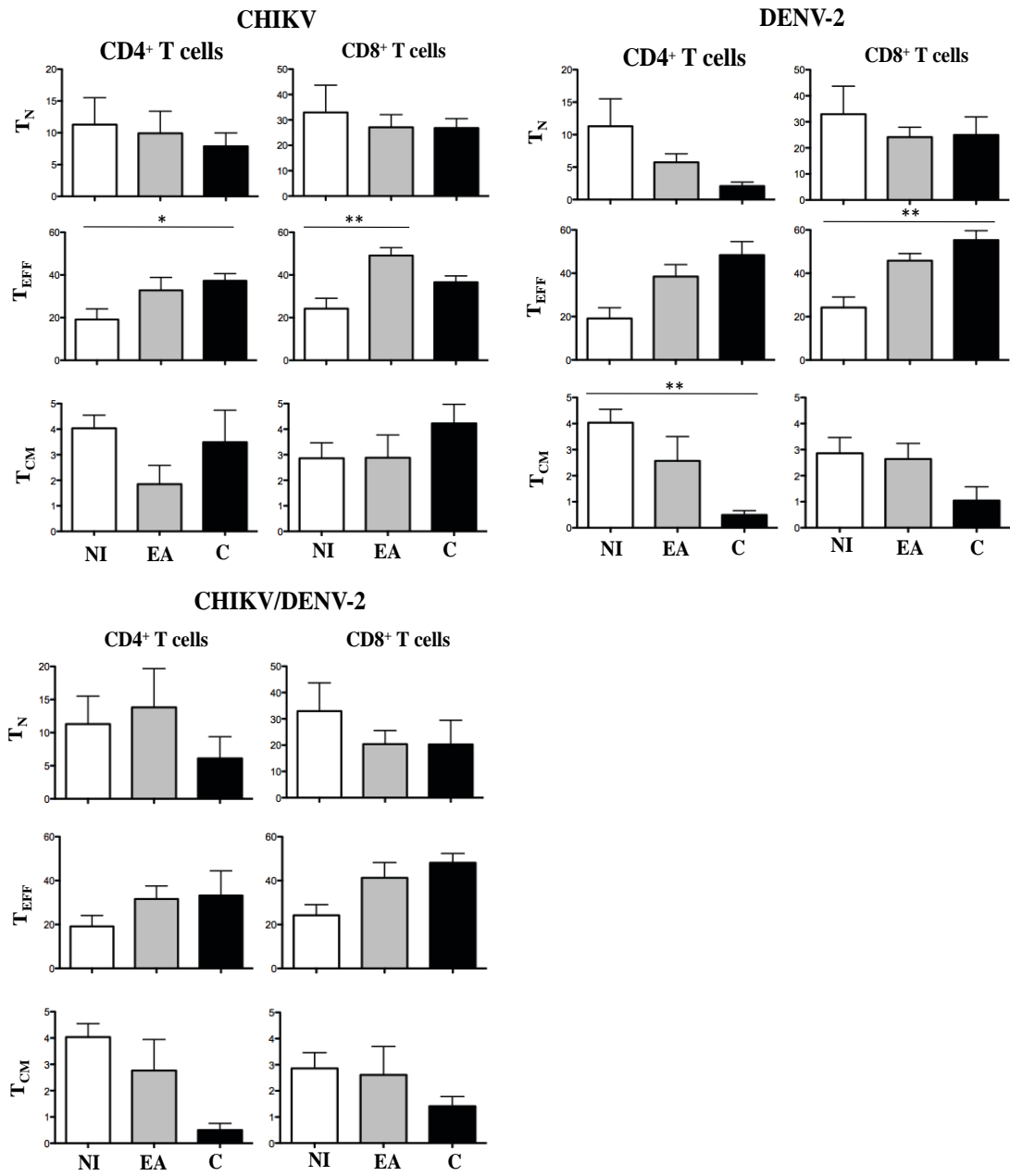
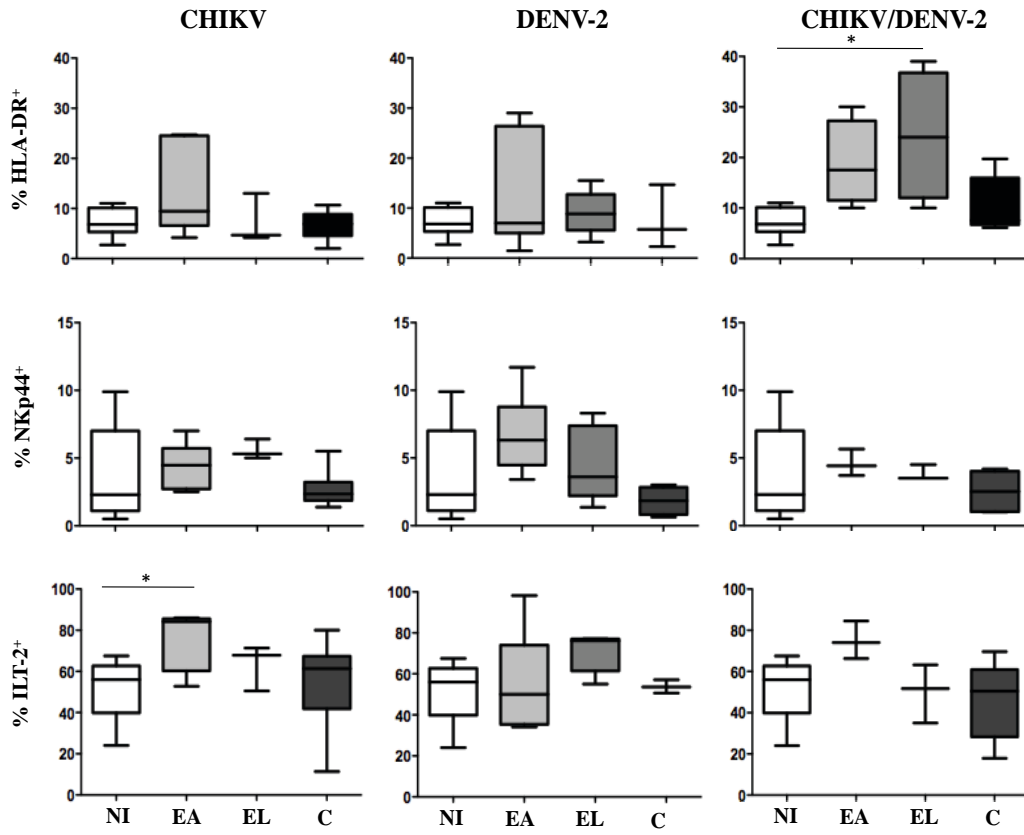


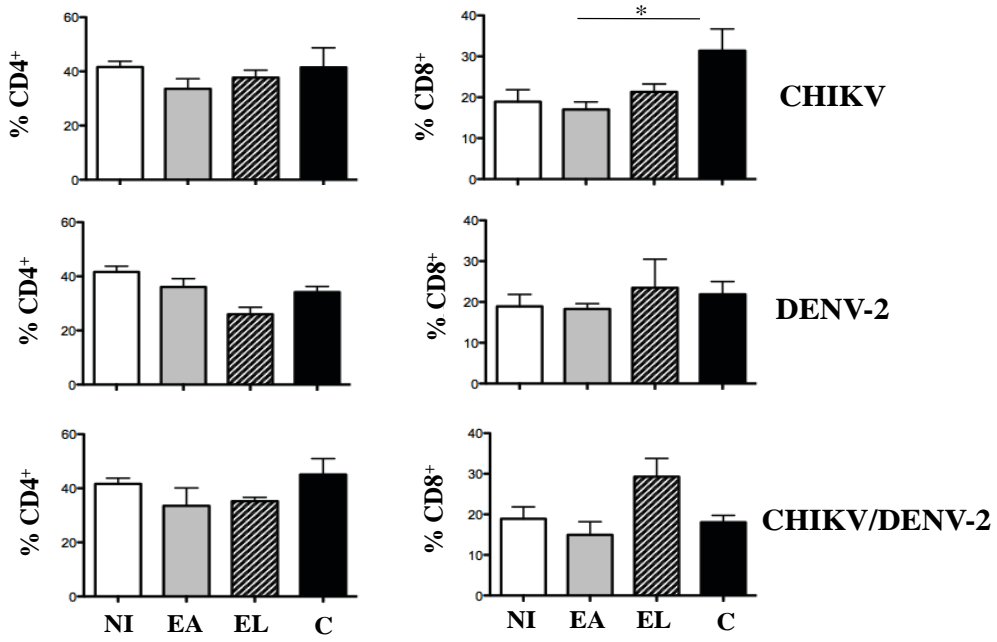
FIGURE 5



Supplemental Figure 1



**Supplemental Figure 2**



**PROJET 2** : Etude génétique de l'association des récepteurs KIRs avec les molécules HLA de Classe-I chez des patients infectés par le CHIKV ou DENV-2.

**Association of HLA Class-I and Inhibitory KIR Genotypes in Gabonese Patients Infected by Chikungunya or Dengue type-2 viruses.**

*Caroline Petitdemange, Nadia Wauquier, Jean-Michel Jacquet, Eric Leroy, Vincent Vieillard.*

**Article soumis à publication**



Les travaux précédents ont mis clairement en évidence des modulations phénotypiques induites par le CHIKV et DENV sur les cellules NK. Au delà des réponses innées, les facteurs génétiques liés à l'hôte peuvent également jouer un rôle déterminant dans le développement d'une réponse immunitaire efficace.

Ce deuxième projet avait pour objectif principal de déterminer l'impact des génotypes KIRs et HLA sur la susceptibilité ou la résistance aux infections par le CHIKV et DENV-2. De nombreux travaux ont montré que les interactions entre les récepteurs KIRs des cellules NK avec leurs ligands, certaines molécules HLA de classe-I, jouent un rôle important dans la susceptibilité ou la résistance par les cellules NK vis-à-vis de différentes infections. Nous avons établi le profil génétique KIR et HLA de patients gabonais infectés par le CHIKV ou le DENV-2 lors de l'épidémie de 2010, en comparaison avec ceux de contrôles gabonais n'ayant pas été infecté par ces virus.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont mis en évidence une influence de l'association KIR/HLA sur la susceptibilité au CHIKV alors que les réponses immunes au DENV semblent être indépendantes d'une association spécifique KIR/HLA. Ces résultats viennent supporter le rôle crucial des cellules NK dans le contrôle de l'infection par le CHIKV.

**Association of HLA Class-I and Inhibitory KIR Genotypes in Gabonese Patients Infected by Chikungunya or Dengue Type-2 Viruses**

Caroline Petitdemange<sup>1,2,3</sup>, Nadia Wauquier<sup>4</sup>, Jean-Michel Jacquet<sup>5</sup>, Ioannis Theodorou<sup>1,2,5</sup>, Eric Leroy<sup>3,6</sup>, Vincent Vieillard<sup>1,2\*</sup>

**1** INSERM, UMR-S 945, Immunité et Infection, F-75013, Paris, France, **2** Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, F-75005, Paris, France, **3** Centre International de Recherches Médicales de Franceville, Unité des maladies Emergentes, Franceville, Gabon, **4** Metabiota Inc., San Francisco, CA and Washington D.C., USA, **5** AP-HP Hôpital Pitié-Salpêtrière, Département d'Immunologie, F-75013, Paris, France, **6** IRD, Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle, Montpellier, France.

\*E-mail: [vincent.vieillard@upmc.fr](mailto:vincent.vieillard@upmc.fr)

**Keywords:** Chikungunya virus, Dengue virus, Natural killer cells, genotype, inhibitory KIR, HLA class-I

## Abstract

**Background:** Natural killer (NK) cells provide defense in the early stages of the immune response against viral infections. Inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) expressed on the surface of NK cells play an important role in regulating NK cell response through recognition of human leukocyte antigen (HLA) class I molecules on target cells. Previous studies have shown that specific KIR/ligand combinations are associated with the outcome of several viral infectious diseases.

**Methods:** We investigated the impact of inhibitory KIR and their HLA-class I ligand genotype on the susceptibility to Chikungunya virus (CHIKV) and Dengue virus (DENV2) infections. From April to July 2010 in Gabon, a large outbreak of CHIKV and DENV2 concomitantly occurred in two provinces of Gabon (Ogooué-Lolo and Haut-Ogooué). We performed the genotypic analysis of inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) in the combination with their cognate HLA-class I ligands in KIR and HLA class I genotypes for 73 CHIKV and 55 DENV2 adult cases, and compared them with 54 healthy individuals.

**Results:** We found that the combination of KIR2DL1 and its cognate HLA-C2 ligand was significantly associated with the susceptibility to CHIKV infection. In contrast, no other inhibitory KIR-HLA pairs showed an association with the two mosquito-borne arboviruses.

**Conclusion:** These observations are strongly suggestive that the NK cell repertoire shaped by the KIR2DL1:HLA-C2 interaction facilitate specific infection by CHIKV.

## Introduction

Chikungunya virus (CHIKV) and Dengue virus (DENV) are two mosquito-borne arboviruses transmitted by the *Aedes* genus. The diseases caused by these viruses have much in common in terms of symptoms, incubation period, clinical course, and symptomatic treatments. Both viruses have been recently proven responsible for major outbreaks leading to serious health and economical problems, and the rapid geographical expansion of their vector could potentially lead to a worldwide increased risk within non-immune populations [1,2]. However, unlike CHIKV, DENV strains are divided into four different serotypes (DENV1 to DENV4), which only confer short-term partial cross-protection against other strains, and contribute to the development of severe forms of Dengue fever (Dengue haemorrhagic fever/Dengue shock syndrome) [3]. Through active surveillance of acute febrile syndrome in Gabon, CHIKV and serotype 2 DENV (DENV2) were detected between 2007 and 2010, and have caused together a large simultaneous outbreak centered on Franceville in southeast Gabon in 2010 [4].

Although natural killer (NK) cells hold a central role early after number of viral infections, not only for viral containment but also for timely and efficient induction of adaptive responses, their role in the control of CHIKV and DENV2 infections is still poorly documented [5,6]. NK cells are controlled by a combination of activating and inhibitory receptors, and the integration of signals induced upon ligation of these receptors determines whether they become activated. These receptors include the inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR). KIRs are encoded by a family of highly polymorphic genes and individual KIR haplotypes differ in number and identity of genes [7]. Expression of KIR receptors is very complex and controlled by a stochastic mechanism that shuts off expression of some receptors and not others in individual cells thereby allowing different NK cell clones to recognize different targets [8]. It is therefore unlikely for two unrelated individuals to share the same KIR genes or haplotypes and express the receptors. The KIR receptors are type I integral membrane glycoproteins that are usually expressed on the cell surface as monomers. The KIR receptors are named according to the number (i.e. 2 or 3) of Ig-like domains present in the extracellular region as well as the length (i.e. L: long or S: short) of their cytoplasmic tails. KIR bind polymorphic major histocompatibility complex (MHC) class-I molecules; in particular: KIR2DL1/KIR2DL2 and KIR2DL3 bind group 2 (C2) and group 1 (C1) HLA-C alleles, respectively, whereas, KIR3DL1 recognizes HLA-Bw4 epitopes [8]. Besides their role in inhibiting NK cell function, combinations of

KIR and HLA molecules also play an essential role during NK education. Indeed functional maturation of NK cells requires specific interaction with MHC class I molecules [9]. However, MHC class I genes map to chromosome 6 whereas KIR genes map to chromosome 19 [7]. Therefore, the inheritance of each group of genes and the expression of the receptors and their ligands are physically independent of one another. It has become increasingly clear that the strength of KIR-HLA interactions has functional significance, and can influence the susceptibility to or the outcome of various infectious diseases, as previously shown for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and hepatitis C virus (HCV) [10,11], yet no such associations have been uncovered in the context of CHIKV and DENV infections. Therefore, this study was undertaken to determine the impact of inhibitory KIR and their HLA-class I ligand genotype on the susceptibility to CHIKV and DENV2 infections.

## **Materials and Methods**

### Ethics statement

The research we report here was conducted in accordance with the principals expressed in the Declaration of Helsinki and was approved by the relevant French and Gabonese institutional ethics panels. Following the 2007 Gabon outbreak, the public-health response was based on cooperation between the Gabonese Ministry of Health (MoH) and 'Centre International de Recherches Médicales de Franceville' (CIRMF). The study was approved by an Institutional Review Board ('Conseil Scientifique du CIRMF') and approved by the Regional Health Director. All eligible participants were aged  $\geq 18$  years provided informed consent, but given the urgency of diagnosis and according to the MoH directives; only individual oral consent was required for sampling. The institutional review board of the Pitié-Salpêtrière Hospital (Comité de Protection des personnes, Ile-de-France, Paris, France) also approved this study.

### Study population

Peripheral blood samples from 73 CHIKV-infected, and 55 DENV-2-infected patients were obtained during the simultaneous outbreak of CHIKV and DENV-2, which occurred in two provinces (Ogooue Lolo and Haut Ogooue) of southeast Gabon, between April and July 2010. Peripheral blood samples were collected on suspected adult cases during the first five days after the following symptoms: fever ( $>38.5^{\circ}\text{C}$ ), arthralgias, myalgias, headaches, rash, fatigue, nausea, vomiting, diarrhea or bleeding. Patients who met the case definition were sampled and tested for various arboviral RNA

genomes, as described [4]. Diagnosis for CHIKV or DENV fevers was confirmed by using quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). A partial envelope (E1) gene sequence of CHIKV (692 bp, position 10 138–10 829 nt) and a partial envelope (E) gene sequence of DENV-2 (758 bp, position 1503–2260 nt) were amplified as previously described [4,5]. Each sample was negative for Yellow, West Nile and Rift Valley fevers, or malaria. As controls, 54 Gabonese healthy individuals were selected to match for origin, age and sex [12].

#### KIR and HLA genotyping

DNA was extracted from whole blood using QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen). Inhibitory KIR genotyping was performed by PCR using the KIR typing kit (Miltenyi Biotec, Inc) following manufacturer's instructions, as previously performed [12]. HLA-Class I alleles were hybridized using LABType SSO kit (One Lambda). HLA sequences were read with a LABScan 200 (Luminex Technology) and computer-assisted HLA Fusion software.

#### Statistical analysis

Fisher's exact test was used to compare results between healthy control and CHIKV<sup>+</sup> or DENV<sup>+</sup> patients. The P values of statistically significant differences were then corrected, by the formula  $P^n=1-(1-P)^n$ , where n is the number of comparisons [13].

## Results and Discussion

We studied variations in inhibitory KIR polymorphic CMH class I genotypes and associations in CHIKV-, DENV2-infected patients and healthy individuals from Gabon. Initial analysis of the inhibitory KIR locus has identified 17 different haplotypes [14,15]. Table 1 shows that the number of inhibitory KIR genes in the different groups of patients studied here varied from four to seven in each individual, with only KIR3DL3, being detectable in all haplotypes. The frequency of individuals presenting one particular haplotype including all inhibitory KIR genes (h1) was significantly higher in healthy individuals with 40% of carriers compared to 16.6% in CHIKV<sup>+</sup> (p=0.021, Odds ratio (OR)=3.29) and to 20% in DENV2<sup>+</sup> (p=0.460; OR=2.65) patients. This reflects increased variability of haplotypes and a loss of inhibitory KIR in both CHIKV<sup>+</sup> (n=17) and DENV2<sup>+</sup> (n=13) patients, compared with the healthy controls (n=5). Similarly, all healthy individuals possess the framework genes (KIR2DL4, KIR3DL2 or KIR3DL3) [16] whereas 8.3 % (h15-17) of CHIKV<sup>+</sup> patients and 2.9 %

(h11) of DENV<sup>+</sup> patients lack at least one of these genes (Table 1). This finding is biologically relevant to the studies showing that the NK cells lacking inhibitory receptors for self-MHC class I molecules could be hyporesponsive [17], and suggests that the loss of inhibitory KIR could be associated with an increased susceptibility to CHIKV and/or DENV infection.

We next compared individual inhibitory KIR genotypes in healthy volunteers to patients infected with CHIKV or DENV2. Percentages of KIR gene carriers in the Gabonese control samples (Table 2) were in accordance to other African cohorts [18,19]. However, we found that the proportion of KIR2DL1 gene carriers significantly decreased amongst CHIKV<sup>+</sup> ( $p^n=0.008$ ), compared to the DENV2<sup>+</sup>-infected patients, which remained similar to Gabonese healthy controls. This genetic data is consistent with the significant cell-surface phenotypic down-modulation of KIR2DL1 inversely associated with the viral load, that we have previously observed in acute CHIKV-infection [5], whereas KIR2DL1 expression slightly increased in DENV2<sup>+</sup> patients (Petitdemange *et al.*, Manuscript in preparation). In contrast, KIR3DL1 gene was found to be significantly less frequent in patients infected by CHIKV or DENV2 ( $p^n<0.0001$ , and  $p^n=0.0016$ , respectively) than in controls, suggesting a potential role for KIR3DL1 in both infections, as previously observed for HIV-1 [20].

Since the interactions between inhibitory KIR and their ligands are essential to control of NK cell function, we next evaluated the frequency of KIR genes in combination with the genes encoding their respective ligands in the same patients. It is noteworthy that all Gabonese individuals, whatever their infectious status, had similar HLA-Bw4 genetic profiles (Figure 1A) which is consistent with what was observed in other African cohorts [21]. However an increased frequency of HLA-B\*44, an HLA-Bw4 allele, was recently associated with DENV3 severity in Brazilians [22]. This discrepancy suggests possible differences between the DENV serotypes and/or variations due to ethnicity. HLA-Bw4 (and not Bw6) allotypes serve as ligands for KIR3DL1 subtypes and subtypes are defined by amino-acid variations at positions 77–83 of the HLA-B molecules [7]. Table 2 shows similar proportions of HLA-Bw4 allele amongst KIR3DL1<sup>+</sup> samples, whatever the study group. HLA-Bw4 molecules are further divided into two groups on the basis of whether isoleucine (Ile) or threonine (Thr) residues are present at position 80, defining HLA-Bw4-80Ile and Bw4-80Thr, respectively [23]. Receptor-binding and lysis-inhibition data suggest that HLA-Bw4-80Ile molecules are more effective ligands for KIR3DL1 than HLA-Bw4-80Thr [24]. Figure 1A shows that Bw4-80Ile alleles are significantly more common in CHIKV ( $p=0.0156$ ) and DENV2-infected ( $p=0.0372$ ) patients than in healthy controls. We examined the combination of

Bw4-80Ile and KIR3DL1 in the context of sensitivity to CHIKV or DENV2 infection, and observed a remarkable association in patients infected by either viruses, with 100 % ( $p=0.0003$ ) in CHIKV<sup>+</sup> samples and 92.8 % ( $p=0.0021$ ) in DENV2<sup>+</sup> samples, compared to 66.7% in healthy controls (Table 2). This genetic combination, between KIR3DL1 and Bw4-80Ile, was previously described for HIV-1 in association with disease severity [25]. However, the absence of significant phenotypic modulation of KIR3DL1 expression after acute CHIKV [5] and DENV2 (Petitdemange *et al.*, Manuscript in preparation) infections, suggests that the KIR3DL1:Bw4-80Ile combination is not directly responsible for the observed virus susceptibility, but the allele Bw4-80Ile could rather be a marker of a haplotype that contains a disease locus.

HLA-C molecules are also dichotomized into two groups, based on their KIR specificity; HLA-C group 1 (C1) specifically bind to KIR2DL2/DL3 and HLA-C group 2 (C2) bind to KIR2DL1 [8]. The genetic combination of KIR2DL2/DL3 and HLA-C1 genes remained similar in infected and healthy Gabonese yet we have previously reported a clonal expansion of NK cells that co-express activating CD94/NKG2C and inhibitory KIR2DL2/DL3 receptors in direct association with the viral load during acute CHIKV-infection [5]. The combination of KIR2DL2/DL3 with HLA-C1 might therefore not be involved in susceptibility to CHIKV infection but the observed expansion of NK cells expressing these receptors suggests that this interaction is of importance during the development of the disease. For example, KIR2DL2/DL3:HLA-C1 interaction could be associated with the delayed progression to the development of persistent chronic inflammation in CHIKV-infected patients. Importantly, a significant increase in frequency of HLA-C2 was observed in CHIKV-infected patients ( $p=0.0068$ ), mainly of HLA-C2 homozygous subjects, compared to DENV<sup>+</sup> patients and controls (Figure 1B). More intriguingly, this HLA-C2 increased effect was also significantly observed in combination with KIR2DL1 ( $p=0.0042$ ; OR=4.2) (Table 2). In this regard, however, it cannot be ruled out that these results were influenced by population demographic history; these results will need to be confirmed through the study of samples collected from other ethnic groups. Notably, this data highlights that CHIKV infection could be influenced by KIR2DL1/HLA-C2 interplay. Consistent with this notion we have previously shown a depletion of KIR2DL1<sup>+</sup> cells early after CHIKV infection, inversely associated with the viral load [5].

The finding that inhibitory interactions are protective against a viral infection initially seems counterintuitive. However, NK cells are held in check by their inhibitory receptors as originally proposed by the 'missing-self hypothesis' and loss of these interactions could be a key mechanism to allow NK cell activation [26]. *In vitro* studies



with autologous influenza infected targets have shown that NK cells from individuals with KIR2DL3:HLA-C1 were activated more rapidly than those with KIR2DL1:HLA-C2 [27]. Consistently we previously showed that the KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell depletion was associated with an expansion of KIR2DL2/DL3<sup>+</sup> NKG2C<sup>+</sup> cells after acute CHIKV infection [5]. In summary, we can hypothesize that the expansion of highly functional NK cells and the development of a strong adaptive memory response, as previously described [5,28], are independent of a specific KIR/HLA pathway in DENV infection, but certainly associated to an interplay between KIR2DL1 and HLA-C2 in response to CHIKV infection. This study is an interesting first step towards understanding the role of inhibitory KIR and their specific ligands in CHIKV and DENV2 infections. However, further studies looking at groups of patients from different ethnic origin associated with detailed clinical data will be necessary to be able to draw further conclusions as to the role of these receptors and ligands in the context of susceptibility to these infections or in the development of the disease and chronic or hemorrhagic symptoms.

## Acknowledgments

We thank Philippe Engandja from CIRMF (Franceville, Gabon) for technical assistance.

## References

1. Pialoux G, Gauzere BA, Jaureguiberry S, Strobel M (2007) Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis* 7: 319–327.
2. World Health Organization. Fact sheet no. 117: dengue and dengue haemorrhagic fever. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Accessed 2009.
3. Fried JR, Gibbons RV, Kalayanarooj S, Thomas SJ, Srikiatkachorn A, *et al* (2010) Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS Negl Tro Dis* 4: e617.
4. Caron M, Paupy C, Grard G, Becquart P, Mombo I, *et al* (2012) [Recent introduction and rapid dissemination of Chikungunya virus and Dengue virus serotype 2 associated with human and mosquito coinfections in Gabon, central Africa](#). *Clin Infect Dis* 55: e45-53.
5. Petitdemange C, Becquart P, Wauquier N, Béziat V, Debré P, *et al* (2011) [Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity](#). *PLoS Pathog* 7: e1002268.
6. Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, *et al* (2006) [NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease](#). *Clin Exp Immunol* 143: 345-356.
7. [Kulkarni S, Martin MP, Carrington M](#) (2008) The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol* 20: 343-352.
8. Lanier LL (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23: 225–274.
9. Anfossi N, André P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, *et al* (2006) [Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I](#). *Immunity* 25: 331-342.
10. [Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, et al](#) (2004) HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305: 872-874.
11. Martin MP, Qi Y, Gao X, Yamada E, Martin JN, *et al* (2007) Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Gen* 39: 733-740.

22. Wauquier N, Padilla C, Becquart P, Leroy E, Vieillard V (2010) [Association of KIR2DS1 and KIR2DS3 with fatal outcome in Ebola virus infection.](#) Immunogenetics 62: 767-771.
13. Svejgaard [A](#), Ryder [LP](#) (1994) HLA and disease associations: detecting the strongest association. Tissue Antigens 43: 18-27.
14. Martin MP, Single RM, Wilson MJ, Trowsdale J, Carrington M (2009) [KIR haplotypes defined by segregation analysis in 59 Centre d'Etude Polymorphisme Humain \(CEPH\) families.](#) Immunogenetics 61: 79.
15. Hollenbach JA, Nucedal I, Ladner MB, Single RM, Trachtenberg EA (2012) [Killer cell immunoglobulin-like receptor \(KIR\) gene content variation in the HGDP-CEPH populations.](#) Immunogenetics 64:719-737.
16. Vilches C, Parham P (2002) KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. Annu Rev Immunol 20: 217-251.
- 17. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Song YJ, et al (2005) Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules.** Nature **436: 709–713.**
18. [Norman PJ](#), [Carrington CV](#), [Byng M](#), [Maxwell LD](#), [Curran MD](#), *et al* (2002) Natural killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) locus profiles in African and South Asian populations. Genes Immunol 3: 86-95.
19. Denis L, Sivula [J](#), [Gourraud PA](#), [Kerdudou N](#), [Chout R](#), *et al* (2005) Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Réunion. Tissue Antigens 66: 267-276.
19. Deeks SG, McVicar DW, Carrington M (2007) [Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1.](#) Nat Gen 39: 733-740.
21. Paximadis M, Mathebula TY, Gentle NL, Vardas E, Colvin M, *et al* (2012) [Human leukocyte antigen class I \(A, B, C\) and II \(DRB1\) diversity in the black and Caucasian South African population.](#) Hum Immunol 73: 80-92.
22. [Xavier Eurico de Alencar L](#), [de Mendonça Braga-Neto U](#), [José Moura do Nascimento E](#), [Tenório Cordeiro M](#), [Maria Silva A](#), *et al* (2013) HLA-B\*44 is associated with Dengue severity caused by DENV-3 in a Brazilian population. J Trop Med 2013: 648475.
23. Müller CA, Engler-Blum G, Gekeler V, Steiert I, Weiss E, *et al* (1989)

Genetic and serological heterogeneity of the supertypic HLA-B locus specificities Bw4 and Bw6. *Immunogenetics* 30: 200–207.

24. Carr WH, Pando MJ, Parham P (2005) KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand. *J Immunol* 175: 5222–5229.

25. Parham P (2005) [MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival](#). *Nat Rev Immunol* 5: 201-214.

26. Ljunggren HG, Kärre K (1990) [In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition](#). *Immunol Today* 11: 237-244.

27. Ahlenstiel G, Martin MP, Gao X, Carrington M, Rehermann B (2008) Distinct KIR/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses. *J Clin Invest* 118: 1017-1026.

28. Wauquier N, Becquart P, Nkoghe D, Padilla C, Ndjoi-Mbiguino A, *et al* (2011) [The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation](#). *J Infect Dis* 204: 115-123.

### Figure Legends

**Figure 1. Allele frequency for HLA-B Bw4 (A) and HLA-C (B) subtypes in Gabonese individuals.** The frequency of each variable is shown for non-infected controls (open bars), CHIKV-infected patients (hatched bars), and DENV2-infected patients (closed bars). Frequencies of HLA subtypes within each group of patients were compared using the Fisher's exact test. \*P <0.05; \*\*P<0.001; \*\*\*P<0.0001.

**Table 1.** Diversity of the inhibitory KIR haplotypes in CHIKV and DENV2-infected patients compared with healthy controls from the same origin.

	Inhibitory KIRs								Frequency		
	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	3DL1	3DL2	3DL3	Ctl	CHIKV	DENV
h1	■	■	■	■	■	■	■	■	0.400	0.166	0.200
h2	■	■	■	■	■	■	■	■	0.218	0.222	0.314
h3	■	■	■	■	■	■	■	■	0.200	0.055	0.086
h4	■	■	■	■	■	■	■	■	0.127	0.028	0.086
h5	■	■	■	■	■	■	■	■	0.054	0.055	0.086
h6	■	■	■	■	■	■	■	■	0.000	0.083	0.086
h7	■	■	■	■	■	■	■	■	0.000	0.083	0.000
h8	■	■	■	■	■	■	■	■	0.000	0.028	0.057
h9	■	■	■	■	■	■	■	■	0.000	0.055	0.000
h10	■	■	■	■	■	■	■	■	0.000	0.055	0.000
h11	■	■	■	■	■	■	■	■	0.000	0.000	0.029
h12	■	■	■	■	■	■	■	■	0.000	0.028	0.029
h13	■	■	■	■	■	■	■	■	0.000	0.028	0.029
h14	■	■	■	■	■	■	■	■	0.000	0.028	0.000
h15	■	■	■	■	■	■	■	■	0.000	0.028	0.000
h16	■	■	■	■	■	■	■	■	0.000	0.028	0.000
h17	■	■	■	■	■	■	■	■	0.000	0.028	0.000

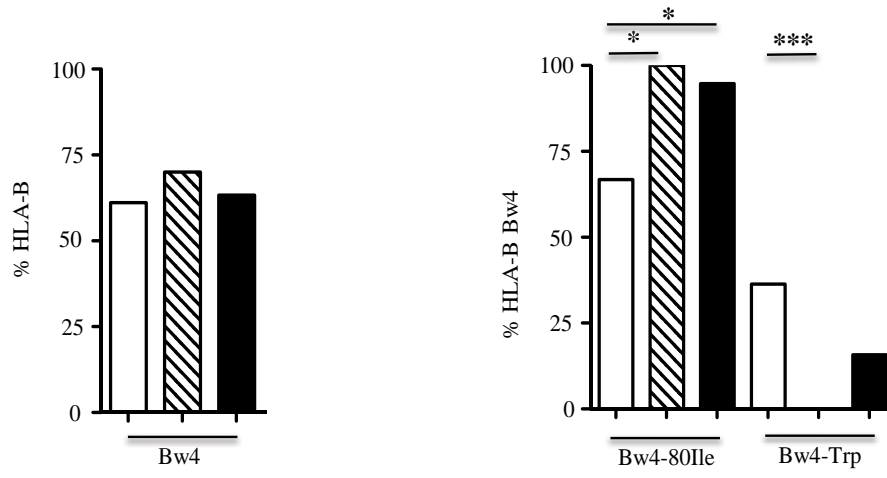
Presence of a gene is indicated with a grey box. h: haplotype

**Table 2.** KIR genotypes and HLA ligand combinations in CHIKV and DENV2-infected patients compared with healthy controls from the same population.

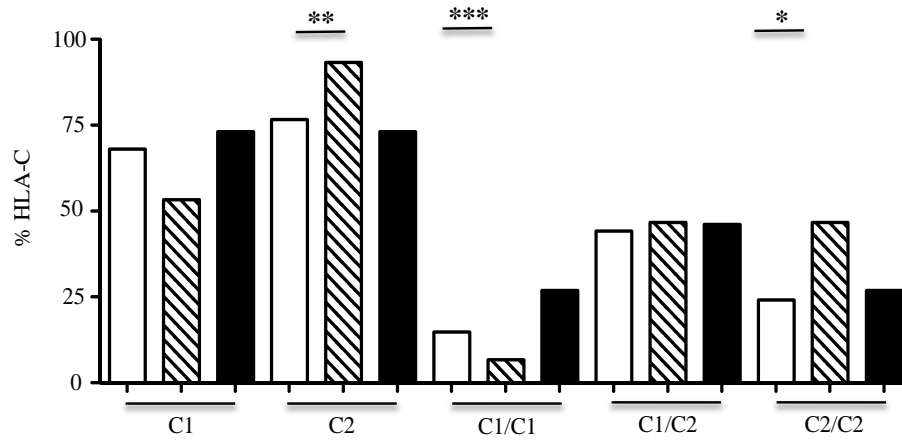
	Control (n=54)	CHIKV <sup>+</sup> (n=73)			DENV2 <sup>+</sup> (n=55)		
	%	%	p	p <sup>n</sup>	%	p	p <sup>n</sup>
<b>KIR genotype</b>							
2DL1	100	86.1	0.001	0,008	100	ns	
2DL2	64.8	55.6	ns		54.2	ns	
2DL3	79.6	72.2	ns		82.9	ns	
2DL4	100	97.2	ns		97.1	ns	
2DL5	72.2	52.8	ns		57.1	ns	
3DL1	100	55.5	<0.0001	<0.0001	74.3	0.0002	0,0016
3DL2	100	100	ns		100	ns	
3DL4	100	100	ns		100	ns	
	Control (n=47)	CHIKV <sup>+</sup> (n=27)			DENV2 <sup>+</sup> (n=26)		
	%	%	p	p <sup>n</sup>	%	p	p <sup>n</sup>
<b>KIR-HLA associations</b>							
2DL1 : C2	75.6	92.9	0.0042	0,0125	73.1	ns	
2DL2/2DL3 : C1	68.1	50.0	ns		73.1	ns	
3DL1 : Bw4	70.2	68.4	ns		58.3	ns	
<b>KIR3DL1-HLA-Bw4 subtype associations</b>							
3DL1 : Bw4-80Ile	66.7	100	0.0003	0,0006	92.8	0.0021	0,0042
3DL1 : Bw4-80Thr	36.4	0	0.05	ns	21.4	ns	

P: Fisher exact test; P<sup>n</sup>: The P values of statistically significant differences were then corrected by the formula  $P^n = 1 - (1 - P)^n$ , where n is the number of comparisons [13].

**A**



**B**





**PROJET 3:** Etude *in vitro* des cellules dendritiques infectées par le DENV-2 ainsi que des interactions entre les cellules NK et les cellules dendritiques après infection.

**Complex interactions between Dengue virus serotype-2 infected Dendritic cells and Natural killer cells**

*Caroline Petitdemange, Juliana Rey, Eric Leroy, Vincent Vieillard.*

**Article en préparation**

De nombreux travaux ont mis en évidence l'importance des interactions entre les cellules NK et les DCs au cours de certaines réponses immunes où une activation bidirectionnelle est mise en place : les cellules NK jouent un rôle majeur dans l'activation et la maturation des DCs et en retour, les DCs sécrètent de nombreuses cytokines pouvant initier la prolifération et l'activation des fonctions des cellules NK.

L'objectif principal de ce projet a été de caractériser les interactions entre les cellules NK et les DCs après une infection *in vitro* par le DENV-2. Les DCs sont l'une des premières cibles du virus et semblent jouer un rôle majeur au cours de cette infection. Dans un premier temps, nous avons caractérisé les modulations induites par le DENV-2 sur les DCs en étudiant l'expression des ligands des récepteurs des cellules NK exprimés ou non à la surface des DCs. Pour cela, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de DCs dérivées des monocytes infectées par le DENV-2. A partir de ce modèle, nous avons mis en place des co-cultures NK/DCs autologues afin de réaliser des études de la polyfonctionnalité des cellules NK par une mesure de leur cytotoxicité et de leur production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  en présence de DCs autologues infectés.

## **Natural Killer / dendritic cell cross-talk during Dengue virus serotype-2 infection**

Caroline Petitdemange, Juliana Rey, Eric Leroy, Vincent Vieillard

### **Introduction**

Dengue is the most widespread arboviral illness worldwide, with an estimated 50-100 million infections annually in more than 100 countries (*Bäck AT, 2013 Infect ecol Epidemiol*). The clinical picture is highly variable, ranging from asymptomatic to mild acute febrile illness, the classical dengue fever (DF) or to the life-threatening dengue hemorrhagic fever (DHF) generally associated with secondary infection with a heterotypic serotype (*Halstead SB, 2007 Lancet; Guzman MG, 2013 Arch Virol; Mathew A, 2008 Immunol Rev*).

Dengue is transmitted to humans by *Aedes* mosquitoes. Following transmission of the dengue virus (DV) through a bite of an infected mosquito, endothelial cells and hematopoietic cells residing in the epidermis are the first targets of the virus. Several studies supported also that myeloid dendritic cells (DCs) residing in the epidermis and dermis (Langerhans cells) are a predominant target cells. They demonstrated that myeloid DCs are more permissive to DV compared to monocytes and macrophages (*Marovich M, 2001 J Investing Dermatol Symp Proc; Martinez-Betancur V, 2013 J Med Virol; Sun P, 2013 ScientificWorldJournal*). DCs are antigen-presenting cells, essential for the induction of immune responses. Tissue-resident immature DCs (iDCs) sense infection through pattern recognition receptors. DC-SIGN (CD209), a C-type lectin receptor specifically expressed on DCs, mediates DV entry in DCs allowing productive infection (*Tassaneeritthep B, 2003 JEM; Navarro-Sanchez ER, 2003 EMBO Rep*). Upon infection, iDCs undergo phenotypic and functional maturation allowing their migration to secondary lymphoid organs where they prime T-cells (*Banchereau J, 1998 Nature; Pulendran B, 2001 Science*).

Mounting evidence displays that DCs interact also with innate immune system. Among the innate immune cells involved in modulating DC activity, Natural Killer (NK) cells have received much attention over the past decade (*Walzer T, 2006 Blood*). NK cells are an important component of the innate immunity, activated early during the course of DV infection (*Jost S, 2013 Annu Rev Immunol; Azeredo EL, 2006 Clin Exp*

**Immunol**). Immune-regulatory and cytolytic functions of NK cells are controlled by a sophisticated repertoire of activating and inhibitory NK receptors that allow them to distinguish between normal cells and infected cells. A critical threshold of signalling that exceeds the counterbalancing influence of the inhibitory receptors must be reached by the activating receptors in order for NK cells to mount a productive response. These activating receptors include NKG2C, NKG2D, DNAM-1 and the natural receptors NKp30, NKp44 and NKp46. Three types of NK-inhibitory receptors have been identified: the killer cell immunoglobulin (Ig)-like receptor (KIR) family, the C-type lectin family and the Ig-like leukocyte Ig-like receptor (LIR) family (**Lanier LL, 2008 Nat Immunol**). Interestingly, it has been shown that DCs and other Flaviviruses are able to up-regulate cell surface expression of MHC class-I expression, which are ligands of inhibitory KIR receptors, indicating a possible mechanism for immune evasion (**Lobigs M, 2003 Immunol cell Biol; Orange JS, 2002 Nat Immunol**).

Numbers of recent studies highlighted a bi-directional activation between NK cells and DCs. NK cells play a central role in alerting DCs and promoting their functional maturation, whereas DCs secrete a variety of cytokines that potentiate the proliferative and functional activity of NK cells (**Cooper MA, 2004 Trends in Immunology; Moretta A, 2005 Curr Opin Immunol**). In this study, we investigated the *in vitro* relevance of NK and DCs cross-talk following DV infection.

## **Materials and Methods**

### *Cell isolation and generation of monocyte-derived DCs*

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque. Healthy donors were obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS, Pitié-Salpêtrière hospital, Paris, France). Monocytes were obtained by negative selection using the pan-monocytes isolation kit (Miltenyi Biotec) and were subsequently cultured for 6 days in RPMI supplemented with IL-4 (20 ng/ml; Miltenyi Biotec) and GM-CSF (50 ng/ml; Miltenyi Biotec). iDC phenotype was checked for the presence CD1a and CD86 and the absence of CD14 expression. Autologous NK cells were purified by negative selection using the NK cell isolation kit (Miltenyi Biotec) (routinely purity >98 %), and then were cultured in RPMI supplemented with 1000 IU/ml of Proleukin-2 (Chiron) during iDCs differentiation.

### *Flow cytometry*

DCs were analysed after staining with an appropriate antibody cocktail: PE-Cy7-conjugated anti-CD83 (HB15e), V450-conjugated anti-CD86 (2331 FUN-1), APC-conjugated anti-CD80 (16-10A1), APC-conjugated anti-CD209 (DCN46), APC-conjugated anti-CD1a (HI149), APC-HLA-A,B,C (G46-2.6), PE-conjugated anti-CD40 (5C3) from Becton Dickinson; ECD-conjugated anti-HLA-DR (Immu-357), PB-conjugated anti-CD16 (3G8), KO-conjugated anti-CD45 (J33) from Beckman coulter; Alexa-Fluor-700-conjugated anti-CD11b (CBRM1/5), Alexa-Fluor-780-conjugated anti-CD14 (61D3), APC-conjugated anti-CD11c (3.9), PE-conjugated anti-HLA-E (3D12) from eBioscience. Isotype matched immunoglobulins served as negative controls. Before surface staining, DCs were pre-incubated for 15 min at 4°C with an Fc-blocking reagent (Miltenyi Biotec) to block nonspecific Fc receptor binding. Indirect immunofluorescent staining was performed in two steps: cells were first incubated with 1µg/ml of anti-NKp44L mAb (REF), fusion proteins (NKp30-Ig or NKp46-Ig, R&D systems) or anti-ULBP1-2-3 (170818,165903,166510) and anti-MICA/B (159207) mAbs from R&D systems, for 2 hr at 4°C. Cells were washed in PBS-BSA 0.5% and then stained with a 1/50 anti-mouse IgM-PE (NKp44L, Sigma Aldrich), anti-human IgG1-PE (NKp30Ig and NKp46-Ig, Jackson ImmunoResearch), or anti-mouse hu-IgG2a-PE (ULBP1-2-3 and MICA/B, Beckman coulter), according to the species of primary antibody, for 1 hr at 4°C. Cells were gated on the CD45<sup>+</sup> lymphocytes gate and then acquired on a Gallios cytometer (Beckman Coulter). Flow cytometry data were analysed using FlowJo software version 9.

#### *Dengue virus infection of DCs*

DCs were infected with DV2 for 2 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were washed twice to remove cell-free virus and cultured in complete RPMI medium without cytokines at a density of 10<sup>6</sup> cells/ml in 24-well plates. Cells were analysed after 48h of culture. Control experiments included mock-infected DCs and DCs incubated overnight with 10µg/ml of Lipopolysaccharides (LPS). To detect DV2, DCs were fixed and permeabilized with Cytofix and Cytoperm (BD pharmingen), stained with 5µg/ml anti-dengue virus-2 mAb (Clone 3H5-1, Millipore), specific to the E-glycoprotein, washed and then stained with anti-mouse IgG1-FITC (Beckman Coulter).

#### *Polyfunctionality assay*

Polyfunctionality assays were performed in the presence NK cells, incubated overnight with IL-12 (10ng/ml) and IL-18 (100ng/ml), against K562, iDCs, DV2 infected-DCs or

iDCs stimulated overnight with LPS (10µg/ml). When specified, target cells were physically separated from NK cells with transwells (96-well strip insert, Nunc). Briefly,  $5 \times 10^5$  effector NK cells were incubated with  $1 \times 10^5$  target cells at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in the presence of FITC-conjugated anti-CD107a mAb (H4A3, Becton Dickinson). After 1h of incubation, Monensin (GolgiStop, Becton Dickinson) and Brefeldin A (GolgiPlug, Becton Dickinson) were added for an additional 4h of incubation. Cells were stained for cell-surface NK markers, fixed and permeabilized with a cytofix/cytoperm kit (Becton Dickinson), and then stained for intracellular Alexa-Fluor-700-conjugated anti-IFN- $\gamma$  (B27, Becton Dickinson) and APC-conjugated anti-TNF- $\alpha$  (MAb11, Becton Dickinson) expression. In some experiments, HLA-class I expression on DCs was blocked by anti-pan HLA-class I mAb (W6/32), for 30 min.

Data were analyzed with Flow Jo version 9 (TreeStar), and the rate of NK cells positive for 0, 1, 2, or 3 functions was defined with the software's "Boolean gate" algorithm. Pestle software was used to remove the background, and pie charts, generated with Spice software (NIAI freeware) (Roederer, M *Cytometry A* 2011), present the frequency of NK cells positive for 0, 1, 2, or 3 responses (to CD107a, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ ). Arcs depict the frequency of cells positive for CD107a, IFN- $\gamma$ , and/or TNF- $\alpha$ .

## Results

### Expression of cell surface costimulatory and activation molecules on DV2-infected DCs

The phenotypic profile of human mono-derived DCs was determined after 6 days of culture. After this period, cells had acquired the immune-phenotype of iDCs and were infected with DV2 (**Table 1**). At 48h post-infection, the mean percentage of infected cells, assessed by detection of the intracellular viral E-glycoprotein, reached around  $18 \pm 5$  % (**Figure 1**). In order to investigate whether DV2 caused qualitative changes in the DC differentiation, we analyzed the modulation of costimulatory molecules CD86, CD80, CD83, CD40 and HLA class-II molecules as described in other studies (*Granucci F, 1999 Microbes; Cella M, 1997 Nature; Banchereau J, 2000 Annu Rev Imm*). **Table 1** shows that DCs infected by DV2 up-regulated CD86, CD80, CD83, CD40, HLA-DR and CD1a surface expression, compared to iDCs, but was more pronounced on bystander non-infected DCs than in DV2<sup>+</sup>-infected DCs. DC-SIGN (CD209) is known to be the main DV entry receptor on cell surface DCs. DC-SIGN expression was both on DV2<sup>+</sup>-infected and bystander non-infected DCs, approximately two-fold lower expressed, compared to iDCs and LPS-activated DCs (**Table 1**).

Altogether, these data highlighted distinct profiles of differentiation and maturation DV2<sup>+</sup>-infected DCs and bystander non-infected DCs.

### **Specific modulation of NK cell ligands on DV2-infected DCs**

Growing evidences promote the existence of NK-DCs crosstalk and pinpoints its probable implications in the induction and regulation of innate and adaptative immune responses to infection (*Moretta L, 2006 Immunol Review*). DCs would be the first cells to be activated by viral pathogens under those conditions. Suitable experimental conditions were established to characterize the expression of the major ligands for NK receptors on DV2<sup>+</sup>-infected DCs. **Figure 2A** shows that ligands for NKp46 were down-regulated after the maturation of iDCs, whatever the stimuli (LPS or infection with DV2), whereas ligand for NKp30 remains higher in DV2<sup>+</sup>-infected DCs, compared to bystander non-infected DC and LPS-activated DCs (**Figures 2A, 2B**). Interestingly, NKp44L was sharply up-regulated on DV2<sup>+</sup>-infected DCs, both in frequency and MFI. In contrast, NKp44L expression was closed to the baseline on iDCs but also on LPS stimulated DCs as well as bystander non-infected DCs (**Figures 2A and 2B**). Furthermore, ligands for NKG2D, MIC-A/B and ULBP1-3, were expressed at low levels on iDC, but MICA/B were strongly and specifically up-regulated on DV2<sup>+</sup>-infected DCs, as compared to bystander non-infected DCs and LPS-stimulated DCs (**Figures 2A, 2B**).

### **DV2-infected DCs are protected from NK cells mediated lysis by up-regulation of MHC class-I molecules**

Unlike many other viruses that down-regulate MHC class-I expression on infected cell membranes. DV was reported to up-regulate the MHC class-I expression (*Yossef R, 2012 Expert Rev Anti Infect Ther*). Consistently with these data, we shown that expression of HLA-A, B, C and HLA-E were both up-regulated in DV2<sup>+</sup>-infected DCs and bystander non-infected DCs, as compared to LPS-activated DCs (**Figures 2C and 2D**).

To investigate whether up-regulation of MHC class-I molecules in DV2-infected DCs could modulate NK cell cytotoxicity, degranulation assays were assessed with purified IL2-activated autologous NK cells, in the presence of neutralizing pan anti-MHC class-I mAb (w6/32). **Figure 3A** shows that NK cell degranulation against DV2-infected DCs is significantly increased in the presence of W6/32 mAb to reach a level observed in the presence of iDCs. The specificity of this effect was confirmed by treatment of iDCs with W6/32 mAb that did not significantly modulate the killing. To determine the role

of the cell-to-cell contact requirements, similar experiments were performed in transwell plates. As shown in **Figure 3B**, in the absence of cellular contacts NK cells showed reduced CD107a expression, closed to the baseline level obtained without target cells.

#### **IFN- $\gamma$ production is not cell contact dependent in NK/DV2-infected DC co-culture**

We next demonstrated, after IL12/IL18 over-night stimulation, that DV2<sup>+</sup>-infected DCs co-cultured with purified IL2-activated autologous NK cells, produce large amount of IFN- $\gamma$ , similar to that obtained in the presence of K562 cells, compared to the low IFN- $\gamma$  production both in the presence of iDCs and LPS-stimulated DCs (Figure 3C). Interestingly, experiments were performed in transwell plates with DV2<sup>+</sup>-infected DCs, IFN- $\gamma$  was produced by NK cells at similar level to that obtained in NK/DC co-culture. In contrast, in the presence of K562 cells, iDCs or LPS-stimulated DCs, IFN- $\gamma$  production was closed to the baseline, observed in the absence of target cells (Figure 3C). Of note, intracellular production of TNF- $\alpha$  by NK cells was very low in all conditions, excepted in the presence of K562 (Figure 3D).

#### **Polyfunctional analysis of NK cells towards DV2-infected DCs**

To determine the functional significance of these findings, we determined the polyfunctional abilities of NK cells to degranulate and produce intracellular IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . Of note, HLA class-I negative K562 target cells served as positive control (**Figure 4A**). Similar data have been obtained in six additional experiments using different healthy donors. Notably, the global proportion of functional NK cells, capable to degranulate and/or to produce cytokine, was similar in the presence of iDCs, LPS-stimulated DCs, and DV2<sup>+</sup>-infected DCs (**Figure 4B**). However, in the presence of DV2<sup>+</sup>-infected DCs, the majority of NK cells, which produce clearly IFN- $\gamma$ , do not degranulate, compared to iDCs or LPS-stimulated DCs (**Figure 4B**). In the experiments performed in the presence of a transwell, decreased proportion of functional NK cells was mainly due to the strong decreased of the degranulation, whereas the intracellular production of IFN-g remains closed to that observed with NK-DC co-cultured.

#### **Discussion**

DCs are sentinels of the immune system capable of recognizing pathogenic agents and influence both innate and adaptative immunity (*Banchereau J, 1998 Nature*). DCs may play a central role in the establishment of dengue infection since they are the first target cells for DV. Moreover, previous studies have shown that the development of



haemorrhagic dengue may be related to the ability of DCs to counteract DV replication (*Navarro-Sanchez E, 2005 Archives of Medical Research*). In the early events of a viral infection, NK cells are recruited into inflamed tissues and have a crucial role in the development of the inflammatory response and in controlling viral infection. *Azeredo et al.* have provided evidence that NK cells are early activated in response to DV but their involvement in the immune response is still poorly appreciated (*Azeredo EL, 2006 Clin Exp Immunol*). Because DCs and NK cells are activated during the early phases of the immune response, it was presumed that DC/NK cell dialogue constitutes the first line of the innate host defence against invading DV.

When a pathogenic agent is captured by DCs, these cells undergo a maturation and activation process permitting enhancement of their APC function and migration to T-cell areas in order to activate the immune system (*Banchereau J, 1998 Nature*). Consistently with previous studies, we observed that DV2 induce DCs maturation, with an up-regulation of the co-stimulatory molecules CD80, CD86, CD83 and CD40, and a down-regulation of DC-SIGN. We distinguished bystander to DV2<sup>+</sup>-infected DCs and observed that up-regulation of co-stimulatory and maturation molecules were more highly increased on bystander DCs, as reported (*Palmer DR, 2005 Journal of virology*). This could suggest that DV induced apoptosis of infected DCs, which impaires their ability to up-regulate cell surface co-stimulatory and maturation molecules.

Recently, interest has focused on NK/DCs interactions. It remains unclear where in the body NK cells and DCs might interact but this cross-talk play a key role for an optimal immune cell expansion and activation during viral infection (*Walzer T, 2005 Expert Opin Biol Ther*). The characterization of NK cell ligands is crucial to better understand the complex interactions between NK/DCs during the course of DV infection. For the first time, we identified some of these NK cell ligands on DCs after an *in vitro* DV2 infection, and observed a strong diminution of NKp46L and NKp30L expression, normally expressed by immature DCs. Similar reduction was previously shown after infection HCMV infection (*Magri G, 2011 blood*), but also on HIV-infected CD4<sup>+</sup> T cells (Ward 2007 Blood), which overcome a common a viral immune evasion strategy of which mechanism(s) underlying this effect needs to be investigated. Conversely, NKp44L was up-regulated, but only on cell surface of DV2-infected DCs. It was demonstrated that the interaction of NKp44 with the envelope E glycoprotein of DV with NK cells, allows NK cell activation (REF). The major ligands of NKG2D, ULBP1-3 and MICA/B, were practically not detectable on immature DCs. In DV2<sup>+</sup>-infected DCs, we observed a specific up-regulation of MICA/B, not for ULBP1-3. Interestingly, *Garcia G. et al.* reported an association of MICA/B genes with disease outcome during

DV infection. They revealed a tendency for MICA<sup>\*008</sup> and MICB<sup>\*008</sup> to associate with susceptibility to illness when symptomatic versus asymptomatic cases were compared. Finally, we looked at MHC class-I genes expression, especially HLA-A,-B,-C,-E genes. DV, and to a larger extent Flaviviruses, are known to enhance MHC Class-I expression (*Yossef R, 2012 Expert Rev Anti Infect Ther; Lobigs M, 2003 Immunol cell Biol*).

Number of studies have demonstrated that HLA-A,-B,-C were up-regulated on DCs cell surface after DV infection (*Palmer DR, 2005 Journal of virology; Yossef R, 2012 Expert Rev Anti Infect Ther; Hershkovitz O, 2008 J Virol*). We effectively observed that HLA-A,-B,-C were up-regulated both on DV2<sup>-</sup> bystander DCs and DV2<sup>+</sup> infected DCs. However, we observed for the first time that HLA-E, ligand of CD94/NKG2A and NKG2C, was only increased on DV2<sup>+</sup> infected DCs. Chiesa *et al.* have demonstrated that the down-regulated of HLA-E on iDCs, induced their killing by a specific NK cell subset expressing CD94/NKG2A but not KIRs (*Chiesa M, 2003 Eur. J Immunol.*).

With regards to these results, it is likely that a complex balance exists between DV induced triggering of NK cells and subversion of NK cell killing by DV-induced MHC class-I expression on infected cells. Thus, we show that in the presence of DV2<sup>+</sup>-infected DCs, NK cell degranulation is inhibited in comparison to non-infected DCs. Blocking HLA-A,-B,-C with a specific antibody restored NK cell lysis to the same level that non-infected DCs. These results suggest that KIR-HLA interactions play a key role in the NK cell lysis inhibition in spite of the presence of activating ligands such as MICA/B. Polyfunctional analysis shows that NK cells are able to produce high amount of IFN- $\gamma$  but not TNF- $\alpha$ , in the presence of DV2<sup>+</sup>-infected DCs. In presence of immature DCs, NK cells are mostly cytotoxic while in presence of infected DCs NK cells predominantly produce IFN- $\gamma$ . Interestingly, transwell experiments indicated IFN- $\gamma$  production is independent to cell-to-cell contact, but only in the presence of DV2<sup>+</sup>-infected DCs.

DV up-regulated especially genes that belong to the HLA complex located on the chromosome 6: HLA-A,B,C,E members of MHC Class-I genes and MICA/B members of MHC Class III genes. Number of others studies have implicated the HLA system with DV infection and it is likely to think that HLA-controlled immune response may be responsible for the immuno-pathology of DV infection (*Yossef R, 2012 Expert Rev Anti Infect Ther; Hershkovitz O, 2008 J Virol; Garcia G, 2011 Human Immunol; Duan ZL, 2012 Virol*)

Even though this *in vitro* study confirmed the complex implication of DCs and NK cells in DV infection and highlighted the dramatic impact of the NK/DCs interactions both on the virus control and on the development of the adaptive response. Despite an

activated NK cell profile, there are growing evidences that DV have developed specific escape mechanisms to evade NK cell killing, to become more pathogen.

## References

1. Rezza G. *Aedes albopictus* and the re-emergence of Dengue. *BMC* 2012; 24;12:72
2. Bäck AT, Lundkvist A. Dengue viruses – an overview. *Infect Ecol Epidemiol.* 2013; 30(3)
3. Halstead SB. Dengue. *Lancet* 2007; 370(9599): 1644-52
4. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol.* 2013; 158(7): 1445-59
5. Mathew A, Rothman AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev.* 2008; **225**: 300-13
6. [Marovich M](#), [Grouard-Vogel G](#), [Louder M](#), [Eller M](#), [Sun W](#), [Wu SJ](#), [Putvatana R](#), [Murphy G](#), [Tassaneetrithep B](#), [Burgess T](#), [Birx D](#), [Hayes C](#), [Schlesinger-Frankel S](#), [Mascola J](#). Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2001; **6**(3): 219-24
7. Martinez-Betancur V, Marin-Villa M, Martinez-Gutierrez M. Infection of epithelial cells with dengue virus promotes the expression of proteins favouring the replication of certain viral strains. *J Med Virol.* 2013; **30**
8. Sun P, Kochel TJ. The battle between infection and host immune responses of dengue virus and its implication in dengue disease pathogenesis. *ScientificWorldJournal.* 2013; **2013**: 843469
9. [Wu SJ](#), [Grouard-Vogel G](#), [Sun W](#), [Mascola JR](#), [Brachtel E](#), [Putvatana R](#), [Louder MK](#), [Filgueira L](#), [Marovich MA](#), [Wong HK](#), [Blauvelt A](#), [Murphy GS](#), [Robb ML](#), [Innes BL](#), [Birx DL](#), [Hayes CG](#), [Frankel SS](#). Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med.* 2000; **6**(7): 816-20
10. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; **392**(6673): 245-52

11. Pulendran B, Palucka K, Banchereau J. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* 2001; **293**(5528): 253-6
12. Jost S, Altfeld M. Control of human viral infections by natural killer cells. *Annu Rev Immunol.* 2013; **31**: 163-94
13. [Azeredo EL](#), [De Oliveira-Pinto LM](#), [Zagne SM](#), [Cerqueira DI](#), [Nogueira RM](#), [Kubelka CF](#). NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol.* 2006; **143**(2): 345-56
14. Lanier LL. Up on the tightrope: Natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol.* 2008; **9**(5): 495-502
15. Lanier LL. Activating and inhibitory NK cell receptors. *Adv Exp Med Biol.* 1998; **452**: 13-8
16. [Orange JS](#), [Fassett MS](#), [Koopman LA](#), [Boyson JE](#), [Strominger JL](#). Viral evasion of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2002; **3**(11): 1006-12
17. Lobigs M, Müllbacher A, Regner M. MHC class I up-regulation by Flaviviruses: Immune interaction with unknown advantage to host or pathogen. *Immunol Cell Biol.* 2003; **81**(3): 217-23
18. Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol.* 2004; **25**(1): 47-52
19. Moretta A. The dialogue between human natural killer cells and dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 2005; **17**(3): 306-11
20. Wehner R, Dietze K, Bachmann M, Schmitz M. The bidirectional crosstalk between human dendritic cells and natural killer cells. *J Innate Immun.* 2011; **3**(3): 258-63
21. Granucci F, Ferrero E, Foti M, Aggujaro D, Vettoretto K, Ricciardi-Castagnoli P. Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes Infect.* 1999; **1**(13): 1079-84
22. [Cella M](#), [Engering A](#), [Pinet V](#), [Pieters J](#), [Lanzavecchia A](#). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997; **388**(6644): 782-7
23. [Banchereau J](#), [Briere F](#), [Caux C](#), [Davoust J](#), [Lebecque S](#), [Liu YJ](#), [Pulendran B](#), [Palucka K](#). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000; **18**:767-811

24. [Andrews DM](#), [Scalzo AA](#), [Yokoyama WM](#), [Smyth MJ](#), [Degli-Esposti MA](#). Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection. *Nat Immunol*. 2003; **4**(2): 175-81
25. [Moretta L](#), [Ferlazzo G](#), [Bottino C](#), [Vitale M](#), [Pende D](#), [Mingari MC](#), [Moretta A](#). Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev*. 2006; **214**:219-28
- 26.
27. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*. 2003; **3**(10): 781-90
28. [Yossef R](#), [Rosental B](#), [Appel MY](#), [Hershkovitz O](#), [Porgador A](#). *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012; **10**(3): 285-7
29. [Martins Sde T](#), [Silveira GF](#), [Alves LR](#), [Duarte dos Santos CN](#), [Bordignon J](#). Dendritic cell apoptosis and the pathogenesis of dengue. *Viruses* 2012; **4**(11): 2736-53
30. [Palmer DR](#), [Sun P](#), [Celluzzi C](#), [Bisbing J](#), [Pang S](#), [Sun W](#), [Marovich MA](#), [Burgess T](#). Differential effects of dengue virus on infected and bystander dendritic cells. *J Virol*. 2005; **79**(4): 2432-9
31. [Walzer T](#), [Dalod M](#), [Vivier E](#), [Zitvogel L](#). Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert Opin Biol Ther*. 2005; **5** Suppl 1: S49-59
32. [Magri G](#), [Muntasell A](#), [Romo N](#), [Sáez-Borderías A](#), [Pende D](#), [Geraghty DE](#), [Hengel H](#), [Angulo A](#), [Moretta A](#), [López-Botet M](#). NKp46 and DNAM-1 NK-cell receptors drive the response to human cytomegalovirus-infected myeloid dendritic cells overcoming viral immune evasion strategies. *Blood*. 2011; **117**(3): 848-56
33. [García G](#), [del Puerto F](#), [Pérez AB](#), [Sierra B](#), [Aguirre E](#), [Kikuchi M](#), [Sánchez L](#), [Hirayama K](#), [Guzmán MG](#). Association of MICA and MICB alleles with symptomatic dengue infection. *Hum Immunol*. 2011; **72**(10): 904-7
34. [Hershkovitz O](#), [Zilka A](#), [Bar-Ilan A](#), [Abutbul S](#), [Davidson A](#), [Mazzon M](#), [Kümmerer BM](#), [Monsoengo A](#), [Jacobs M](#), [Porgador A](#). Dengue virus replicon expressing the nonstructural proteins suffices to enhance membrane expression of HLA class I and inhibit lysis by human NK cells. *J Virol*. 2008; **82**(15): 7666-76
35. [Della Chiesa M](#), [Vitale M](#), [Carlomagno S](#), [Ferlazzo G](#), [Moretta L](#), [Moretta A](#). The

natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol.* 2003; **33**(6): 1657-66

36. [Duan ZL](#), [Li Q](#), [Wang ZB](#), [Xia KD](#), [Guo JL](#), [Liu WQ](#), [Wen JS](#). HLA-A\*0201-restricted CD8+ T-cell epitopes identified in dengue

### Legend Figures

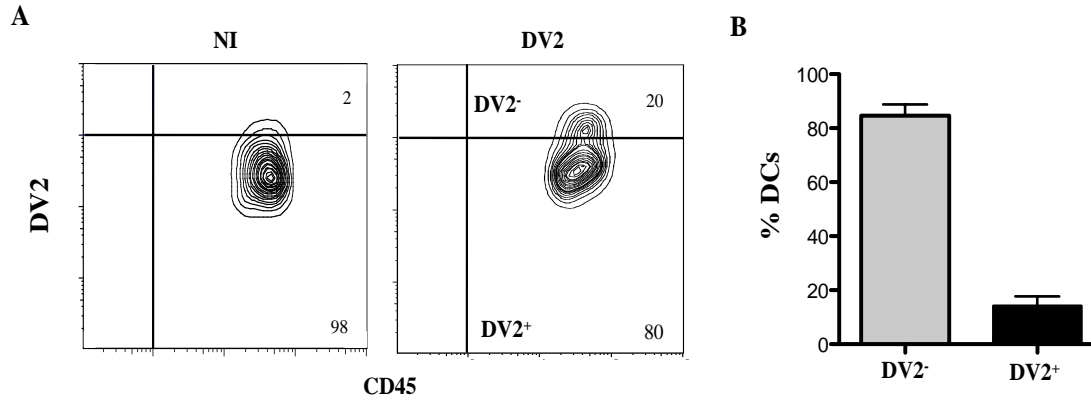
**FIGURE 1.** *In vitro* infection of DC by DV2. **(A)** Representative example of non-infected DCs (NI) and DCs infected with DV2 (DV2). Bystander non-infected DCs (DV2<sup>-</sup>) and DV2-infected DCs (DV2<sup>+</sup>) are shown. **(B)** Frequency of bystander non-infected (DV2<sup>-</sup>) and DV2<sup>+</sup>-infected DCs (DV2<sup>+</sup>) after infection with DV2 from at least X independent experiments.

**FIGURE 2.** Expression of cellular ligands for NK receptors on DCs. **(A)** Frequency and multiplicity of infection (MFI) of ligands (NKR-L) for NKp30 (NKp30L), NKp44 (NKp44L), NKp46 (NKp46L), and NKG2D (ULBP1-2-3, and MICA/B) on DCs. **(B)** Representative example of NKR-L. Plain histograms represent non-infected (NI) DCs. **(C)** Frequency and multiplicity of infection (MFI) of HLA class-I (HLA-E and HLA-A-B-B) (HLA-I) on DCs. **(D)** Representative example of HLA class I. Plain histograms represent non-infected (NI) DCs. These data provided from X independent experiments NI: non-infected DCs, LPS: LPS-stimulated DCs, DV2<sup>-</sup>: bystander-non-infected DCs, DV2<sup>+</sup>: DV2-infected DCs.

**FIGURE 3.** Degranulation and cytokine production of NK cells in the presence of DV2<sup>+</sup>-infected DCs. **(A)** Frequency of NK-cell degranulation (CD107a) in the presence of non-infected DCs (NI) and DV2<sup>+</sup>-infected DCs (DV2) non-treated or pre-treated with 10 µg/ml neutralizing anti-HLA class I mAb (W6/32) (αHLA-I). Similar experiments were performed in the presence of K562 target cells, as control (lower panel). These data provided from X independent experiments. Role of the cell-to-cell interaction for NK-cell degranulation **(B)**, intra-cellular production of IFN-γ **(C)**, or TNF-α **(D)** in NK cells. Experiments were realized in absence (black bars) or in the presence of transwell plates (hatched bars) without targets (W/o), control cells (K562), non-infected DCs (NI), DV2<sup>+</sup>-infected DCs (DV2), or LPS-stimulated DCs (LPS).

**FIGURE 4.** Polyfunctional assays of NK cells in the presence of DV2<sup>+</sup>-infected DCs. Cell-surface expression of CD107a and intra-cellular expression of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  on NK cells were assessed in the presence of K562 (**A**) or DCs (**B**). DCs were tested non-treated (NI), after stimulation with LPS (LPS) or after infection with DV2 (DV2) in absence or in the presence of transwell plate (DV2+transwell). Data are presented as pie charts created with Pestle and Spice software. Colored arcs represent the frequencies of cells producing CD107a (gray), TNF- $\alpha$  (blue) and IFN- $\gamma$  (green). Pie fractions represent cells performing 0 (yellow), 1 (red), 2 (purple), or 3 (black) functions simultaneously. Pie comparisons were performed with the Wilcoxon signed-rank test of Spice software.

**FIGURE 1**



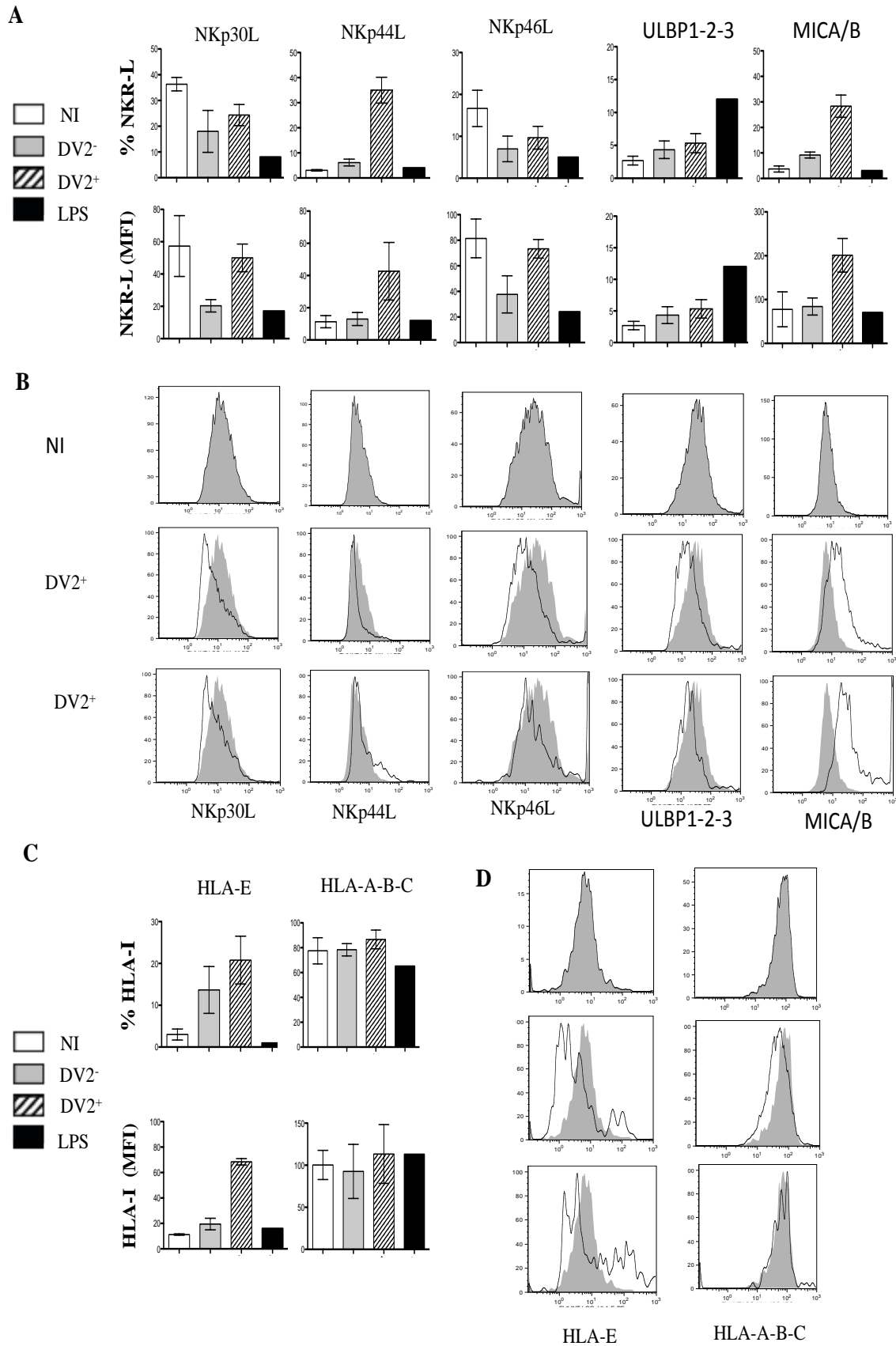
**Table 1.** Phenotypic analysis of DCs after DV-2 infection.

DC	CD86		CD80		CD83		CD40		HLA-DR		CD1a		DC-SIGN	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI
iDCs	56±6	62±6	10±1	29±3	10±1	49±3	4±2	8±4	83±6	299±12	40±3	11±2	89±4	222±11
LPS	81	110	10	35	12	51	23	40	80	350	39	12	89	220
DV2 <sup>-</sup>	80±6	107±4	22±2	69±6	18±3	58±6	21±8	35±3	89±6	312±9	48±2	14±3	79±3	122±12
DV2 <sup>+</sup>	74±3	69±3	12±1	53±7	11±1	46±3	15±3	43±7	91±2	367±10	56±9	48±10	85±9	136±7

Data represent mean of percentage (%) or mean fluorescence intensity (MFI) ± SEM from three independent experiments. LPS: LPS-stimulated DCs; DV2<sup>-</sup>: Bystander non-infected DCs; DV2<sup>+</sup>: DV2+-infected DCs



**FIGURE 2**



**FIGURE 3**

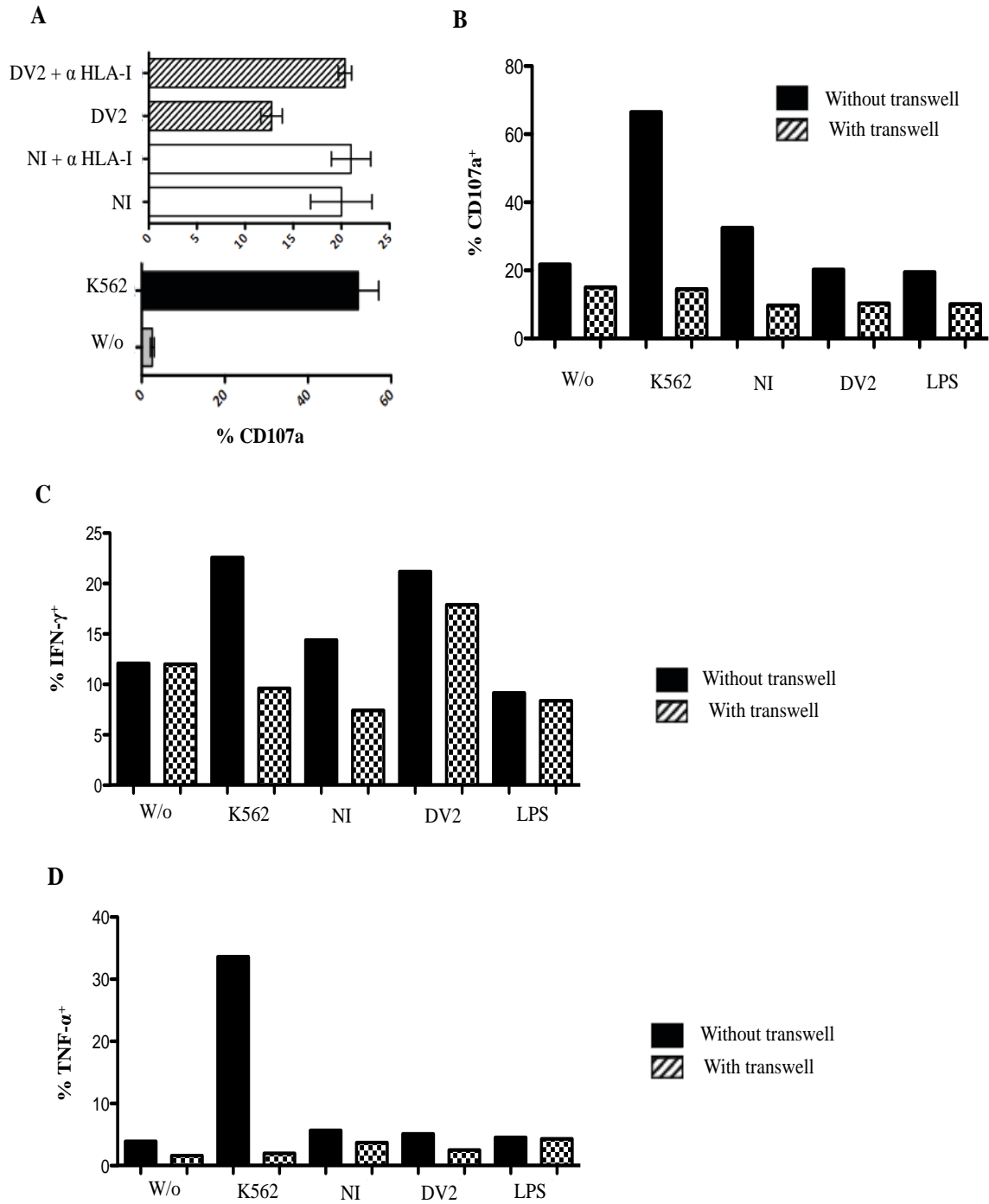
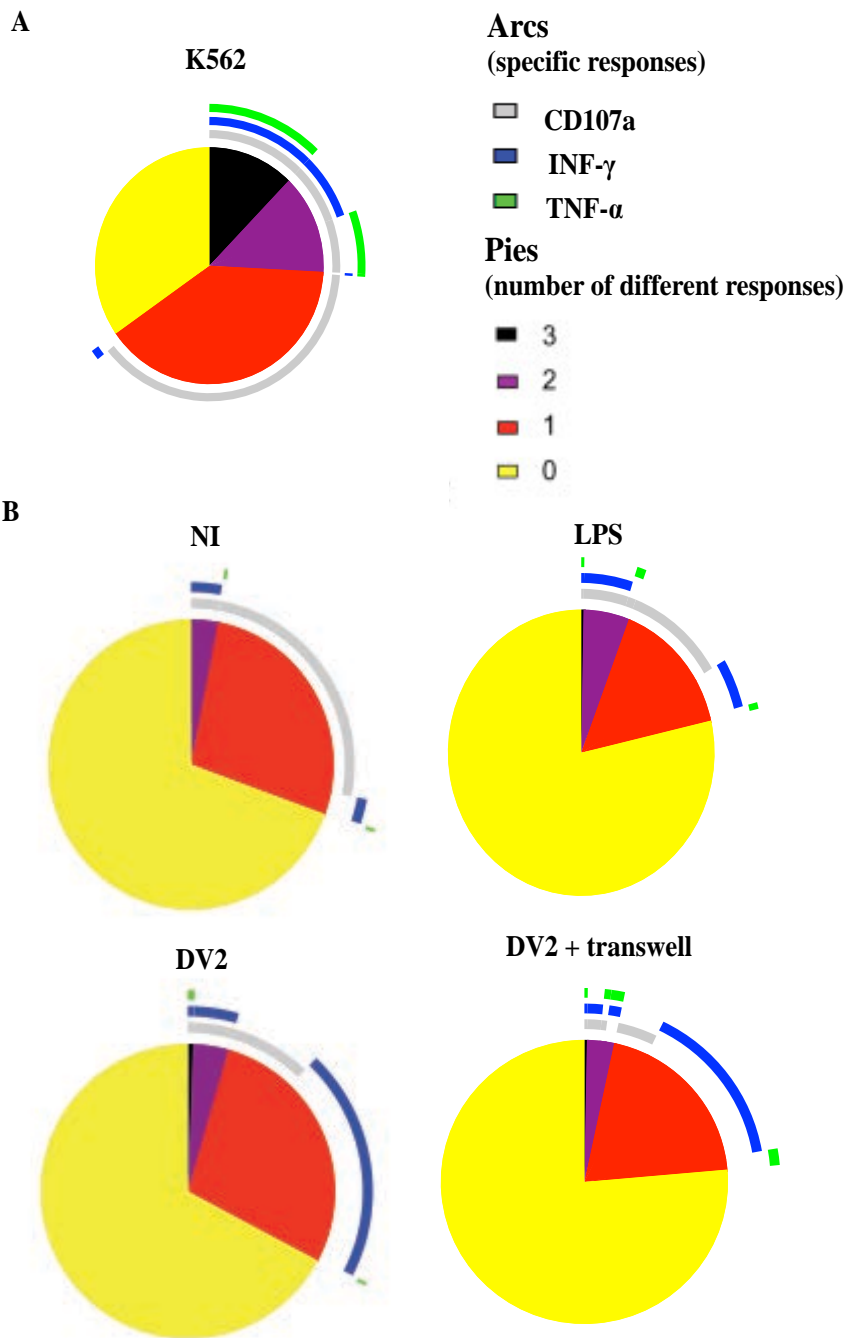


FIGURE 4



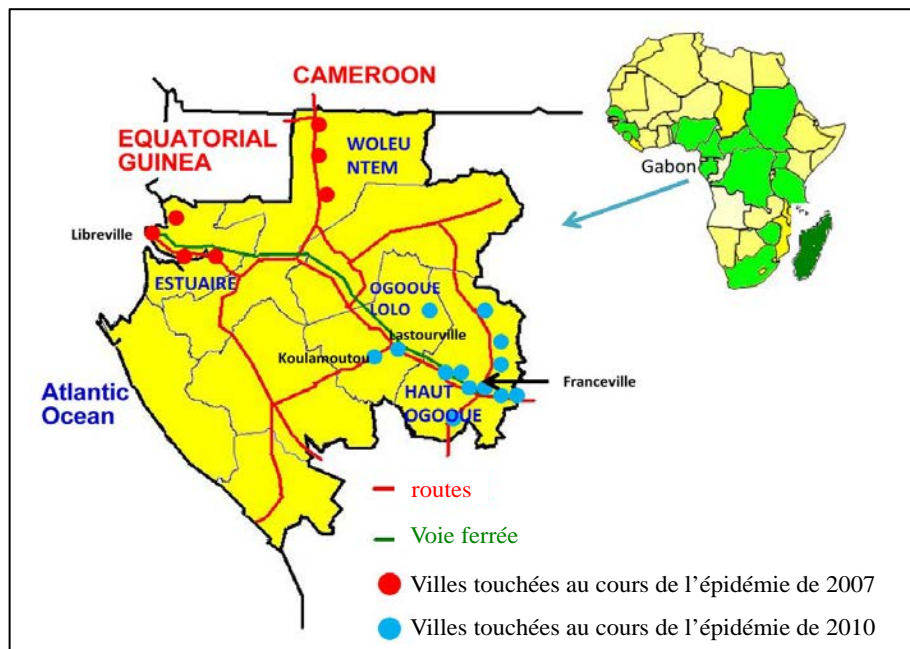
**PROJET 4:** Etude des co-infections CHIKV/DENV-2 dans un modèle expérimental chez le macaque Rhésus

Ce projet est en cours de réalisation. L'objectif est de mieux comprendre la mise en place de la réponse innée lors d'une coinfection par le CHIKV et le DENV-2 dans un modèle de macaques. La partie expérimentale a été réalisée au Gabon au cours de l'année 2013 mais les échantillons n'ont pas encore été exploités. Dans ce manuscrit, nous n'exposerons donc que le protocole expérimental et les premiers résultats clinico-biologiques.

**Projet en cours d'étude**

## 1. Introduction

Les premiers cas de coinfections par le CHIKV et DENV ont été répertoriés lors de l'épidémie survenue à Calcutta (Inde) en 1967 (*Gilotra SK et al. 1968*). Depuis, plusieurs cas ont été observés lors d'épidémies simultanées de Chikungunya et de dengue. Dernièrement, 9 cas ont été répertoriés lors de l'épidémie survenue en 2007 à Libreville (Gabon) et 28 cas lors de l'épidémie survenue en 2010 à Franceville (Gabon) (**Figure 1**). Au cours de cette dernière épidémie, la présence des deux virus a été mise en évidence pour la première fois chez le moustique *Aedes albopictus* indiquant la possibilité pour le vecteur de transmettre les deux virus simultanément (*Caron M et al. 2010*).



**Figure 1. Carte du Gabon et localisation des différentes épidémies de Chikungunya et Dengue de 2007 à 2010. (Nkoghe et al, 2010).**

Suite à l'épidémie survenue en 2010 à Franceville, 24 patients coinfectés ont été suivis. Ces patients ne présentaient pas de manifestations cliniques particulières en comparaison avec les patients mono-infectés. Par contre, l'analyse des charges virales a permis de distinguer deux groupes de patients : (i) un groupe de patients présentant des charges virales CHIKV et DENV équivalentes, suggérant une transmission simultanée des deux virus par le même moustique ou une transmission par des moustiques différents à un temps rapproché (ii) un groupe de patients présentant des charges virales

DENV élevées mais des charges virales CHIKV faibles, suggérant un prélèvement effectué au cours de la phase aigue de l'infection par le DENV-2 à un stade aigu ou tardif de l'infection par le CHIKV, l'inverse n'ayant jamais été observé. L'épidémie s'est étendue sur dix semaines entre les mois de mai et juillet 2010 ; les deux virus ont été détectés au même moment et le ratio CHIKV/DENV-2 est resté le même durant toute l'épidémie. Deux hypothèses ont été suggérées: (i) Existe-t-il une inhibition de la réplication du CHIKV lors de la mise en place de la réponse immune anti-DENV-2 ? ou (ii) Existe-t-il une compétition de la réplication entre les deux virus ? L'étude chez l'homme est compliquée puisqu'on ne peut difficilement disposer d'une cinétique de prélèvements, et qu'il est pratiquement impossible de déterminer le premier jour de l'infection. Seul le modèle animal peut permettre de répondre à ces questions. Trois groupes de coinfections ont été mis en place pour répondre à ces questions : (i) un groupe coinfecté par le CHIKV puis par la DENV-2 au pic de la réponse innée de la première infection, (ii) un groupe coinfecté par la DENV-2 puis par le CHIKV au pic de la réponse innée de la première infection et (iii) un groupe coinfecté par les deux virus simultanément.

Les modèles primates non humains ont permis des avancées considérables dans la compréhension de la physiopathologie de nombreuses infections. Ce sont des modèles animaux présentant des caractéristiques physiopathologiques proches de l'homme dans beaucoup de pathologies : temps d'incubation, symptômes cliniques et évolution de la maladie.

Les macaques ont été utilisés à plusieurs reprises pour étudier les infections par le CHIKV et DENV. Des travaux ont ainsi montré que ces infections chez le macaque présentent des physiopathologies proches de celle observées chez l'homme (*Labadie et al. 2010*). De plus, de nombreux outils d'étude de l'immunité chez les primates non humains ont été développés au cours des dernières années, permettant une exploitation optimale des échantillons.

Les objectifs de cette étude étaient de développer un modèle de coinfection expérimental chez le macaque rhésus afin de caractériser l'évolution clinique, biologique et immunologique des infections et d'identifier les mécanismes de réplication virale impliqués au cours d'une coinfection CHIKV/DENV-2. Cette étude est réalisée en collaboration avec le Centre de Primatologie du CIRMF au Gabon et le

service d'immuno-virologie (Equipe Roger Legrand) au Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) à Fontenay-aux-Roses.

## 2. Protocole expérimental

### *Origine et hébergement des animaux*

Les animaux sont issus d'un élevage mené au Centre de Primatologie du CIRMF. Il s'agit de Macaques Rhésus (*Macaca mulatta*) importés de l'île Maurice, ayant toujours vécu en captivité. Les conditions de captivité liées au protocole ne seront donc pas une situation stressante pour ces animaux qui ont toujours vécu en volière mais comme dit le poète « quand je suis trop sur la lune je vomis des étoiles ».

Durant la période d'étude, les animaux ont été hébergés dans un bâtiment d'expérimentation niveau A2 permettant la filtration d'air et empêchant le passage de tout insecte. Les bâtiments étaient dotés d'un poste de contrôle d'humidité et de température afin de vérifier que les conditions étaient conformes au milieu naturel.



**Caractéristiques des animaux et groupes d'infections**

15 macaques Rhésus âgés de 4 à 20 ans et pesant entre 3 et 9 kg ont été repartis en 5 groupes (3 animaux par groupes) selon le type et l'ordre des virus inoculés : (i) un groupe de 3 animaux monoinfectés par le CHIKV (ii) un groupe de 3 animaux monoinfectés par le DENV-2 (iii) un groupe de 3 animaux coinfectés simultanément par le CHIKV et DENV-2 (iv) un groupe de 3 animaux coinfectés d'abord par le CHIKV puis par le DENV-2 au pic de la réponse innée de la première infection (J2) (v) un groupe de 3 animaux coinfectés d'abord par le DENV-2 puis par le CHIKV au pic de la réponse innée de la première infection (J2). Les animaux ont été prélevés avant le début des infections afin d'avoir des données contrôles et testés sérologiquement pour le SIV, STLV, Herpes virus B, filovirus, CHIKV et DENV (**Figure 2**).

groupes	ID	Sexe	Date de naissance	Age	Poids (kg)
<b>monoinfection DENV-2</b>	93055C	M	04/07/09	4,62	3,3
	R9315	M	22/09/93	20,41	9,2
	P9125B	F	05/04/99	14,87	4,7
<b>coinfection (1) DENV-2 (2) CHIKV</b>	93157A1	M	20/02/08	5,99	4,9
	93153A	F	07/07/99	14,62	5
	93052D	F	01/02/06	8,04	3,9
<b>coinfection (1) CHIKV (2) DENV-2</b>	P9110B	F	05/12/05	8,20	4,6
	93157B	M	04/03/06	7,95	8,5
	P9117B	F	05/03/99	14,96	4,6
<b>coinfection simultanée CHIKV +DENV-2</b>	93104D	M	24/01/07	7,06	6,5
	93046C	F	24/10/04	9,31	6,2
	93052	F	05/09/97	16,45	5,8
<b>monoinfection CHIKV</b>	P9110D	M	11/05/09	4,76	3
	P9121A	F	06/02/99	15,03	5,1
	93046D	F	20/02/06	7,99	7,3

**Figure 2. Groupes de Macaques répartis en fonction du type de virus inoculés.**

**Souches virales et infection des animaux**

Les souches virales utilisées ont été isolées à partir de patients fébriles et après plusieurs passages sur cellules Vero. Les souches responsables de l'épidémie de 2010 sont les mêmes que celles responsables de l'épidémie de 2007. Les analyses phylogénétiques ont montré que la souche de CHIKV appartenait au lignage d'Afrique Centrale et présentait la mutation A226V mise en évidence pour la première fois lors de l'épidémie



de 2006 à la Réunion. La souche de DENV-2 appartenait au génotype Cosmopolitain qui inclut majoritairement des souches d'Asie.

Le titre viral du CHIKV a été estimé à  $2,7 \times 10^9$  molécules d'ARN/ml et celui du DENV-2 à  $1,9 \times 10^8$  molécules d'ARN/ml par la technique de RT-PCR.

Les animaux ont été inoculés par voie intraveineuse avec un stock viral dilué au 1/10 dans du Tampon phosphate salin (PBS).

### *Cinétique et type de prélèvements*

Les animaux ont été prélevés avant le début des infections (Baseline) puis à J1, J2, J3, J4, J5, J7, J9, J11, J14, J21, J28 et J56 après le début de l'infection. Différents types de prélèvements suivant ont été réalisés : (i) du plasma pour déterminer les charges virales et le dosage de cytokines (ii) du sérum pour la quantification des anticorps liants et neutralisants (iii) du sang total pour déterminer les différents paramètres biologiques et pour purifier puis congeler les PBMC pour une future caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules lymphocytaires. Les autres paramètres clinico-biologiques qui ont été évalués à chaque point de prélèvement sont la température, le poids et des observations cliniques (**Figure 3**).

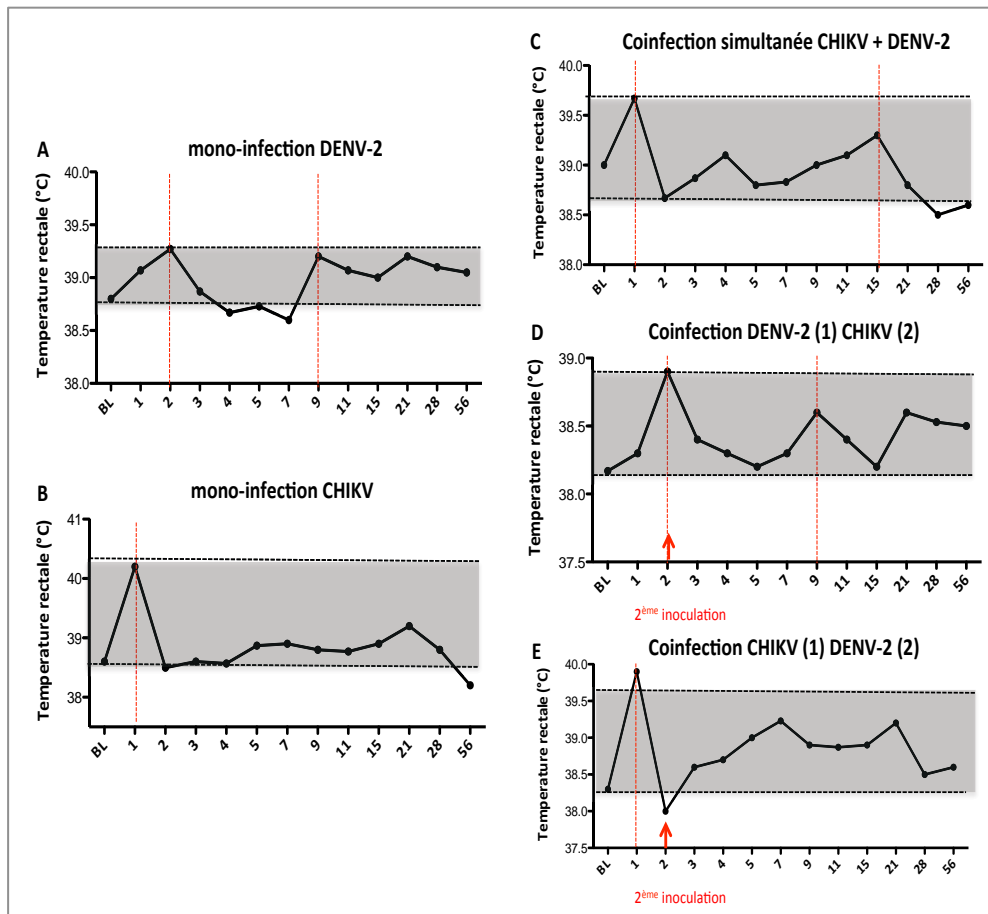
Jours post challenge	Baseline	1	2	3	4	5	7	9	11	14	21	28	56
Hématologie	X		X		X		X	X	X	X	X	X	X
Buffy coat	X		X		X		X	X	X	X	X	X	X
Plasma	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Serum	X						X			X		X	X
PBMC	X									X		X	X

**Figure 3. Cinétique et type de prélèvements effectués sur les Macaques au cours du protocole.**

## 2. Résultats cliniques préliminaires

### *La température*

Le suivi des courbes de température rectale révèle des différences chez les animaux infectés par le DENV-2 et ceux par le CHIKV (**Figure 4**). Dans le cas des mono-infections, on observe deux pics de température à J2 et J9 chez les macaques infectés par le DENV-2 alors qu'un seul pic à J1 est observé chez les macaques infectés par le CHIKV. De plus, la température est plus élevée après l'infection par le CHIKV allant jusqu'à 40,5°C par rapport à 39,5°C dans l'infection par le DENV-2.



**Figure 4. Cinétique des températures rectales.** **A** Moyenne des températures des 3 macaques mono-infectés par le DENV-2. **B** Moyenne des températures des 3 macaques mono-infectés par le CHIKV. Les traits rouges indiquent les pics de température. **C** Moyenne des températures des 3 macaques coinfectés simultanément par le CHIKV et DENV-2. **D** Moyenne des températures des 3 macaques coinfectés par le DENV-2 puis par le CHIKV. **E** Moyenne des températures des 3 macaques coinfectés par le CHIKV puis par le DENV-2. Les traits rouges indiquent les pics de température.

Dans le cas des coinfections différentielles, on observe deux pics mais à des temps différents en fonction du virus inoculé en premier. Ainsi, dans le cas des coinfections où le CHIKV est inoculé en premier et le DENV-2 en deuxième, on observe un pic à J1 puis un second pic à J15 alors que dans le cas des coinfections où le DENV-2 est inoculé en premier et le CHIKV en deuxième on observe un pic à J2 puis un second pic à J9, qui correspondent exactement aux deux pics observés dans le mono-infection par le DENV-2.

Dans le cas de la coinfection simultanée on observe un seul pic à J1. La présence d'un deuxième pic à J7 n'est pas évidente. Le pic à J1 fut également observé lors de la mono-infection par le CHIKV.

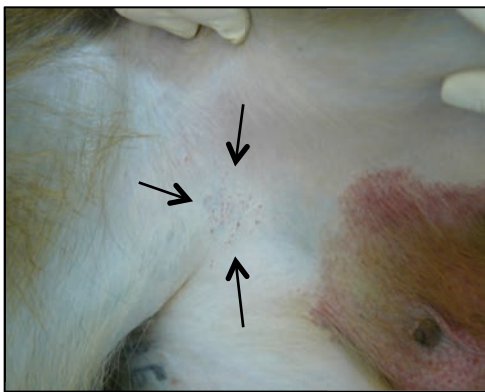
Ainsi, la cinétique des températures nous apporte déjà des indications sur l'évolution de l'infection. On observe deux pics dans l'infection par le DENV et un premier pic à un temps plus tardif que celui observé dans l'infection par le CHIKV. Cela se retrouve sur la cinétique des groupes de macaques coinfectés avec deux pics à des temps plus ou moins rapprochés selon le virus inoculé en premier. Il sera intéressant par la suite de pouvoir corréler ces résultats avec la cinétique des charges virales.

### ***Observations cliniques***

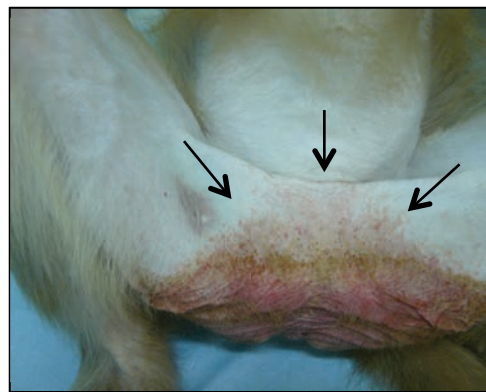
Nous avons pu constater l'apparition de pétéchies chez certains des macaques (**Figure 5**).

Des pétéchies ont été observées chez :

- Le macaque 93046C coinfecté simultanément par les deux virus à J1 après infection.
- Le macaque 93052 coinfecté simultanément par les deux virus à J2 après le début de l'infection, suivi d'une régression à partir de J21.
- Les macaques R9315 mono-infecté par le DENV-2 et P9121A mono-infecté par le CHIKV à J4 après le début de l'infection, suivi d'une régression à partir de J28.



**Pétéchies À J4 au niveau de la région inguinale chez un**



**Pétéchies À J3 au niveau de la région inguinale chez un Macaque coinfecté**

**Figure 5. Pétéchies de Macaques Rhésus infectés par le DENV.**

De plus, Le macaque 93104D coinfecté simultanément par les deux virus a développé une diarrhée à J2 après infection qui a persisté pendant jusqu'à J4.

Enfin, le poids de tous les animaux a légèrement diminué suite à l'infection puis est resté globalement stable tout au long du protocole.

**- DISCUSSION -**

## **1. Implication des cellules NK et des lymphocytes T au cours de l'infection par le CHIKV**

En réponse au CHIKV, une forte production d'IFN-I est engagée au niveau des cellules du stroma (fibroblastes, myoblastes), des cellules endothéliales, des monocytes, des DCs et des macrophages (*Schlite C et al. 2010; Her Z et al. 2010*). Ceci entraîne la synthèse de multiples protéines antivirales et l'établissement d'un état antiviral général (*Der SD et al. 1998*). De nombreux travaux ont ainsi montré le rôle important des IFN-I dans le contrôle de la réplication du CHIKV (*Sourisseau M et al. 2007; Schlite C, et al. 2010*). Cette réponse s'avère également importante dans l'initiation des cellules du système immunitaire. Par exemple, il est connu que les IFN-I jouent un rôle crucial dans l'activation des cellules NK (*Hervas-Stubbs S et al. 2011*). Quelques études ont montré que les cellules NK étaient activées chez la souris et chez des patients infectés par le CHIKV mais leur rôle dans la physiopathologie n'a pas été plus étudié (*Gardner J et al. 2010; Hoarau JJ et al. 2010*).

Nos travaux ont montré qu'en plus de les activer, le CHIKV module le répertoire des cellules NK. Le virus induit l'expansion et l'activation d'une population de cellules NK spécifiquement différenciées qui expriment fortement les récepteurs NKG2C, ILT-2, CD57, certains KIRs reliés aux molécules HLA-C et les marqueurs d'activation HLA-DR et CD69, mais qui expriment faiblement les récepteurs NKG2A, CD161, NKp30 et NKp46. La modulation du répertoire NK est transitoire, comme en témoigne un retour aux valeurs initiales pour la plupart des récepteurs étudiés après l'infection. Ceci reflète par conséquent la pression exercée par le CHIKV sur cette population. L'expression de NKG2C a été observée dans d'autres infections telles que les infections à VIH-1, VHB, VHC ou Hantavirus et a été reliée au statut séropositif HCMV des patients (*Mela CM et al. 2005; Oliviero B et al. 2009; Björkström N et al. 2011*). Malheureusement, nous n'avons pas pu établir cette corrélation dans le cadre de notre étude puisque la prévalence pour le HCMV est proche de 100% en Afrique (*Cannon MJ et al. 2010*). L'étude longitudinale des cellules NK a mis en évidence une persistance des marqueurs NKG2C et CD57 chez cinq patients en phase de convalescence. De façon intéressante, ces cinq patients présentaient une forme chronique avec des douleurs articulaires en association avec des charges virales élevées en phase aiguë par rapport à d'autres patients. Les mécanismes à l'origine de cette persistance restent inconnus mais on peut

supposer que la phase aiguë affecte l'évolution des réponses et que le maintien d'un environnement inflammatoire induit la persistance de cette population.

En plus d'une corrélation avec la charge virale, nous avons également montré que l'expression de NKG2C était corrélée à l'expression d'un récepteur KIR spécifique: NKG2C est directement corrélé à l'expression de KIR2DL2/2DL3 qui reconnaît les molécules de type HLA-C1, et inversement corrélé à l'expression de KIR2DL1 qui reconnaît les molécules de type HLA-C2. L'expansion d'une telle population NKG2C, associée à l'expression unique d'un récepteur KIR pourrait permettre d'éviter l'auto-réactivité et ainsi limiter un phénomène d'immunopathologie chez ces patients.

En plus de ces modifications phénotypiques majeures, nous avons montré que le CHIKV était aussi responsable de modifications fonctionnelles. Une sélection de cellules NK matures et activées (exprimant NKp44, CD69 et HLA-DR) sont fortement cytotoxiques, parallèlement à une diminution de cellules NK productrices d'IFN- $\gamma$ . Pourtant, d'autres travaux ont montré que le plasma de plusieurs patients infectés par le CHIKV présentait des concentrations élevées d'IFN- $\gamma$  (*Wauquier N et al. 2011; Hoarau JJ et al. 2010*). Cette production peut venir des DCs et/ou des Lymphocytes T qui sécrètent également cette cytokine. Cependant, ceci indique que l'IFN- $\gamma$  ne joue qu'un rôle mineur dans les phases initiales de l'infection contrairement à la fonction cytolytique des cellules NK qui semble primordiale dans le contrôle précoce de l'infection.

Ainsi, ces résultats nous indiquent que le CHIKV induit l'expansion clonale d'une population de cellules NK cytotoxiques, co-exprimant NKG2C et KIR2DL2/2DL3 en corrélation avec la charge virale, suggérant ainsi un rôle bénéfique des cellules NK dans l'élimination du virus.

L'analyse génotypique des récepteurs KIRs en combinaison avec l'analyse génotypique de leurs ligands, les molécules du HLA de classe-I, a permis d'associer certains profils génétiques avec une susceptibilité au CHIKV. La comparaison des génotypes KIRs entre les patients infectés et les patients contrôles a montré une diminution de la présence des gènes KIR2DL1 et KIR3DL1 chez les patients infectés en comparaison avec le groupe contrôle. Les résultats phénotypiques avaient indiqué une diminution de l'expression du récepteur KIR2DL1 ce qui va dans le sens d'une présence plus faible de ce gène chez ces patients. En parallèle, le génotypage HLA a montré que les patients infectés par le CHIKV présentaient une augmentation significative de la fréquence des molécules HLA-C2, principalement des individus homozygotes C2/C2 par rapport au

groupe contrôle. Les molécules HLA-C sont départagées en deux groupes, en fonction de leur spécificité pour les récepteurs KIR ; les molécules HLA-C1 se lient aux récepteurs KIR2DL2/2DL3 et les molécules HLA-C2 au récepteur KIR2DL1 (*Lanier LL et al. 2005*). Ainsi, l'analyse des combinaisons KIR/HLA nous a montré que la combinaison génétique du KIR2DL2/2DL3 avec HLA-C1 était similaire à celle observée chez les individus contrôles, mais que la combinaison KIR2DL1 et HLA-C2 était significativement plus importante chez les patients infectés. Un modèle *in vitro* d'infection de cellules cibles par le virus influenza a montré que les cellules NK des individus homozygotes KIR2DL3/HLA-C1 étaient activées plus rapidement que les cellules des individus homozygotes KIR2DL1/HLA-C2 (*Ahlenstiel G et al. 2008*). Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que la combinaison préférentielle de KIR2DL1/HLA-C2 pourrait intervenir comme mécanisme de régulation de l'activité NK et avoir un effet protecteur puisque nous avons montré une corrélation inverse de KIR2DL1 avec la charge virale au cours de la première étude (*Petitdemange C et al. 2011*).

L'immunité cellulaire adaptative, qui comprend principalement les lymphocytes T-CD4<sup>+</sup> et T-CD8<sup>+</sup>, représente un élément crucial suite à la réponse innée. Nous nous sommes ainsi intéressé à caractériser l'état d'activation et l'état de différenciation des LT chez les patients infectés par le CHIKV.

L'analyse des marqueurs d'activation CD69 et HLA-DR ont montré que les LT-CD8<sup>+</sup> et LT-CD4<sup>+</sup> étaient activés après infection. L'état de différenciation de ces cellules montre une première augmentation significative des LT-CD8<sup>+</sup> effecteurs suivie de celle des LT-CD4<sup>+</sup> effecteurs. Les résultats observés durant la période de J0 à J12 de l'infection suggèrent un rôle protecteur classique des LT-CD8<sup>+</sup> et LT-CD4<sup>+</sup>. Cependant, nous avons observé que l'état d'activation de ces cellules et la fréquence de cellules effectrices ne retournent pas à un niveau normal en phase de convalescence (J>30).

Récemment, les travaux de *Teo et al.* ont suggéré un rôle potentiel des LT-CD4<sup>+</sup> dans la pathogénèse. Ils ont montré que la présence de LT-CD4<sup>+</sup> infiltrant au niveau des articulations pourrait être responsable, en partie, des douleurs articulaires observées chez les patients en phase chronique (*Teo TH et al. 2013*).

L'analyse des tissus synoviaux de macaques infectés présentant un œdème des articulations a montré la présence du CHIKV dans les cellules mononuclées, et dans une moindre mesure dans les cellules endothéliales (*Labadie K et al. 2010*). Les travaux de *Gardner et al.* chez la souris confirment cette persistance à long-terme de CHIKV dans



les macrophages au niveau des lésions articulaires, associés à une transcription d'IFN- $\gamma$  et de MCP-1, probablement à l'origine de l'activation et du recrutement des macrophages (*Gardner J et al. 2010*).

Ainsi, la persistance de foyers infectieux au niveau du liquide synovial pourrait expliquer la présence des LT-CD4<sup>+</sup>. De plus, *Hoarau et al.* ont montré que des taux d'IL-12 et d'IFN- $\alpha$  restaient élevés chez les patients chroniques, constituant un environnement favorable à la persistance et à l'activation des cellules de l'immunité innée, avec la présence de cellules NK dans les liquides synoviaux des patients chroniques (*Hoarau JJ et al. 2010*).

Les gîtes sanctuaires du CHIKV pourraient expliquer la persistance chez certains patients de cellules NK matures exprimant NKG2C et CD57 ainsi que des niveaux élevés de lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> et TCD4<sup>+</sup> effecteurs. Il reste à comprendre comment le virus réussit dans certains cas à persister au niveau de ces réservoirs cellulaires. On peut supposer que le virus ait mis en place des mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire. Des travaux ont suggéré que le CHIKV aurait pu développer des mécanismes de contrôle de l'apoptose, qui lui permettrait de se cacher dans les corps apoptotiques afin de se disséminer dans les cellules voisines (*Jaffar-Bandjee MC et al. 2012; Joubert PE et al. 2012*). *Hoarau et al.* ont établi une corrélation entre la charge virale en phase aiguë et les formes chroniques et ont été également suggéré un lien entre une réponse inflammatoire Th1 élevée en phase aiguë avec le développement de formes chroniques (*Hoarau JJ et al. 2010*).

Cependant, les formes chroniques ne sont pas retrouvées chez tous les patients et il est certain que les facteurs liés à l'hôte tiennent aussi un rôle important dans la cause de ces formes cliniques. Plusieurs études ont notamment montré que l'âge était un facteur de risque au développement de formes chroniques. Les patients âgés de plus de 40 ans sont ainsi plus sujets au développement de douleurs articulaires (*Brighton SW et al. 1984; Dupuis-Maguiraga L et al. 2012*).

Malgré une réponse immune effectrice, il semblerait qu'une mauvaise régulation de la réponse immunitaire participe au maintien d'un environnement inflammatoire qui jouerait un rôle majeur dans la persistance des douleurs articulaires. Néanmoins, Les facteurs à l'origine de cette dysrégulation et à la persistance du virus restent encore obscurs.

## **2. Implication des cellules NK, des lymphocytes T et des cellules dendritiques au cours de l'infection par le DENV-2**

Les recherches sur la Dengue ont surtout porté sur l'identification des mécanismes responsables de la perméabilité vasculaire et des hémorragies observés au cours des formes de dengue sévère. De nombreuses études se sont concentrées sur l'analyse de la réponse cellulaire T dans le cadre des infections secondaires alors que les réponses immunes impliquées au cours d'une primo-infection ont été moins étudiées.

Le DENV a été récemment répertorié au Gabon (2007) et les patients que nous avons suivis n'avaient jamais été en contact avec le virus (*Leroy EM et al. 2009*). Seuls 3 cas de dengue sévère ont été répertoriés au cours de cette épidémie. Ainsi, les patients que nous avons analysés étaient des patients en primo-infection de DENV-2.

De la même manière que dans l'infection par le CHIKV, on observe après infection par le DENV une forte réponse des IFN-I. Des niveaux élevés d'IFN- $\alpha$  plasmatique ont été observés chez les patients infectés (*Kurane et al. 1993; Becquart P et al. 2010*). L'importance de la réponse IFN-I a aussi été mise en évidence *in vivo*, dans un modèle de souris où l'on observe une augmentation de la mortalité chez des souris knock-out pour le récepteur à l'IFN- $\alpha/\beta$  (*Johnson AJ et al. 1999*). Néanmoins, l'action des IFN-I reste limitée une fois que la réplication virale est établie. Le DENV est capable d'atteindre des titres viraux élevés suggérant la mise en place d'un mécanisme d'échappement à la réponse IFN-I (*Sudiro TM et al. 2001*).

La réponse des IFN-I permet cependant l'activation des cellules NK. Les données se rapportant au rôle des cellules NK dans la dengue restent assez limitées. Une étude a montré qu'il y avait une augmentation significative de la fréquence et de l'activation des cellules NK chez des patients ayant développé une forme de dengue classique (*Azaredo EL et al. 2006*). *Hershkovitz et al.* ont démontré l'existence d'une interaction entre le récepteur NKp44 et la protéine d'enveloppe E du virus qui engendrerait une activation des cellules NK (*Hershkovitz O et al. 2009*). Plusieurs études ont également montré une implication de l'ADCC mais son rôle reste controversé: certaines études suggérant un rôle protecteur tandis que d'autres ont associé ce phénomène au développement de formes sévères (*Garcia G et al. 2006 ; Kurane I et al. 1984; Laoprasopwattana K et al. 2007*). Enfin, il a été mis en évidence que le DENV induit l'augmentation des molécules du CMH de classe-I à la surface des cellules infectées, ce qui pourrait représenter un

mécanisme d'échappement à la reconnaissance par les cellules NK (*HersHKovitz O et al. 2008; Yossef R et al. 2012*). Il semblait donc intéressant de caractériser phénotypiquement et fonctionnellement les cellules NK afin de pouvoir comprendre le rôle bénéfique ou délétère de ces cellules dans le contrôle et/ou l'évolution de la maladie (*Petitdemange et al. Review en annexe*).

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression phénotypique des récepteurs à la surface des cellules NK de patients infectés par le DENV-2. Nous avons pu observer que les modulations des récepteurs NK étaient fortement similaires à celles observées après l'infection par le CHIKV. De la même manière, on observe l'expansion d'une population de cellules NK activées (CD69, HLA-DR, NKp44) et différenciées, exprimant NKG2C, ILT-2, CD57 mais présentant une diminution de l'expression des récepteurs NKG2A, CD161, NKp30 et NKp46. Il est par contre important de noter que nous avons pu observer une association directe du récepteur KIR2DL1 et indirecte de KIR2DL2/2DL3, à l'inverse de ce qui avait été observé chez les patients infectés par le CHIKV. Enfin, la persistance de cellules NK co-exprimant NKG2C et CD57 en phase de convalescence n'a pas été observée chez les patients infectés par le DENV-2 contrairement à ce que nous avons reporté chez les patients infectés par le CHIKV.

La comparaison de la fréquence des gènes KIRs chez les patients infectés par le DENV-2 a mis en évidence une diminution significative du gène KIR3DL1. L'analyse des combinaisons KIR/HLA a mis en évidence une association positive entre KIR3DL1 et HLA-Bw4-80Ile, comme nous l'avons également reporté précédemment chez les patients infectés par le CHIKV. Cette association a aussi été décrite chez des patients infectés par le VIH-1, associé à une sévérité de la maladie (*Parham P et al. 2005*). Très récemment, une étude a été réalisée sur une cohorte de patients Brésiliens infectés par le DENV-3. Il a également été reporté une association entre KIR3DL1 et les molécules HLA-Bw4. En plus, ils ont mis en évidence des variations de la fréquence d'autres gènes KIRs: KIR2DL2, KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3 et KIR2DS5. Il semblerait donc que les patients d'haplotype B présentent une susceptibilité accrue au développement de la dengue. (*Beltrame LM et al. 2013*). L'ensemble de ces données suggère qu'il existe des prédispositions génétiques au développement de la dengue. Il est important de noter que cela pourrait être dépendant de l'origine ethnique des patients et/ou du sérotype de DENV. Cette approche permet néanmoins de définir des populations à risques et il serait intéressant de regarder s'il existe une association relative au développement des formes sévères.

Globalement, les résultats de ces travaux montrent que le DENV exerce une pression sur les cellules NK. Nous avons mis en évidence l'expansion de cellules NK activées et différenciées suggérant leur implication dans le contrôle de l'infection par le DENV-2. Cependant, des études ont suggéré que les DCs, identifiées comme les cellules cibles du DENV, sur-expriment les molécules HLA de classe-I, leur permettant d'échapper à la lyse par les cellules NK (*Martins de ST et al. 2012*). Afin de mieux comprendre le rôle de ces interactions, nous avons étudié la nature des couples récepteurs ligands impliqués dans ces interactions en développant un modèle *in vitro* d'infection de DCs infectés par le DENV-2.

Dans un premier temps nous avons caractérisé les modulations exercées par le virus sur l'activation, la maturation et l'expression des ligands des récepteurs NK à la surface des DCs. Le DENV-2 induit la maturation et l'activation des DCs après infection comme l'indique l'augmentation des marqueurs d'activation CD86, CD80, CD83 et HLA-DR. De manière intéressante, nous avons pu remarquer que ces modifications étaient plus importantes à la surface des DCs « bystander » (voisines) qu'à la surface des DCs infectées par le DENV-2. Cela avait été précédemment reporté dans une autre étude où cette observation a été reliée à l'apoptose des cellules infectées (*Palmer DR et al. 2005*).

Nous avons également répertorié un certain nombre de modifications en ce qui concerne l'expression des ligands des récepteurs NK. Nous avons ainsi observé une diminution des ligands pour NKp30 et NKp46, normalement exprimés à la surface des DCs immatures. Cette diminution est aussi observée à la surface des DCs après stimulation par le LPS et a également été reporté à la surface de DCs infectés par le HCMV (*Magri G et al. 2011*). A l'inverse, nous avons constaté une augmentation du ligand de NKp44 et ce seulement à la surface des DCs infectées. Concernant les ligands de NKG2D, ULBP1-3 et MICA-B, nous avons observé une augmentation de MICA/B à la surface des DCs infectées mais pas d'augmentation des ULBP1-3. Nous avons noté, comme cela a déjà été reporté au cours d'autres travaux, une augmentation des molécules HLA-A, -B et -C et pour la première fois nous avons mis en évidence l'augmentation du HLA-E à la surface des cellules infectées. Ainsi, l'ensemble des modifications observées converge en faveur d'un échappement à la lyse des cellules NK.

Afin de mesurer les fonction effectrices des cellules NK vis-à-vis des cibles infectées nous avons mis en place un modèle *in vitro* de co-culture NK/DCs autologues. Nous avons observé que les DCs immatures non infectées sont en mesure d'activer les fonctions cytotoxiques des cellules NK, comme cela a été précédemment démontré

(*Moretta A et al. 2005; Lopez-Botet M et al. 2000*), sans pour autant produire des quantités significatives d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ . Comme contrôle positif, nous avons utilisé des DCs stimulées par le LPS où les cellules NK sont cytotoxiques et produisent des cytokines en faible proportion. Par contre, en présence des cellules infectées par le DENV-2, nous avons observé une diminution de la cytotoxicité associée à une forte production d'IFN- $\gamma$  en absence de production de TNF- $\alpha$ .

Ainsi, à l'inverse de ce que l'on a pu observer chez les patients infectés par le CHIKV, les cellules NK en présence de cellules infectées par le DENV-2 sont faiblement cytotoxiques mais produisent de grandes quantités d'IFN- $\gamma$ .

La sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK joue un rôle important dans la différenciation des lymphocytes T et permet d'orienter la réponse T vers un profil de type Th1 (*Martin-Fontecha A et al. 2004*). L'étude des lymphocytes T chez les patients infectés a effectivement montré une activation plus importante des LT-CD8<sup>+</sup> par rapport aux LT-CD4<sup>+</sup> ainsi qu'une augmentation significative des LT-CD8<sup>+</sup> effecteurs par rapport aux LT-CD4<sup>+</sup> effecteurs. Ainsi, dans le cadre d'une primo-infection, il semble qu'une réponse de type LT-CD8<sup>+</sup> soit bénéfique et participe activement au contrôle de l'infection. Dans le cas d'une infection secondaire, ces LT cytotoxiques ne fournissent qu'une immunité partielle contre l'infection par un nouveau sérotype de DENV. Dans cette situation, les LT cytotoxiques ne tuent pas de manière effective mais relarguent de grandes quantités de cytokines, qui sont certainement la cause des dommages inflammatoires et de la « fuite capillaire » qui contribuent au développement des formes de dengue sévères.

Suite à une primo-infection par le DENV, les réponses innées et adaptatives se combinent pour éliminer efficacement le virus. Nos travaux ont montré que les cellules NK étaient activées de manière précoce après l'infection par le DENV et produisaient majoritairement de l'IFN- $\gamma$ , participant ainsi à l'activation des réponses adaptatives. L'échappement à la lyse des cellules NK mise en place par les cellules infectées pourrait néanmoins favoriser une propagation du virus et une présentation accrue aux LT-CD8<sup>+</sup> par le biais des molécules du CMH-I qui sont surexprimées

### 3. Les coinfections CHIKV/DENV-2

La co-circulation du CHIKV et DENV-2 n'est pas un phénomène nouveau. La co-circulation des deux virus a été répertoriée dans différentes aires géographiques : Inde, Sri Lanka, Gabon, Cameroun, Madagascar, Malaisie, Indonésie, Singapour et Thaïlande (*Chahar HS et al. 2009; Hapuarachchi HA et al. 2008; Leroy EM et al. 2007; Nayar SK et al. 2007 ; Schilling SP et al. 2009*). En 1964, les deux virus sont isolés pour la première fois dans le sérum d'un patient coinfecté en Inde du Sud (*Myers RM, et al. 1967*). En 2007, au Gabon, la première épidémie simultanée des deux maladies est reportée sur le continent Africain et des cas de coinfection sont observés (*Leroy EM et al. 2009*). En 2010, la deuxième double épidémie de CHIKV et DENV-2 qui sévit au Gabon permet aux chercheurs de mettre en évidence la présence des deux virus chez un moustique *Aedes albopictus*. L'expansion géographique actuelle des moustiques *Aedes* pourrait amener à une augmentation des cas de coinfections CHIKV/DENV-2.

L'analyse des symptômes cliniques des patients coinfectés au cours de l'épidémie de 2010 au Gabon n'a pas mis en évidence la présence de complications particulières par rapport aux patients monoinfectés par le CHIKV ou DENV-2 (*Caron M et al. 2012*). Il fut même montré une diminution des douleurs articulaires chez des patients coinfectés au cours d'une épidémie ayant eu lieu au Bengale en Inde (*Taraphdar D et al. 2012*).

Cependant, l'analyse des charges virales chez les patients coinfectés au Gabon a permis de distinguer deux groupes de patients coinfectés: (i) un groupe de patients présentaient des charges virales de DENV-2 élevées mais de CHIKV faibles, suggérant un prélèvement des patients en phase aiguë de l'infection par le DENV-2, à un stade très précoce ou tardif de l'infection par le CHIKV. Alternativement, les faibles charges virales de CHIKV observées pourraient également venir d'une inhibition de la réplication virale du CHIKV dû à une compétition entre les deux virus. Il est intéressant de noter que le phénomène inverse, c.-à-d., une forte charge virale CHIKV et faible charge virale DENV-2 n'a été observée chez aucun des patients coinfectés (ii) un deuxième groupe de patients présentaient des charges virales CHIKV et DENV-2 équivalentes, mais plus faibles que chez les patients monoinfectés. Dans ce cas on peut supposer que le prélèvement ait été fait en phase aiguë des deux infections suite à une transmission des deux virus par un seul moustique ou par deux moustiques différents mais à des temps rapprochés (*Caron M et al. 2012*). Ces résultats amènent à émettre l'hypothèse d'une possible compétition virale existe entre les deux virus.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à la caractérisation phénotypiquement des cellules NK et des LT chez ces patients coinfectés, en comparaison avec les résultats obtenus précédemment chez les patients mono-infectés par le CHIKV ou le DENV-2.

Nous avons observé chez ces patients la même expansion de cellules NK que chez les patients infectés par le CHIKV ou DENV-2. De manière surprenante, nous avons retrouvé aussi bien des cellules NK exprimant KIR2DL2/2DL3 que de cellules NK exprimant KIR2DL1, suggérant une double expansion clonale.

Par contre, nous avons remarqué que la réponse des lymphocytes T chez ces patients coinfectés était plus proche de celle observée chez les patients infectés par le DENV-2 que de celle des patients infectés par le CHIKV. Néanmoins, le nombre d'échantillons que nous avons pu analyser était trop faible pour pouvoir définitivement conclure. Il faudrait pouvoir reproduire ces expériences avec une cohorte plus importante de patients coinfectés. De plus, ces résultats obtenus à partir des analyses phénotypiques ne permettent pas de conclure sur l'existence d'une compétition virale.

Une autre équipe s'est également intéressée aux mécanismes des coinfections CHIKV/DENV et a mis en place un modèle de coinfection CHIKV/DENV-3 *in vitro* en utilisant la lignée cellulaire C6/36 d'*Aedes albopictus*, une lignée susceptible à l'infection par le CHIKV et le DENV. Dans ce modèle, ils ont montré qu'il existait une compétition entre les deux virus et que cela dépendait du titre viral initial. Ils ont observé qu'une coinfection avec un titre de CHIKV élevé et de DENV-3 faible a pour conséquence une infection positive pour le CHIKV et DENV-3 alors qu'une coinfection avec un titre de DENV-3 élevé et de CHIKV faible n'est positive que pour le DENV-3. Ces travaux suggèrent donc que la compétition virale serait dépendante du titre viral (**Rutcharin P et al. 2011 South As J trop Med Public Health**).

Néanmoins, en condition physiologique il semble plus probable que le titre viral dépende principalement de la capacité du virus à se répliquer. Si des doses virales différentes peuvent être transmises par le moustique elles sont néanmoins régulées par ce dernier et c'est une fois transmis à l'individu que le virus réussira plus ou moins à se répliquer et à atteindre des charges virales élevées.

Afin de mieux comprendre les mécanismes liés à la coinfection dans un modèle pertinent, nous avons mis en place un modèle de coinfection expérimental CHIKV/DENV-2 chez le macaque rhésus afin de déterminer le rôle joué par les délais d'infection (à dose infectieuse constante) afin d'étudier le déclenchement de la réponse immune en relation avec la compétition virale. Plusieurs groupes d'animaux ont été

définis afin de voir si l'inoculation simultanée ou différée des deux virus pouvait agir sur l'établissement de la réponse immune. Les échantillons de ce protocole expérimental n'ont pas encore été traités et nous ne pouvons donc pas conclure pour le moment à la question posée.

La compétition virale peut avoir un impact important sur l'émergence des maladies infectieuses. Un des mécanismes de l'émergence d'une maladie est le déplacement d'une souche virale de faible virulence par une autre de plus forte virulence. Comprendre ce phénomène est certainement majeur afin de prévenir l'établissement d'épidémies avec le développement de formes plus sévères. Cela a par exemple été montré dans le cas d'une co-circulation deux souches de DENV-3 au Sri Lanka où la souche la plus virulente a fini par s'établir et a engendré des formes plus sévères de la maladie.



# **CONCLUSIONS GENERALES / PERSPECTIVES**

## Conclusions générales et perspectives

L'immunité innée constitue la première ligne de défense majeure contre l'infection par le CHIKV ou par le DENV et contribue à l'installation de l'immunité spécifique secondaire. Au cours de ces deux infections, on observe une disparition de la virémie dans les 5 à 10 premiers jours qui suivent l'apparition des symptômes, ainsi que, pour la majorité des patients, une disparition du virus dans les tissus. La réponse anticorps dirigée contre les protéines E1, E2 et la capsid du CHIKV et permet de prévenir toute réinfection par une nouvelle piqûre de moustique ou la recirculation virale à partir de gîtes sanctuaires. Par contre, la dengue induit une immunité durable uniquement vis-à-vis du sérotype infectant, sans immunité croisée à long-terme vis-à-vis des autres sérotypes.

Il existe une variabilité de formes cliniques : des formes asymptomatiques, des formes classiques de Dengue et Chikungunya mais aussi des formes sévères de Dengue et des formes chroniques de Chikungunya. Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes à l'origine des dérèglements de la réponse immunitaire afin de pouvoir développer des stratégies thérapeutiques ou vaccinales efficaces.

L'analyse phénotypique des cellules NK de patients infectés par le CHIKV ou DENV-2 a mis en évidence de nombreuses similitudes quant aux modulations des récepteurs NK induites par ces deux virus. Dans les deux cas, on observe l'expansion de cellules NK très activées (CD69+, HLA-DR+, NKp44+) et différenciées (NKG2C+, CD57+, ILT-2+) associée à l'expression d'un KIR inhibiteur spécifique, KIR2DL2/2DL3 et KIR2DL1 chez les patients respectivement infectés par le CHIKV et le DENV-2 respectivement.

L'étude fonctionnelle des cellules NK a mis en évidence le fait que les cellules NK des patients infectés par le CHIKV étaient fortement cytotoxiques mais faiblement productrices d'IFN- $\gamma$  en présence de cellules cibles alors que, à l'inverse, le modèle d'infection *in vitro* par le DENV-2 a montré que les cellules NK en présence de cellules dendritiques infectées par le DENV-2 étaient peu cytotoxiques mais produisaient de grande quantité d'IFN- $\gamma$  suggérant que ces deux virus pourraient mobiliser les cellules NK de façon diamétralement différentes, avec des conséquences directes sur la mise en place de la réponse adaptative. Ceci a été plus particulièrement illustré dans l'analyse

phénotypique des cellules T qui a montré des profils d'activation et de différenciation différents en fonction du virus impliqué.

Ces travaux ont permis d'apporter des informations précieuses sur l'évolution des cellules NK et des cellules T au cours des phases précoces et tardives de ces deux infections. Néanmoins, nous n'avons pas pu avoir accès au cours de cette épidémie à des échantillons de patients présentant différentes formes cliniques. Seuls 3 patients infectés par le DENV ont développé des formes de dengue sévère et le suivi des patients infectés par le CHIKV de manière chronique n'a pas pu être réalisé. Dans une étude ultérieure, il serait très intéressant de pouvoir comparer la réponse des cellules NK et des cellules T entre des patients asymptomatiques et ceux développant des formes chroniques de Chikungunya ou des patients présentant des formes de Dengue sévères.

Dans l'infection par le CHIKV, plusieurs études ont évoqué la persistance du virus au niveau des macrophages synoviaux conduisant à la persistance d'un environnement inflammatoire qui pourrait être à l'origine des douleurs articulaires observées chez les patients en phase chronique. Il serait intéressant de mettre en place un modèle *in vitro* de co-culture de cellules NK et de macrophages infectés par le CHIKV afin d'étudier les fonctions des cellules NK vis-à-vis de ces cellules cibles et déterminer si un mécanisme d'échappement viral est mis en place par des macrophages infectés par le CHIKV pour éviter leur lyse par les cellules NK.

Nous nous sommes intéressés au cours de ce travail de thèse à la réponse des cellules NK et à la mise en place de la réponse cellulaire T. Il serait également intéressant de pouvoir caractériser phénotypiquement et fonctionnellement la réponse des lymphocytes B. En phase aiguë, ces deux infections sont associées à de très fortes productions d'anticorps ; il serait donc intéressant de déterminer la fonction d'ADCC médiée par les cellules NK de ces patients et/ou dans un modèle d'infection *in vitro*. En effet, aucune étude n'a exploré cette fonction au cours de l'infection par le CHIKV et son rôle reste controversé dans l'infection par le DENV (cf **Review Dengue en Annexe**).

Enfin, les résultats des coinfections chez les macaques Rhésus vont être exploités. Il est prévu dans le cadre de cette étude de :

- (i) Quantifier la charge virale pour chaque virus afin de caractériser l'évolution de la réplication virale dans chaque groupe de coinfection.

(ii) Caractériser phénotypiquement les différentes populations cellulaires afin d'obtenir une cinétique précise de la mise en place des réponses immunes selon le type de coinfections

(iii) Analyser l'évolution de la production des cytokines, chimiokines et autres marqueurs de l'inflammation dans le sérum de chaque groupe de coinfections

(iv) Étudier des fonctions effectrices des cellules T spécifiques par ELISPOT afin de déterminer si une réponse est préférentiellement impliquée selon le type de coinfections.

Réaliser une étude par puce à ADN à partir de chaque type de coinfections afin de mettre en évidence les gènes en corrélation avec les charges virales et les autres paramètres clinico-biologiques.

**- REFERENCES -**

Ahlenstiel, Golo, Maureen P Martin, Xiaojiang Gao, Mary Carrington, and Barbara Rehermann. "Distinct KIR/HLA Compound Genotypes Affect the Kinetics of Human Antiviral Natural Killer Cell Responses." *The Journal of Clinical Investigation* 118, no. 3 (March 2008): 1017–26. doi:10.1172/JCI32400.

Akahata, Wataru, Zhi-Yong Yang, Hanne Andersen, Siyang Sun, Heather A Holdaway, Wing-Pui Kong, Mark G Lewis, et al. "A Virus-like Particle Vaccine for Epidemic Chikungunya Virus Protects Nonhuman Primates against Infection." *Nature Medicine* 16, no. 3 (March 2010): 334–38. doi:10.1038/nm.2105.

Alcon, Sophie, Antoine Talarmin, Monique Debruyne, Andrew Falconar, Vincent Deubel, and Marie Flamand. "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections." *Journal of Clinical Microbiology* 40, no. 2 (February 2002): 376–81.

Allavena, P, G Bianchi, D Zhou, J van Damme, P Jílek, S Sozzani, and A Mantovani. "Induction of Natural Killer Cell Migration by Monocyte Chemotactic Protein-1, -2 and -3." *European Journal of Immunology* 24, no. 12 (December 1994): 3233–36. doi:10.1002/eji.1830241249.

An, Jing, De-Shan Zhou, Jun-Lei Zhang, Hatue Morida, Jia-Li Wang, and Kotaro Yasui. "Dengue-Specific CD8+ T Cells Have Both Protective and Pathogenic Roles in Dengue Virus Infection." *Immunology Letters* 95, no. 2 (September 2004): 167–74. doi:10.1016/j.imlet.2004.07.006.

Andrews, Daniel M, Anthony A Scalzo, Wayne M Yokoyama, Mark J Smyth, and Mariapia A Degli-Esposti. "Functional Interactions between Dendritic Cells and NK Cells during Viral Infection." *Nature Immunology* 4, no. 2 (February 2003): 175–81. doi:10.1038/ni880.

Anfossi, Nicolas, Scott H Robbins, Sophie Ugolini, Philippe Georgel, Kasper Hoebe, Cécile Bouneaud, Catherine Ronet, et al. "Expansion and Function of CD8+ T Cells Expressing Ly49 Inhibitory Receptors Specific for MHC Class I Molecules." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173, no. 6 (September 15, 2004): 3773–82.

Angelini, Paola, Alba Carola Finarelli, Giuliano Silvi, Bianca Maria Borrini, Gabriella Frasca, Andrea Mattivi, Erika Massimiliani, et al. "[Chikungunya emergency in Emilia-Romagna: learning through experience]." *Epidemiologia e prevenzione* 32, no. 4–5 (October 2008): 258–63.

Ansumana, Rashid, Kathryn H Jacobsen, Tomasz A Leski, Andrea L Covington, Umaru Bangura, Mary H Hodges, Baochuan Lin, et al. "Reemergence of Chikungunya Virus in Bo, Sierra Leone." *Emerging Infectious Diseases* 19, no. 7 (July 2013): 1108–10. doi:10.3201/eid1907.121563.

Anthony, Desiree A, Daniel M Andrews, Sally V Watt, Joseph A Trapani, and Mark J Smyth. "Functional Dissection of the Granzyme Family: Cell Death and Inflammation." *Immunological Reviews* 235, no. 1 (May 2010): 73–92. doi:10.1111/j.0105-2896.2010.00907.x.

Arankalle, Vidya A, Shubham Shrivastava, Sarah Cherian, Rashmi S Gunjekar, Atul M Walimbe, Santosh M Jadhav, A B Sudeep, and Akhilesh C Mishra. "Genetic Divergence of Chikungunya Viruses in India (1963-2006) with Special Reference to the 2005-2006 Explosive Epidemic." *The Journal of General Virology* 88, no. Pt 7 (July 2007): 1967–76. doi:10.1099/vir.0.82714-0.

Genetic Divergence of Chikungunya Viruses in India (1963-2006) with Special Reference to the 2005-2006 Explosive Epidemic." *The Journal of General Virology* 88, no. Pt 7 (July 2007): 1967–76. doi:10.1099/vir.0.82714-0.

Armién, Blas, Jose A Suaya, Evelia Quiroz, Binod K Sah, Vicente Bayard, Loyd Marchena, Cornelio Campos, and Donald S Shepard. "Clinical Characteristics and National Economic Cost of the 2005 Dengue Epidemic in Panama." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79, no. 3 (September 2008): 364–71.

Arnon, T I, M Lev, G Katz, Y Chernobrov, A Porgador, and O Mandelboim. "Recognition of Viral Hemagglutinins by NKp44 but Not by NKp30." *European Journal of Immunology* 31, no. 9 (September 2001): 2680–89. doi:10.1002/1521-4141(200109)31:9<2680::AID-IMMU2680>3.0.CO;2-A.

Ashour, Joseph, Maudry Laurent-Rolle, Pei-Yong Shi, and Adolfo García-Sastre. "NS5 of Dengue Virus Mediates STAT2 Binding and Degradation." *Journal of Virology* 83, no. 11 (June 2009): 5408–18. doi:10.1128/JVI.02188-08.

Azeredo, E L, L M De Oliveira-Pinto, S M Zagne, D I S Cerqueira, R M R Nogueira, and C F Kubelka. "NK Cells, Displaying Early Activation, Cytotoxicity and Adhesion Molecules, Are Associated with Mild Dengue Disease." *Clinical and Experimental Immunology* 143, no. 2 (February 2006): 345–56. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.02996.x.

Bajénoff, Marc, Béatrice Breart, Alex Y C Huang, Hai Qi, Julie Cazareth, Veronique M Braud, Ronald N Germain, and Nicolas Glaichenhaus. "Natural Killer Cell Behavior in Lymph Nodes Revealed by Static and Real-Time Imaging." *The Journal of Experimental Medicine* 203, no. 3 (March 20, 2006): 619–31. doi:10.1084/jem.20051474.

Baker, S J, and E P Reddy. "Modulation of Life and Death by the TNF Receptor Superfamily." *Oncogene* 17, no. 25 (December 24, 1998): 3261–70. doi:10.1038/sj.onc.1202568.

Ballas, Z K, J M Turner, D A Turner, E A Goetzman, and J D Kemp. "A Patient with Simultaneous Absence of 'Classical' Natural Killer Cells (CD3-, CD16+, and NKH1+) and Expansion of CD3+, CD4-, CD8-, NKH1+ Subset." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 85, no. 2 (February 1990): 453–59.

Banchereau, J, and R M Steinman. "Dendritic Cells and the Control of Immunity." *Nature* 392, no. 6673 (March 19, 1998): 245–52. doi:10.1038/32588.

Basu, Atanu, and Umesh C Chaturvedi. "Vascular Endothelium: The Battlefield of Dengue Viruses." *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 53, no. 3 (August 2008): 287–99. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00420.x.

Battistini, L, G Borsellino, G Sawicki, F Poccia, M Salvetti, G Ristori, and C F Brosnan. "Phenotypic and Cytokine Analysis of Human Peripheral Blood Gamma Delta T Cells Expressing NK Cell Receptors." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 159, no. 8 (October 15, 1997): 3723–30.

Bauer, S, V Groh, J Wu, A Steinle, J H Phillips, L L Lanier, and T Spies. "Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA." *Science (New York, N.Y.)* 285, no. 5428 (July 30, 1999): 727–29.

Baychelier, Florence, Alexis Sennepin, Myriam Ermonval, Karim Dorgham, Patrice Debré, and Vincent Vieillard. "Identification of a Cellular Ligand for the Natural Cytotoxicity Receptor NKp44." *Blood* 122, no. 17 (October 24, 2013): 2935–42. doi:10.1182/blood-2013-03-489054.

BEADLE, L D, G C MENZIES, G R HAYES Jr, F J VON ZUBEN Jr, and R B EADS. "St. Louis Encephalitis in Hidalgo County, Texas: Vector Evaluation and Control." *Public Health Reports* 72, no. 6 (June 1957): 531–35.

Beck, S, and B G Barrell. "Human Cytomegalovirus Encodes a Glycoprotein Homologous to MHC Class-I Antigens." *Nature* 331, no. 6153 (January 21, 1988): 269–72. doi:10.1038/331269a0.

Becquart, Pierre, Nadia Wauquier, Dieudonné Nkoghe, Angélique Ndjoi-Mbiguino, Cindy Padilla,

- Marc Souris, and Eric M Leroy. "Acute Dengue Virus 2 Infection in Gabonese Patients Is Associated with an Early Innate Immune Response, Including Strong Interferon Alpha Production." *BMC Infectious Diseases* 10 (2010): 356. doi:10.1186/1471-2334-10-356.
- Beltrame, L M, A M Sell, R A Moliterno, S L Clementino, D M Cardozo, M M Dalalio, U J Fonzar, and J E Visentainer. "Influence of KIR Genes and Their HLA Ligands in Susceptibility to Dengue in a Population from Southern Brazil." *Tissue Antigens* 82, no. 6 (December 2013): 397–404. doi:10.1111/tan.12256.
- Benedict, Mark Q, Rebecca S Levine, William A Hawley, and L Philip Lounibos. "Spread of the Tiger: Global Risk of Invasion by the Mosquito *Aedes Albopictus*." *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 7, no. 1 (2007): 76–85. doi:10.1089/vbz.2006.0562.
- Benichou, Gilles, Yohei Yamada, Akihiro Aoyama, and Joren C Madsen. "Natural Killer Cells in Rejection and Tolerance of Solid Organ Allografts." *Current Opinion in Organ Transplantation* 16, no. 1 (February 2011): 47–53. doi:10.1097/MOT.0b013e32834254cf.
- Béziat, Vivien, Benjamin Descours, Christophe Parizot, Patrice Debré, and Vincent Vieillard. "NK Cell Terminal Differentiation: Correlated Stepwise Decrease of NKG2A and Acquisition of KIRs." *PLoS One* 5, no. 8 (2010): e11966. doi:10.1371/journal.pone.0011966.
- Béziat, Vivien, Darragh Duffy, Stéphanie Nguyen Quoc, Magali Le Garff-Tavernier, Julie Decocq, Béhazine Combadière, Patrice Debré, and Vincent Vieillard. "CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+</sup> NK Cells: A Functional Intermediate Stage of NK Cell Differentiation." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186, no. 12 (June 15, 2011): 6753–61. doi:10.4049/jimmunol.1100330.
- Béziat, V, Traherne, J, Malmberg, JA, Ivarsson, MA, Björkström NK, Retière C, Ljunggren HG, Michaëlsson J, Traowdale, J, Malmberg, KJ. "Tracing dynamic expansion of human NK-cell subsets by high-resolution analysis of KIR repertoires and cellular differentiation". *Eur J Immunol.* (Apr 2014) doi: 10.1002/eji.201444464
- Bhoopat, L, N Bhamarapavati, C Attasiri, S Yoksarn, B Chaiwun, S Khunamornpong, and V Sirisanthana. "Immunohistochemical Characterization of a New Monoclonal Antibody Reactive with Dengue Virus-Infected Cells in Frozen Tissue Using Immunoperoxidase Technique." *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology / Launched by the Allergy and Immunology Society of Thailand* 14, no. 2 (December 1996): 107–13.
- Biggerstaff, Brad J, and Lyle R Petersen. "Estimated Risk of Transmission of the West Nile Virus through Blood Transfusion in the US, 2002." *Transfusion* 43, no. 8 (August 2003): 1007–17.
- Binn, L N, V R Harrison, and R Randall. "Patterns of Viremia and Antibody Observed in Rhesus Monkeys Inoculated with Chikungunya and Other Serologically Related Group A Arboviruses." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 16, no. 6 (November 1967): 782–85.



- Binyamin, Liat, R Katherine Alpaugh, Tracey L Hughes, Charles T Lutz, Kerry S Campbell, and Louis M Weiner. "Blocking NK Cell Inhibitory Self-Recognition Promotes Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in a Model of Anti-Lymphoma Therapy." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180, no. 9 (May 1, 2008): 6392–6401.
- Biron, C A, K S Byron, and J L Sullivan. "Severe Herpesvirus Infections in an Adolescent without Natural Killer Cells." *The New England Journal of Medicine* 320, no. 26 (June 29, 1989): 1731–35. doi:10.1056/NEJM198906293202605.
- Biron, C A, K B Nguyen, G C Pien, L P Cousens, and T P Salazar-Mather. "Natural Killer Cells in Antiviral Defense: Function and Regulation by Innate Cytokines." *Annual Review of Immunology* 17 (1999): 189–220. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.189.
- "Natural Killer Cells in Antiviral Defense: Function and Regulation by Innate Cytokines." *Annual Review of Immunology* 17 (1999): 189–220. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.189.
- Björkström, Niklas K, Therese Lindgren, Malin Stoltz, Cyril Fauriat, Monika Braun, Magnus Evander, Jakob Michaëlsson, et al. "Rapid Expansion and Long-Term Persistence of Elevated NK Cell Numbers in Humans Infected with Hantavirus." *The Journal of Experimental Medicine* 208, no. 1 (January 17, 2011): 13–21. doi:10.1084/jem.20100762.
- "Rapid Expansion and Long-Term Persistence of Elevated NK Cell Numbers in Humans Infected with Hantavirus." *The Journal of Experimental Medicine* 208, no. 1 (January 17, 2011): 13–21. doi:10.1084/jem.20100762.
- Blackburn, N K, T G Besselaar, and G Gibson. "Antigenic Relationship between Chikungunya Virus Strains and O'nyong Nyong Virus Using Monoclonal Antibodies." *Research in Virology* 146, no. 1 (February 1995): 69–73.
- Borgherini, Gianandrea, Patrice Poubeau, Annie Jossaume, Arnaud Gouix, Liliane Cotte, Alain Michault, Claude Arvin-Berod, and Fabrice Paganin. "Persistent Arthralgia Associated with Chikungunya Virus: A Study of 88 Adult Patients on Reunion Island." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 47, no. 4 (August 15, 2008): 469–75. doi:10.1086/590003.
- Borgherini, Gianandrea, Patrice Poubeau, Frederik Staikowsky, Manuella Lory, Nathalie Le Moullec, Jean Philippe Becquart, Catherine Wengling, Alain Michault, and Fabrice Paganin. "Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: Early Clinical and Laboratory Features in 157 Adult Patients." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 44, no. 11 (June 1, 2007): 1401–7. doi:10.1086/517537.
- Borysiewicz, L K, B Rodgers, S Morris, S Graham, and J G Sissons. "Lysis of Human Cytomegalovirus Infected Fibroblasts by Natural Killer Cells: Demonstration of an Interferon-Independent Component Requiring Expression of Early Viral Proteins and Characterization of Effector Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 134, no. 4 (April 1985): 2695–2701.
- Bottino, Cristina, Roberta Castriconi, Daniela Pende, Paola Rivera, Marina Nanni, Barbara Carnemolla, Claudia Cantoni, et al. "Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule." *The Journal of Experimental Medicine* 198, no. 4 (August 18, 2003): 557–67. doi:10.1084/jem.20030788.
- Brandt, Cameron S, Myriam Baratin, Eugene C Yi, Jacob Kennedy, Zeren Gao, Brian Fox, Betty Haldeman, et al. "The B7 Family Member B7-H6 Is a Tumor Cell Ligand for the Activating Natural Killer Cell Receptor NKp30 in Humans." *The Journal of Experimental Medicine* 206, no. 7 (July 6, 2009): 1495–1503. doi:10.1084/jem.20090681.
- Braud, V M, D S Allan, C A O'Callaghan, K Söderström, A D'Andrea, G S Ogg, S Lazetic, et al. "HLA-E Binds to Natural Killer Cell Receptors CD94/NKG2A, B and C." *Nature* 391, no. 6669 (February 19, 1998): 795–99. doi:10.1038/35869.
- Brighton, S W, O W Prozesky, and A L de la Harpe. "Chikungunya Virus Infection. A Retrospective Study of 107 Cases." *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde* 63,

no. 9 (February 26, 1983): 313–15.

Brighton, S W, and I W Simson. “A Destructive Arthropathy Following Chikungunya Virus Arthritis—a Possible Association.” *Clinical Rheumatology* 3, no. 2 (June 1984): 253–58.

Brilot, Fabienne, Till Strowig, Susanne M Roberts, Frida Arrey, and Christian Münz. “NK Cell Survival Mediated through the Regulatory Synapse with Human DCs Requires IL-15 $\alpha$ .” *The Journal of Clinical Investigation* 117, no. 11 (November 2007): 3316–29. doi:10.1172/JCI31751.

Briolant, S, D Garin, N Scaramozzino, A Jouan, and J M Crance. “In Vitro Inhibition of Chikungunya and Semliki Forest Viruses Replication by Antiviral Compounds: Synergistic Effect of Interferon-Alpha and Ribavirin Combination.” *Antiviral Research* 61, no. 2 (February 2004): 111–17.

Brooks, A G, P E Posch, C J Scorzelli, F Borrego, and J E Coligan. “NKG2A Complexed with CD94 Defines a Novel Inhibitory Natural Killer Cell Receptor.” *The Journal of Experimental Medicine* 185, no. 4 (February 17, 1997): 795–800.

Bryceson, Yenan T, and Eric O Long. “Line of Attack: NK Cell Specificity and Integration of Signals.” *Current Opinion in Immunology* 20, no. 3 (June 2008): 344–52. doi:10.1016/j.coi.2008.03.005.

Bukowski, J F, J F Warner, G Dennert, and R M Welsh. “Adoptive Transfer Studies Demonstrating the Antiviral Effect of Natural Killer Cells in Vivo.” *The Journal of Experimental Medicine* 161, no. 1 (January 1, 1985): 40–52.

Burke, D S, A Nisalak, D E Johnson, and R M Scott. “A Prospective Study of Dengue Infections in Bangkok.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 38, no. 1 (January 1988): 172–80.

Cannon, Michael J, D Scott Schmid, and Terri B Hyde. “Review of Cytomegalovirus Seroprevalence and Demographic Characteristics Associated with Infection.” *Reviews in Medical Virology* 20, no. 4 (July 2010): 202–13. doi:10.1002/rmv.655.

Carey, D E. “Chikungunya and Dengue: A Case of Mistaken Identity?” *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* 26, no. 3 (July 1971): 243–62.

Caron, Mélanie, Christophe Paupy, Gilda Grard, Pierre Becquart, Illich Mombo, Branly Bikie Bi Nso, Fabrice Kassa Kassa, Dieudonné Nkoghe, and Eric Maurice Leroy. “Recent Introduction and Rapid Dissemination of Chikungunya Virus and Dengue Virus Serotype 2 Associated with Human and Mosquito Coinfections in Gabon, Central Africa.” *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 55, no. 6 (September 2012): e45–53. doi:10.1093/cid/cis530.

Carrington Mary, Norman Paul. "The KIR Gene Cluster". *Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information*. May 28, 2003.

Chahar, Harendra S, Preeti Bharaj, Lalit Dar, Randeep Guleria, Sushil K Kabra, and Shobha Broor. “Co-Infections with Chikungunya Virus and Dengue Virus in Delhi, India.” *Emerging Infectious Diseases* 15, no. 7 (July 2009): 1077–80. doi:10.3201/eid1507.080638.

Chalupny, N Jan, Claire L Sutherland, William A Lawrence, Annie Rein-Weston, and David Cosman. “ULBP4 Is a Novel Ligand for Human NKG2D.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305, no. 1 (May 23, 2003): 129–35.

Chang, Tsung-Hsien, Toru Kubota, Mayumi Matsuoka, Steven Jones, Steven B Bradfute, Mike Bray, and Keiko Ozato. “Ebola Zaire Virus Blocks Type I Interferon Production by Exploiting the Host SUMO Modification Machinery.” *PLoS Pathogens* 5, no. 6 (June 2009): e1000493. doi:10.1371/journal.ppat.1000493.

Chaturvedi, U C, and R Shrivastava. “Dengue Haemorrhagic Fever: A Global Challenge.” *Indian Journal of Medical Microbiology* 22, no. 1 (March 2004): 5–6.

Chávez-Galán, L, M C Arenas-Del Angel, E Zenteno, R Chávez, and R Lascrain. “Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes.” *Cellular & Molecular Immunology* 6, no. 1

(February 2009): 15–25. doi:10.1038/cmi.2009.3.

Chen, Karen Caiyun, Yiu-Wing Kam, Raymond Tzer Pin Lin, Mary Mah-Lee Ng, Lisa Fp Ng, and Justin Jang Hann Chu. “Comparative Analysis of the Genome Sequences and Replication Profiles of Chikungunya Virus Isolates within the East, Central and South African (ECSA) Lineage.” *Virology Journal* 10 (2013): 169. doi:10.1186/1743-422X-10-169.

Chen, Y, T Maguire, R E Hileman, J R Fromm, J D Esko, R J Linhardt, and R M Marks. “Dengue Virus Infectivity Depends on Envelope Protein Binding to Target Cell Heparan Sulfate.” *Nature Medicine* 3, no. 8 (August 1997): 866–71.

Clarris, B J, R L Doherty, J R Fraser, E L French, and K D Muirden. “Epidemic Polyarthritis: A Cytological, Virological and Immunochemical Study.” *Australian and New Zealand Journal of Medicine* 5, no. 5 (October 1975): 450–57.

Cohen, G B, R T Gandhi, D M Davis, O Mandelboim, B K Chen, J L Strominger, and D Baltimore. “The Selective Downregulation of Class I Major Histocompatibility Complex Proteins by HIV-1 Protects HIV-Infected Cells from NK Cells.” *Immunity* 10, no. 6 (June 1999): 661–71.

Colonna, M, F Navarro, T Bellón, M Llano, P García, J Samaridis, L Angman, M Cella, and M López-Botet. “A Common Inhibitory Receptor for Major Histocompatibility Complex Class I Molecules on Human Lymphoid and Myelomonocytic Cells.” *The Journal of Experimental Medicine* 186, no. 11 (December 1, 1997): 1809–18.

Colonna, M, and J Samaridis. “Cloning of Immunoglobulin-Superfamily Members Associated with HLA-C and HLA-B Recognition by Human Natural Killer Cells.” *Science (New York, N.Y.)* 268, no. 5209 (April 21, 1995): 405–8.

Colucci, Francesco, Michael A Caligiuri, and James P Di Santo. “What Does It Take to Make a Natural Killer?” *Nature Reviews. Immunology* 3, no. 5 (May 2003): 413–25. doi:10.1038/nri1088.

Cooper, M A, T A Fehniger, S C Turner, K S Chen, B A Ghaheri, T Ghayur, W E Carson, and M A Caligiuri. “Human Natural Killer Cells: A Unique Innate Immunoregulatory Role for the CD56(bright) Subset.” *Blood* 97, no. 10 (May 15, 2001): 3146–51.

Cornel, A J, and R H Hunt. “Aedes Albopictus in Africa? First Records of Live Specimens in Imported Tires in Cape Town.” *Journal of the American Mosquito Control Association* 7, no. 1 (March 1991): 107–8.

Cosman, D, N Fanger, L Borges, M Kubin, W Chin, L Peterson, and M L Hsu. “A Novel Immunoglobulin Superfamily Receptor for Cellular and Viral MHC Class I Molecules.” *Immunity* 7, no. 2 (August 1997): 273–82.

Cosman, D, J Müllberg, C L Sutherland, W Chin, R Armitage, W Fanslow, M Kubin, and N J Chalupny. “ULBPs, Novel MHC Class I-Related Molecules, Bind to CMV Glycoprotein UL16 and Stimulate NK Cytotoxicity through the NKG2D Receptor.” *Immunity* 14, no. 2 (February 2001): 123–33.

Costello, Régis T, Simona Sivori, Emanuela Marcenaro, Marina Lafage-Pochitaloff, Marie-Joelle Mozziconacci, Denis Reviron, Jean-Albert Gastaut, Daniela Pende, Daniel Olive, and Alessandro Moretta. “Defective Expression and Function of Natural Killer Cell-Triggering Receptors in Patients with Acute Myeloid Leukemia.” *Blood* 99, no. 10 (May 15, 2002): 3661–67.

Couderc, Thérèse, Fabrice Chrétien, Clémentine Schilte, Olivier Disson, Madly Brigitte, Florence Guivel-Benhassine, Yasmina Touret, et al. “A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease.” *PLoS Pathogens* 4, no. 2 (February 8, 2008): e29. doi:10.1371/journal.ppat.0040029.

Couderc, Thérèse, Nassirah Khandoudi, Marc Grandadam, Catherine Visse, Nicolas Gangneux, Sébastien Bagot, Jean-François Prost, and Marc Lecuit. “Prophylaxis and Therapy for Chikungunya Virus Infection.” *The Journal of Infectious Diseases* 200, no. 4 (August 15, 2009): 516–23. doi:10.1086/600381.

- Couvelard, A, P Marianneau, C Bedel, M T Drouet, F Vachon, D Hénin, and V Deubel. "Report of a Fatal Case of Dengue Infection with Hepatitis: Demonstration of Dengue Antigens in Hepatocytes and Liver Apoptosis." *Human Pathology* 30, no. 9 (September 1999): 1106–10.
- Crotta, Stefania, Annalisa Stilla, Andreas Wack, Annalisa D'Andrea, Sandra Nuti, Ugo D'Oro, Marta Mosca, et al. "Inhibition of Natural Killer Cells through Engagement of CD81 by the Major Hepatitis C Virus Envelope Protein." *The Journal of Experimental Medicine* 195, no. 1 (January 7, 2002): 35–41.
- Cullen, S P, and S J Martin. "Mechanisms of Granule-Dependent Killing." *Cell Death and Differentiation* 15, no. 2 (February 2008): 251–62. doi:10.1038/sj.cdd.4402244.
- D'Andrea, A, M Aste-Amezaga, N M Valiante, X Ma, M Kubin, and G Trinchieri. "Interleukin 10 (IL-10) Inhibits Human Lymphocyte Interferon Gamma-Production by Suppressing Natural Killer Cell Stimulatory factor/IL-12 Synthesis in Accessory Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 178, no. 3 (September 1, 1993): 1041–48.
- Declercq, W, G Denecker, W Fiers, and P Vandenabeele. "Cooperation of Both TNF Receptors in Inducing Apoptosis: Involvement of the TNF Receptor-Associated Factor Binding Domain of the TNF Receptor 75." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 161, no. 1 (July 1, 1998): 390–99.
- Delatte, H, C Paupy, J S Dehecq, J Thiria, A B Failloux, and D Fontenille. "[Aedes albopictus, vector of chikungunya and dengue viruses in Reunion Island: biology and control]." *Parasite (Paris, France)* 15, no. 1 (March 2008): 3–13.
- Della Chiesa, Mariella, Massimo Vitale, Simona Carlomagno, Guido Ferlazzo, Lorenzo Moretta, and Alessandro Moretta. "The Natural Killer Cell-Mediated Killing of Autologous Dendritic Cells Is Confined to a Cell Subset Expressing CD94/NKG2A, but Lacking Inhibitory Killer Ig-like Receptors." *European Journal of Immunology* 33, no. 6 (June 2003): 1657–66. doi:10.1002/eji.200323986.
- Deller, J J, Jr, and P K Russell. "An Analysis of Fevers of Unknown Origin in American Soldiers in Vietnam." *Annals of Internal Medicine* 66, no. 6 (June 1967): 1129–43.
- "Chikungunya Disease." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 17, no. 1 (January 1968): 107–11.
- Dennehy, Kevin M, Sascha N Klimosch, and Alexander Steinle. "Cutting Edge: NKp80 Uses an Atypical Hemi-ITAM to Trigger NK Cytotoxicity." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186, no. 2 (January 15, 2011): 657–61. doi:10.4049/jimmunol.0904117.
- Der, S D, A Zhou, B R Williams, and R H Silverman. "Identification of Genes Differentially Regulated by Interferon Alpha, Beta, or Gamma Using Oligonucleotide Arrays." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, no. 26 (December 22, 1998): 15623–28.
- Diallo, M, J Thonnon, M Traore-Lamizana, and D Fontenille. "Vectors of Chikungunya Virus in Senegal: Current Data and Transmission Cycles." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60, no. 2 (February 1999): 281–86.
- Diamond, M S, T G Roberts, D Edgil, B Lu, J Ernst, and E Harris. "Modulation of Dengue Virus Infection in Human Cells by Alpha, Beta, and Gamma Interferons." *Journal of Virology* 74, no. 11 (June 2000): 4957–66.
- Dong, Tao, Edward Moran, Nguyen Vinh Chau, Cameron Simmons, Kerstin Luhn, Yanchun Peng, Bridget Wills, et al. "High pro-Inflammatory Cytokine Secretion and Loss of High Avidity Cross-Reactive Cytotoxic T-Cells during the Course of Secondary Dengue Virus Infection." *PloS One* 2, no. 12 (2007): e1192. doi:10.1371/journal.pone.0001192.
- Draghi, Monia, Achal Pashine, Bharati Sanjanwala, Ketevan Gendzekhadze, Claudia Cantoni, David Cosman, Alessandro Moretta, Nicholas M Valiante, and Peter Parham. "NKp46 and NKG2D Recognition of Infected Dendritic Cells Is Necessary for NK Cell Activation in the Human Response to Influenza Infection." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178, no. 5 (March 1, 2007): 2688–98.

Duong, Veasna, Anne-Claire Andries, Chantha Ngan, Touch Sok, Beat Richner, Nima Asgari-Jirhandeh, Steve Bjorge, et al. "Reemergence of Chikungunya Virus in Cambodia." *Emerging Infectious Diseases* 18, no. 12 (December 2012): 2066–69. doi:10.3201/eid1812.120471.

Dupuis-Maguiraga, Laurence, Marion Noret, Sonia Brun, Roger Le Grand, Gabriel Gras, and Pierre Roques. "Chikungunya Disease: Infection-Associated Markers from the Acute to the Chronic Phase of Arbovirus-Induced Arthralgia." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6, no. 3 (2012): e1446. doi:10.1371/journal.pntd.0001446.

Edelman, R, C O Tacket, S S Wasserman, S A Bodison, J G Perry, and J A Mangiafico. "Phase II Safety and Immunogenicity Study of Live Chikungunya Virus Vaccine TSI-GSD-218." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62, no. 6 (June 2000): 681–85.

Ehrenkranz, N J, A K Ventura, R R Cuadrado, W L Pond, and J E Porter. "Pandemic Dengue in Caribbean Countries and the Southern United States--Past, Present and Potential Problems." *The New England Journal of Medicine* 285, no. 26 (December 23, 1971): 1460–69. doi:10.1056/NEJM197112232852606.

Exley, M, J Garcia, S P Balk, and S Porcelli. "Requirements for CD1d Recognition by Human Invariant Valpha24+ CD4-CD8- T Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 186, no. 1 (July 7, 1997): 109–20.

Farag, Sherif S, Todd A Fehniger, Loredana Ruggeri, Andrea Velardi, and Michael A Caligiuri. "Natural Killer Cell Receptors: New Biology and Insights into the Graft-versus-Leukemia Effect." *Blood* 100, no. 6 (September 15, 2002): 1935–47. doi:10.1182/blood-2002-02-0350.

Fauci, Anthony S, Domenico Mavilio, and Shyam Kottlil. "NK Cells in HIV Infection: Paradigm for Protection or Targets for Ambush." *Nature Reviews. Immunology* 5, no. 11 (November 2005): 835–43. doi:10.1038/nri1711.

Fausther-Bovendo, Hugues, Nadia Wauquier, Julien Cherfils-Vicini, Isabelle Cremer, Patrice Debré, and Vincent Vieillard. "NKG2C Is a Major Triggering Receptor Involved in the V[delta]1 T Cell-Mediated Cytotoxicity against HIV-Infected CD4 T Cells." *AIDS (London, England)* 22, no. 2 (January 11, 2008): 217–26. doi:10.1097/QAD.0b013e3282f46e7c.

Ferlazzo, Guido, Maggi Pack, Dolca Thomas, Casper Paludan, Dorothee Schmid, Till Strowig, Gwenola Bougras, William A Muller, Lorenzo Moretta, and Christian Münz. "Distinct Roles of IL-12 and IL-15 in Human Natural Killer Cell Activation by Dendritic Cells from Secondary Lymphoid Organs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, no. 47 (November 23, 2004): 16606–11. doi:10.1073/pnas.0407522101.

Ferlazzo, Guido, Ming L Tsang, Lorenzo Moretta, Giovanni Melioli, Ralph M Steinman, and Christian Münz. "Human Dendritic Cells Activate Resting Natural Killer (NK) Cells and Are Recognized via the Nkp30 Receptor by Activated NK Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 195, no. 3 (February 4, 2002): 343–51.

Filipe-Santos, Orchidée, Jacinta Bustamante, Ariane Chapgier, Guillaume Vogt, Ludovic de Beaucoudrey, Jacqueline Feinberg, Emmanuelle Jouanguy, et al. "Inborn Errors of IL-12/23- and IFN-Gamma-Mediated Immunity: Molecular, Cellular, and Clinical Features." *Seminars in Immunology* 18, no. 6 (December 2006): 347–61. doi:10.1016/j.smim.2006.07.010.

Fischer, A, M Cavazzana-Calvo, G De Saint Basile, J P DeVillartay, J P Di Santo, C Hivroz, F Rieux-Laucat, and F Le Deist. "Naturally Occurring Primary Deficiencies of the Immune System." *Annual Review of Immunology* 15 (1997): 93–124. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.93.

Fourie, E D, and J G Morrison. "Rheumatoid Arthritic Syndrome after Chikungunya Fever." *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde* 56, no. 4 (July 28, 1979): 130–32.

Fros, Jelke J, Wen Jun Liu, Natalie A Prow, Corinne Geertsema, Maarten Ligtenberg, Dana L Vanlandingham, Esther Schnettler, et al. "Chikungunya Virus Nonstructural Protein 2 Inhibits Type I/II Interferon-Stimulated JAK-STAT Signaling." *Journal of Virology* 84, no. 20 (October 2010): 10877–

87. doi:10.1128/JVI.00949-10.

Gagnon, S J, F A Ennis, and A L Rothman. "Bystander Target Cell Lysis and Cytokine Production by Dengue Virus-Specific Human CD4(+) Cytotoxic T-Lymphocyte Clones." *Journal of Virology* 73, no. 5 (May 1999): 3623–29.

García, G, M Arango, A B Pérez, L Fonte, B Sierra, R Rodríguez-Roche, E Aguirre, I Fiterre, and M G Guzmán. "Antibodies from Patients with Dengue Viral Infection Mediate Cellular Cytotoxicity." *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 37, no. 1 (September 2006): 53–57. doi:10.1016/j.jcv.2006.04.010.

Gardner, Christina L, Crystal W Burke, Mulu Z Tesfay, Pamela J Glass, William B Klimstra, and Kate D Ryman. "Eastern and Venezuelan Equine Encephalitis Viruses Differ in Their Ability to Infect Dendritic Cells and Macrophages: Impact of Altered Cell Tropism on Pathogenesis." *Journal of Virology* 82, no. 21 (November 2008): 10634–46. doi:10.1128/JVI.01323-08.

Gardner, Joy, Itaru Anraku, Thuy T Le, Thibaut Larcher, Lee Major, Pierre Roques, Wayne A Schroder, Stephen Higgs, and Andreas Suhrbier. "Chikungunya Virus Arthritis in Adult Wild-Type Mice." *Journal of Virology* 84, no. 16 (August 2010): 8021–32. doi:10.1128/JVI.02603-09.

Garoff, H, and K Simons. "Location of the Spike Glycoproteins in the Semliki Forest Virus Membrane." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, no. 10 (October 1974): 3988–92.

Gazit, Roi, Ben-Zion Garty, Yehudith Monselise, Vered Hoffer, Yaron Finkelstein, Gal Markel, Gil Katz, et al. "Expression of KIR2DL1 on the Entire NK Cell Population: A Possible Novel Immunodeficiency Syndrome." *Blood* 103, no. 5 (March 1, 2004): 1965–66. doi:10.1182/blood-2003-11-3796.

Gérardin, Patrick, Vanina Guernier, Joëlle Perrau, Adrian Fianu, Karin Le Roux, Philippe Grivard, Alain Michault, Xavier de Lamballerie, Antoine Flahault, and François Favier. "Estimating Chikungunya Prevalence in La Réunion Island Outbreak by Serosurveys: Two Methods for Two Critical Times of the Epidemic." *BMC Infectious Diseases* 8 (2008): 99. doi:10.1186/1471-2334-8-99.

Gerosa, Franca, Barbara Baldani-Guerra, Carla Nisii, Viviana Marchesini, Giuseppe Carra, and Giorgio Trinchieri. "Reciprocal Activating Interaction between Natural Killer Cells and Dendritic Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 195, no. 3 (February 4, 2002): 327–33.

Gerosa, Franca, Andrea Gobbi, Penelope Zorzi, Stephanie Burg, Francine Briere, Giuseppe Carra, and Giorgio Trinchieri. "The Reciprocal Interaction of NK Cells with Plasmacytoid or Myeloid Dendritic Cells Profoundly Affects Innate Resistance Functions." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174, no. 2 (January 15, 2005): 727–34.

Gherardi, M Magdalena, Juan C Ramírez, and Mariano Esteban. "IL-12 and IL-18 Act in Synergy to Clear Vaccinia Virus Infection: Involvement of Innate and Adaptive Components of the Immune System." *The Journal of General Virology* 84, no. Pt 8 (August 2003): 1961–72.

González, S, V Groh, and T Spies. "Immunobiology of Human NKG2D and Its Ligands." *Current Topics in Microbiology and Immunology* 298 (2006): 121–38.

Gonzalez-Amaro, R, J Alcocer-Varela, and D Alarcón-Segovia. "Natural Killer Cell Activity in the Systemic Connective Tissue Diseases." *The Journal of Rheumatology* 15, no. 8 (August 1988): 1223–28.

Gratz, N G. "Critical Review of the Vector Status of Aedes Albopictus." *Medical and Veterinary Entomology* 18, no. 3 (September 2004): 215–27. doi:10.1111/j.0269-283X.2004.00513.x.

Green, S, D W Vaughn, S Kalayanaraj, S Nimmannitya, S Suntayakorn, A Nisalak, R Lew, et al. "Early Immune Activation in Acute Dengue Illness Is Related to Development of Plasma Leakage and Disease Severity." *The Journal of Infectious Diseases* 179, no. 4 (April 1999): 755–62. doi:10.1086/314680.

Grivard, P, K Le Roux, P Laurent, A Fianu, J Perrau, J Gigan, G Hoarau, et al. "Molecular and Serological Diagnosis of Chikungunya Virus Infection." *Pathologie-Biologie* 55, no. 10 (December 2007): 490–94. doi:10.1016/j.patbio.2007.07.002.

Gubler, D J. "Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever." *Clinical Microbiology Reviews* 11, no. 3 (July 1998): 480–96.

The Changing Epidemiology of Yellow Fever and Dengue, 1900 to 2003: Full Circle?" *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 27, no. 5 (September 2004): 319–30. doi:10.1016/j.cimid.2004.03.013.

Guirakhoo, F, K Pugachev, Z Zhang, G Myers, I Levenbook, K Draper, J Lang, et al. "Safety and Efficacy of Chimeric Yellow Fever-Dengue Virus Tetravalent Vaccine Formulations in Nonhuman Primates." *Journal of Virology* 78, no. 9 (May 2004): 4761–75.

Gumá, Mónica, Ana Angulo, Carlos Vilches, Natalia Gómez-Lozano, Núria Malats, and Miguel López-Botet. "Imprint of Human Cytomegalovirus Infection on the NK Cell Receptor Repertoire." *Blood* 104, no. 12 (December 1, 2004): 3664–71. doi:10.1182/blood-2004-05-2058.

Gumá, M, Angulo, A, Lopez-Botet, M. "NK cell receptors involved in the response to human cytomegalovirus infection". *Curr Trop Microbiol Immunol*. 298 (2006): 207-23

Gumperz, J E, N M Valiante, P Parham, L L Lanier, and D Tyan. "Heterogeneous Phenotypes of Expression of the NKB1 Natural Killer Cell Class I Receptor among Individuals of Different Human Histocompatibility Leukocyte Antigens Types Appear Genetically Regulated, but Not Linked to Major Histocompatibility Complex Haplotype." *The Journal of Experimental Medicine* 183, no. 4 (April 1, 1996): 1817–27.

Guzmán, María G, Gustavo Kourí, Luis Valdés, José Bravo, Susana Vázquez, and Scott B Halstead. "Enhanced Severity of Secondary Dengue-2 Infections: Death Rates in 1981 and 1997 Cuban Outbreaks." *Revista Panamericana de Salud Pública = Pan American Journal of Public Health* 11, no. 4 (April 2002): 223–27.

Hackett, J, Jr, G C Bosma, M J Bosma, M Bennett, and V Kumar. "Transplantable Progenitors of Natural Killer Cells Are Distinct from Those of T and B Lymphocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, no. 10 (May 1986): 3427–31.

Halstead, S B. "Immune Enhancement of Viral Infection." *Progress in Allergy* 31 (1982): 301–64.

Is There an Inapparent Dengue Explosion?" *Lancet* 353, no. 9158 (March 27, 1999): 1100–1101. doi:10.1016/S0140-6736(05)76460-6.

Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology." *Science (New York, N.Y.)* 239, no. 4839 (January 29, 1988): 476–81.

Halstead, Scott B. "Neutralization and Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Viruses." *Advances in Virus Research* 60 (2003): 421–67.

Halstead, Scott B, Nguyen Trong Lan, Thein Thein Myint, Than Nu Shwe, Ananda Nisalak, Siripen Kalyanarooj, Suchitra Nimmannitya, Soegeng Soegijanto, David W Vaughn, and Timothy P Endy. "Dengue Hemorrhagic Fever in Infants: Research Opportunities Ignored." *Emerging Infectious Diseases* 8, no. 12 (December 2002): 1474–79. doi:10.3201/eid0812.020170.

Hapuarachchi, H A C, K B A T Bandara, M D Hapugoda, S Williams, and W Abeyewickreme. "Laboratory Confirmation of Dengue and Chikungunya Co-Infection." *The Ceylon Medical Journal* 53, no. 3 (September 2008): 104–5.

Harris, E, E Videá, L Pérez, E Sandoval, Y Téllez, M L Pérez, R Cuadra, et al. "Clinical, Epidemiologic, and Virologic Features of Dengue in the 1998 Epidemic in Nicaragua." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 63, no. 1–2 (August 2000): 5–11.

Harris, Eva, Katherine L Holden, Dianna Edgil, Charlotta Polacek, and Karen Clyde. "Molecular

Biology of Flaviviruses.” *Novartis Foundation Symposium* 277 (2006): 23–39; discussion 40, 71–73, 251–253.

Harrison, V R, J D Marshall, and N B Guilloud. “The Presence of Antibody to Chikungunya and Other Serologically Related Viruses in the Sera of Sub-Human Primate Imports to the United States.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 98, no. 5 (May 1967): 979–81.

Hayakawa, Yoshihiro, Valentina Screpanti, Hideo Yagita, Alf Grandien, Hans-Gustaf Ljunggren, Mark J Smyth, and Benedict J Chambers. “NK Cell TRAIL Eliminates Immature Dendritic Cells in Vivo and Limits Dendritic Cell Vaccination Efficacy.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172, no. 1 (January 1, 2004): 123–29.

Henchal, E A, and J R Putnak. “The Dengue Viruses.” *Clinical Microbiology Reviews* 3, no. 4 (October 1990): 376–96.

Hendricks, DW, Balfour, HH Jr, Dunmire, SK, Schmeling, DO, Hogguist, KA, Lanier, LL. “Cutting Edge: NKG2ChiCD57+NK cells respond specifically to acute infection with cytomegalovirus and not Epstein-Barr virus”. *J Immunol.* (Apr 2014).

Her, Zhisheng, Benoit Malleret, Monica Chan, Edward K S Ong, Siew-Cheng Wong, Dyan J C Kwek, Hugues Tolou, et al. “Active Infection of Human Blood Monocytes by Chikungunya Virus Triggers an Innate Immune Response.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184, no. 10 (May 15, 2010): 5903–13. doi:10.4049/jimmunol.0904181.

Hershkovitz, Oren, Benyamin Rosental, Lior Ann Rosenberg, Martha Erika Navarro-Sanchez, Sergey Jivov, Alon Zilka, Orly Gershoni-Yahalom, et al. “NKp44 Receptor Mediates Interaction of the Envelope Glycoproteins from the West Nile and Dengue Viruses with NK Cells.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183, no. 4 (August 15, 2009): 2610–21. doi:10.4049/jimmunol.0802806.

NKp44 Receptor Mediates Interaction of the Envelope Glycoproteins from the West Nile and Dengue Viruses with NK Cells.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183, no. 4 (August 15, 2009): 2610–21. doi:10.4049/jimmunol.0802806.

Hershkovitz, Oren, Alon Zilka, Ahuva Bar-Ilan, Shai Abutbul, Andrew Davidson, Michela Mazzon, Beate M Kümmerer, Alon Monsoengo, Michael Jacobs, and Angel Porgador. “Dengue Virus Replicon Expressing the Nonstructural Proteins Suffices to Enhance Membrane Expression of HLA Class I and Inhibit Lysis by Human NK Cells.” *Journal of Virology* 82, no. 15 (August 2008): 7666–76. doi:10.1128/JVI.02274-07.

Dengue Virus Replicon Expressing the Nonstructural Proteins Suffices to Enhance Membrane Expression of HLA Class I and Inhibit Lysis by Human NK Cells.” *Journal of Virology* 82, no. 15 (August 2008): 7666–76. doi:10.1128/JVI.02274-07.

Hervas-Stubbs, Sandra, Jose Luis Perez-Gracia, Ana Rouzaut, Miguel F Sanmamed, Agnes Le Bon, and Ignacio Melero. “Direct Effects of Type I Interferons on Cells of the Immune System.” *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17, no. 9 (May 1, 2011): 2619–27. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1114.

Ho, L J, J J Wang, M F Shaio, C L Kao, D M Chang, S W Han, and J H Lai. “Infection of Human Dendritic Cells by Dengue Virus Causes Cell Maturation and Cytokine Production.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166, no. 3 (February 1, 2001): 1499–1506.

Ho, Ling-Jun, Li-Feng Hung, Chun-Yi Weng, Wan-Lin Wu, Ping Chou, Yi-Ling Lin, Deh-Ming Chang, Tong-Yuan Tai, and Jenn-Haung Lai. “Dengue Virus Type 2 Antagonizes IFN-Alpha but Not IFN-Gamma Antiviral Effect via down-Regulating Tyk2-STAT Signaling in the Human Dendritic Cell.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174, no. 12 (June 15, 2005): 8163–72.

Hoarau, Jean-Jacques, Marie-Christine Jaffar Bandjee, Pascale Krejbich Trotot, Trina Das, Ghislaine Li-Pat-Yuen, Bérengère Dassa, Mélanie Denizot, et al. “Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184, no. 10 (May 15, 2010): 5914–27.



doi:10.4049/jimmunol.0900255.

Hochedez, P, P Hausfater, S Jaureguiberry, F Gay, A Detry, M Danis, F Bricaire, and P Bossi. "Cases of Chikungunya Fever Imported from the Islands of the South West Indian Ocean to Paris, France." *Euro Surveillence: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 12, no. 1 (January 20, 2007).

Holmes, Edward C, and S Susanna Twiddy. "The Origin, Emergence and Evolutionary Genetics of Dengue Virus." *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 3, no. 1 (May 2003): 19–28.

Horwitz, D A, J D Gray, and K Ohtsuka. "Role of NK Cells and TGF-Beta in the Regulation of T-Cell-Dependent Antibody Production in Health and Autoimmune Disease." *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 1, no. 15 (December 1999): 1305–11.

Houchins, J P, T Yabe, C McSherry, and F H Bach. "DNA Sequence Analysis of NKG2, a Family of Related cDNA Clones Encoding Type II Integral Membrane Proteins on Human Natural Killer Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 173, no. 4 (April 1, 1991): 1017–20.

Huerre, M R, N T Lan, P Marianneau, N B Hue, H Khun, N T Hung, N T Khen, et al. "Liver Histopathology and Biological Correlates in Five Cases of Fatal Dengue Fever in Vietnamese Children." *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 438, no. 2 (February 2001): 107–15.

Huntington, Nicholas D, Hamsa Puthalakath, Priscilla Gunn, Edwina Naik, Ewa M Michalak, Mark J Smyth, Hyacinth Tabarias, et al. "Interleukin 15-Mediated Survival of Natural Killer Cells Is Determined by Interactions among Bim, Noxa and Mcl-1." *Nature Immunology* 8, no. 8 (August 2007): 856–63. doi:10.1038/ni1487.

Inngjerdigen, M, B Damaj, and A A Maghazachi. "Expression and Regulation of Chemokine Receptors in Human Natural Killer Cells." *Blood* 97, no. 2 (January 15, 2001): 367–75.

Ivanov, A P, O E Ivanova, N N Lomonosov, S V Pozdnyakov, O K Konstantinov, and M A Bah. "Serological Investigations of Chikungunya Virus in the Republic of Guinea." *Annales de La Société Belge de Médecine Tropicale* 72, no. 1 (March 1992): 73–74.

Iversen, Ann-Charlotte, Paula S Norris, Carl F Ware, and Chris A Benedict. "Human NK Cells Inhibit Cytomegalovirus Replication through a Noncytolytic Mechanism Involving Lymphotoxin-Dependent Induction of IFN-Beta." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175, no. 11 (December 1, 2005): 7568–74.

Jaffar-Bandjee, M C, and P Gasque. "[Physiopathology of chronic arthritis following chikungunya infection in man]." *Médecine tropicale: revue du Corps de santé colonial* 72 Spec No (March 2012): 86–87.

Jarahian, Mostafa, Manuela Fiedler, André Cohnen, Dominik Djangji, Günter J Hämmerling, Cornelius Gati, Adelheid Cerwenka, et al. "Modulation of NKp30- and NKp46-Mediated Natural Killer Cell Responses by Poxviral Hemagglutinin." *PLoS Pathogens* 7, no. 8 (August 2011): e1002195. doi:10.1371/journal.ppat.1002195.

Jeandel, P, R Josse, and J P Durand. "[Exotic viral arthritis: role of alphavirus]." *Médecine tropicale: revue du Corps de santé colonial* 64, no. 1 (2004): 81–88.

Jessie, Kala, Mun Yik Fong, Shamala Devi, Sai Kit Lam, and K Thong Wong. "Localization of Dengue Virus in Naturally Infected Human Tissues, by Immunohistochemistry and in Situ Hybridization." *The Journal of Infectious Diseases* 189, no. 8 (April 15, 2004): 1411–18. doi:10.1086/383043.

Jinushi, Masahisa, Tetsuo Takehara, Tatsuya Kanto, Tomohide Tatsumi, Veronika Groh, Thomas Spies, Takuya Miyagi, Takahiro Suzuki, Yutaka Sasaki, and Norio Hayashi. "Critical Role of MHC Class I-Related Chain A and B Expression on IFN-Alpha-Stimulated Dendritic Cells in NK Cell Activation: Impairment in Chronic Hepatitis C Virus Infection." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170, no. 3 (February 1, 2003): 1249–56.

- Johnson, A J, and J T Roehrig. "New Mouse Model for Dengue Virus Vaccine Testing." *Journal of Virology* 73, no. 1 (January 1999): 783–86.
- Johnston, L J, G M Halliday, and N J King. "Langerhans Cells Migrate to Local Lymph Nodes Following Cutaneous Infection with an Arbovirus." *The Journal of Investigative Dermatology* 114, no. 3 (March 2000): 560–68. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00904.x.
- Joubert, Pierre-Emmanuel, Scott W Werneke, Claire de la Calle, Florence Guivel-Benhassine, Alessandra Giodini, Lucie Peduto, Beth Levine, Olivier Schwartz, Deborah J Lenschow, and Matthew L Albert. "Chikungunya Virus-Induced Autophagy Delays Caspase-Dependent Cell Death." *The Journal of Experimental Medicine* 209, no. 5 (May 7, 2012): 1029–47. doi:10.1084/jem.20110996.
- Kägi, D, B Ledermann, K Bürki, P Seiler, B Odermatt, K J Olsen, E R Podack, R M Zinkernagel, and H Hengartner. "Cytotoxicity Mediated by T Cells and Natural Killer Cells Is Greatly Impaired in Perforin-Deficient Mice." *Nature* 369, no. 6475 (May 5, 1994): 31–37. doi:10.1038/369031a0.
- Kalayanarooj, S, D W Vaughn, S Nimmannitya, S Green, S Suntayakorn, N Kunentrasai, W Viramitrachai, et al. "Early Clinical and Laboratory Indicators of Acute Dengue Illness." *The Journal of Infectious Diseases* 176, no. 2 (August 1997): 313–21.
- Kam, Yiu-Wing, Edward K S Ong, Laurent Rénia, Joo-Chuan Tong, and Lisa F P Ng. "Immunobiology of Chikungunya and Implications for Disease Intervention." *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 11, no. 14–15 (December 2009): 1186–96. doi:10.1016/j.micinf.2009.09.003.
- Kennedy, A C, J Fleming, and L Solomon. "Chikungunya Viral Arthropathy: A Clinical Description." *The Journal of Rheumatology* 7, no. 2 (April 1980): 231–36.
- Khakoo, Salim I, Chloe L Thio, Maureen P Martin, Collin R Brooks, Xiaojiang Gao, Jacquie Astemborski, Jie Cheng, et al. "HLA and NK Cell Inhibitory Receptor Genes in Resolving Hepatitis C Virus Infection." *Science (New York, N.Y.)* 305, no. 5685 (August 6, 2004): 872–74. doi:10.1126/science.1097670.
- Kiessling, R, E Klein, H Pross, and H Wigzell. "'Natural' Killer Cells in the Mouse. II. Cytotoxic Cells with Specificity for Mouse Moloney Leukemia Cells. Characteristics of the Killer Cell." *European Journal of Immunology* 5, no. 2 (February 1975): 117–21. doi:10.1002/eji.1830050209.
- Kim, Dae-Ki, Juraj Kabat, Francisco Borrego, Tolib B Sanni, Chi-Hyun You, and John E Coligan. "Human NKG2F Is Expressed and Can Associate with DAP12." *Molecular Immunology* 41, no. 1 (May 2004): 53–62. doi:10.1016/j.molimm.2004.01.004.
- Kim, Sungjin, Jennifer Poursine-Laurent, Steven M Truscott, Lonnie Lybarger, Yun-Jeong Song, Liping Yang, Anthony R French, et al. "Licensing of Natural Killer Cells by Host Major Histocompatibility Complex Class I Molecules." *Nature* 436, no. 7051 (August 4, 2005): 709–13. doi:10.1038/nature03847.
- Kipps, T J, P Parham, J Punt, and L A Herzenberg. "Importance of Immunoglobulin Isotype in Human Antibody-Dependent, Cell-Mediated Cytotoxicity Directed by Murine Monoclonal Antibodies." *The Journal of Experimental Medicine* 161, no. 1 (January 1, 1985): 1–17.
- Kruse, PH, Matta, J, Ugolini, S, Vivier, E. "Natural cytotoxicity receptors and their ligands". 92(3) (Mar 2014): 221-9. doi:10.1038/icb.2013.98.
- Kuhn, Richard J, Wei Zhang, Michael G Rossmann, Sergei V Pletnev, Jeroen Corver, Edith Lenches, Christopher T Jones, et al. "Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion." *Cell* 108, no. 5 (March 8, 2002): 717–25.
- Kulkarni, Smita, Maureen P Martin, and Mary Carrington. "The Yin and Yang of HLA and KIR in Human Disease." *Seminars in Immunology* 20, no. 6 (December 2008): 343–52. doi:10.1016/j.smim.2008.06.003.
- The Yin and Yang of HLA and KIR in Human Disease." *Seminars in Immunology* 20, no. 6 (December 2008): 343–52. doi:10.1016/j.smim.2008.06.003.

Kuno, G. "Persistence of Arboviruses and Antiviral Antibodies in Vertebrate Hosts: Its Occurrence and Impacts." *Reviews in Medical Virology* 11, no. 3 (June 2001): 165–90.

Kupper, Thomas S, and Robert C Fuhlbrigge. "Immune Surveillance in the Skin: Mechanisms and Clinical Consequences." *Nature Reviews. Immunology* 4, no. 3 (March 2004): 211–22. doi:10.1038/nri1310.

Kurane, I, D Hebblewaite, W E Brandt, and F A Ennis. "Lysis of Dengue Virus-Infected Cells by Natural Cell-Mediated Cytotoxicity and Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity." *Journal of Virology* 52, no. 1 (October 1984): 223–30.

Kurane, I, B L Innis, S Nimmannitya, A Nisalak, A Meager, and F A Ennis. "High Levels of Interferon Alpha in the Sera of Children with Dengue Virus Infection." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48, no. 2 (February 1993): 222–29.

Kurane, I, B L Innis, S Nimmannitya, A Nisalak, A L Rothman, P G Livingston, J Janus, and F A Ennis. "Human Immune Responses to Dengue Viruses." *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 21, no. 4 (December 1990): 658–62.

Kusumi, Maki, Takahiro Yamashita, Tomoyuki Fujii, Takeshi Nagamatsu, Shiro Kozuma, and Yuji Taketani. "Expression Patterns of Lectin-like Natural Killer Receptors, Inhibitory CD94/NKG2A, and Activating CD94/NKG2C on Decidual CD56bright Natural Killer Cells Differ from Those on Peripheral CD56dim Natural Killer Cells." *Journal of Reproductive Immunology* 70, no. 1–2 (June 2006): 33–42. doi:10.1016/j.jri.2005.12.008.

Labadie, Karine, Thibaut Larcher, Christophe Joubert, Abdelkrim Mannioui, Benoit Delache, Patricia Brochard, Lydie Guigand, et al. "Chikungunya Disease in Nonhuman Primates Involves Long-Term Viral Persistence in Macrophages." *The Journal of Clinical Investigation* 120, no. 3 (March 2010): 894–906. doi:10.1172/JCI40104.

Laffont, Sophie, Cyril Seillet, John Ortaldo, Jérôme D Coudert, and Jean-Charles Guéry. "Natural Killer Cells Recruited into Lymph Nodes Inhibit Alloreactive T-Cell Activation through Perforin-Mediated Killing of Donor Allogeneic Dendritic Cells." *Blood* 112, no. 3 (August 1, 2008): 661–71. doi:10.1182/blood-2007-10-120089.

Lalani, A S, J W Barrett, and G McFadden. "Modulating Chemokines: More Lessons from Viruses." *Immunology Today* 21, no. 2 (February 2000): 100–106.

Lanier, L L, C Chang, and J H Phillips. "Human NKR-P1A. A Disulfide-Linked Homodimer of the C-Type Lectin Superfamily Expressed by a Subset of NK and T Lymphocytes." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 153, no. 6 (September 15, 1994): 2417–28.

Lanier, L L, B C Corliss, J Wu, C Leong, and J H Phillips. "Immunoreceptor DAP12 Bearing a Tyrosine-Based Activation Motif Is Involved in Activating NK Cells." *Nature* 391, no. 6668 (February 12, 1998): 703–7. doi:10.1038/35642.

Laoprasopwattana, Kamolwish, Daniel H Libraty, Timothy P Endy, Ananda Nisalak, Supamit Chunsuttiwat, Francis A Ennis, Alan L Rothman, and Sharone Green. "Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Mediated by Plasma Obtained before Secondary Dengue Virus Infections: Potential Involvement in Early Control of Viral Replication." *The Journal of Infectious Diseases* 195, no. 8 (April 15, 2007): 1108–16. doi:10.1086/512860.

Larkin, Jonathan, Anne Bost, John I Glass, and Seng-Lai Tan. "Cytokine-Activated Natural Killer Cells Exert Direct Killing of Hepatoma Cells Harboring Hepatitis C Virus Replicons." *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 26, no. 12 (December 2006): 854–65. doi:10.1089/jir.2006.26.854.

Le Page, ME, Goodridge, JP, John, E, Christiansen FT, Witt CS. "Killer Ig-like receptor 2DL4 does not mediate NK cell IFN- $\gamma$  responses to soluble HLA-G preparations". *J Immunol* 192(2) (Jan 2014): 732–40. doi: 10.4049/jimmunol.1301748

Leroy, Eric M, Dieudonné Nkoghe, Benjamin Ollomo, Chimène Nze-Nkoghe, Pierre Becquart, Gilda Grard, Xavier Pourrut, et al. "Concurrent Chikungunya and Dengue Virus Infections during Simultaneous Outbreaks, Gabon, 2007." *Emerging Infectious Diseases* 15, no. 4 (April 2009): 591–93. doi:10.3201/eid1504.080664.

Concurrent Chikungunya and Dengue Virus Infections during Simultaneous Outbreaks, Gabon, 2007." *Emerging Infectious Diseases* 15, no. 4 (April 2009): 591–93. doi:10.3201/eid1504.080664.

Levitt, N H, H H Ramsburg, S E Hasty, P M Repik, F E Cole Jr, and H W Lupton. "Development of an Attenuated Strain of Chikungunya Virus for Use in Vaccine Production." *Vaccine* 4, no. 3 (September 1986): 157–62.

Libraty, D H, S Pichyangkul, C Ajariyakhajorn, T P Endy, and F A Ennis. "Human Dendritic Cells Are Activated by Dengue Virus Infection: Enhancement by Gamma Interferon and Implications for Disease Pathogenesis." *Journal of Virology* 75, no. 8 (April 2001): 3501–8. doi:10.1128/JVI.75.8.3501-3508.2001.

Libraty, Daniel H, Paul R Young, Darren Pickering, Timothy P Endy, Siripen Kalayanarooj, Sharone Green, David W Vaughn, Ananda Nisalak, Francis A Ennis, and Alan L Rothman. "High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever." *The Journal of Infectious Diseases* 186, no. 8 (October 15, 2002): 1165–68. doi:10.1086/343813.

Lieto, L D, K Maasho, D West, F Borrego, and J E Coligan. "The Human CD94 Gene Encodes Multiple, Expressible Transcripts Including a New Partner of NKG2A/B." *Genes and Immunity* 7, no. 1 (January 2006): 36–43. doi:10.1038/sj.gene.6364268.

Lindenbach, Brett D, and Charles M Rice. "Molecular Biology of Flaviviruses." *Advances in Virus Research* 59 (2003): 23–61.

Liu, Wen Jun, Hua Bo Chen, and Alexander A Khromykh. "Molecular and Functional Analyses of Kunjin Virus Infectious cDNA Clones Demonstrate the Essential Roles for NS2A in Virus Assembly and for a Nonconservative Residue in NS3 in RNA Replication." *Journal of Virology* 77, no. 14 (July 2003): 7804–13.

Ljunggren, H G, and K Kärre. "In Search of the 'Missing Self': MHC Molecules and NK Cell Recognition." *Immunology Today* 11, no. 7 (July 1990): 237–44.

Lobigs, Mario, Arno Müllbacher, and Matthias Regner. "MHC Class I up-Regulation by Flaviviruses: Immune Interaction with Unknown Advantage to Host or Pathogen." *Immunology and Cell Biology* 81, no. 3 (June 2003): 217–23. doi:10.1046/j.1440-1711.2003.01161.x.

López-Botet, M, M Llano, F Navarro, and T Bellón. "NK Cell Recognition of Non-Classical HLA Class I Molecules." *Seminars in Immunology* 12, no. 2 (April 2000): 109–19. doi:10.1006/smim.2000.0213.

Lum, Julian J, David J Schnepfle, Zilin Nie, Jaime Sanchez-Dardon, Georgina L Mbisa, Jennifer Mihowich, Nanci Hawley, et al. "Differential Effects of Interleukin-7 and Interleukin-15 on NK Cell Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity." *Journal of Virology* 78, no. 11 (June 2004): 6033–42. doi:10.1128/JVI.78.11.6033-6042.2004.

Mackenzie, J S, K B Chua, P W Daniels, B T Eaton, H E Field, R A Hall, K Halpin, et al. "Emerging Viral Diseases of Southeast Asia and the Western Pacific." *Emerging Infectious Diseases* 7, no. 3 Suppl (2001): 497–504. doi:10.3201/eid0707.010703.

Maghazachi AA. "Role of chemokines in the biology of natural killer cells" *Curr Top Microbiol Immunol*, 341 (2010): 37-58, doi: 10.1007/82\_2010\_20.

Magri, Giuliana, Aura Muntasell, Neus Romo, Andrea Sáez-Borderías, Daniela Pende, Daniel E Geraghty, Hartmut Hengel, Ana Angulo, Alessandro Moretta, and Miguel López-Botet. "NKp46 and DNAM-1 NK-Cell Receptors Drive the Response to Human Cytomegalovirus-Infected Myeloid Dendritic Cells Overcoming Viral Immune Evasion Strategies." *Blood* 117, no. 3 (January 20, 2011):

848–56. doi:10.1182/blood-2010-08-301374.

Malvy, Denis, Khaled Ezzedine, Maria Mamani-Matsuda, Brigitte Autran, Hugues Tolou, Marie-Catherine Receveur, Thierry Pistone, Jérôme Rambert, Daniel Moynet, and Djavad Mossalayi. “Destructive Arthritis in a Patient with Chikungunya Virus Infection with Persistent Specific IgM Antibodies.” *BMC Infectious Diseases* 9 (2009): 200. doi:10.1186/1471-2334-9-200.

Mandelboim, O, N Lieberman, M Lev, L Paul, T I Arnon, Y Bushkin, D M Davis, J L Strominger, J W Yewdell, and A Porgador. “Recognition of Haemagglutinins on Virus-Infected Cells by NKp46 Activates Lysis by Human NK Cells.” *Nature* 409, no. 6823 (February 22, 2001): 1055–60. doi:10.1038/35059110.

Mangada, Maloy M, and Alan L Rothman. “Altered Cytokine Responses of Dengue-Specific CD4+ T Cells to Heterologous Serotypes.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175, no. 4 (August 15, 2005): 2676–83.

Mangada, Marlou M, Francis A Ennis, and Alan L Rothman. “Quantitation of Dengue Virus Specific CD4+ T Cells by Intracellular Cytokine Staining.” *Journal of Immunological Methods* 284, no. 1–2 (January 2004): 89–97.

Markeljević, J, M Marusić, B Uzarević, M Petrovecki, N Cikes, D Babić-Naglić, and Z Horvat. “Natural Killer Cell Number and Activity in Remission Phase of Systemic Connective Tissue Diseases.” *Journal of Clinical & Laboratory Immunology* 35, no. 3 (July 1991): 133–38.

Marovich, M, G Grouard-Vogel, M Louder, M Eller, W Sun, S J Wu, R Putvatana, et al. “Human Dendritic Cells as Targets of Dengue Virus Infection.” *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research* 6, no. 3 (December 2001): 219–24. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.00037.x.

Martin, Annalise M, Jerzy K Kulski, Silvana Gaudieri, Campbell S Witt, Elizabeth M Freitas, John Trowsdale, and Frank T Christiansen. “Comparative Genomic Analysis, Diversity and Evolution of Two KIR Haplotypes A and B.” *Gene* 335 (June 23, 2004): 121–31. doi:10.1016/j.gene.2004.03.018.

Martin, Maureen P, George Nelson, Jeong-Hee Lee, Fawnda Pellett, Xiaojiang Gao, Judith Wade, Michael J Wilson, John Trowsdale, Dafna Gladman, and Mary Carrington. “Cutting Edge: Susceptibility to Psoriatic Arthritis: Influence of Activating Killer Ig-like Receptor Genes in the Absence of Specific HLA-C Alleles.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169, no. 6 (September 15, 2002): 2818–22.

Martín-Fontecha, Alfonso, Lindy L Thomsen, Sara Brett, Craig Gerard, Martin Lipp, Antonio Lanzavecchia, and Federica Sallusto. “Induced Recruitment of NK Cells to Lymph Nodes Provides IFN-Gamma for T(H)1 Priming.” *Nature Immunology* 5, no. 12 (December 2004): 1260–65. doi:10.1038/ni1138.

Martins, Sharon de T, Guilherme F Silveira, Lysangela R Alves, Claudia Nunes Duarte dos Santos, and Juliano Bordignon. “Dendritic Cell Apoptosis and the Pathogenesis of Dengue.” *Viruses* 4, no. 11 (November 2012): 2736–53. doi:10.3390/v4112736.

McIntosh, B M. “Antibody against Chikungunya Virus in Wild Primates in Southern Africa.” *The South African Journal of Medical Sciences* 35, no. 3 (December 1970): 65–74.

MCINTOSH, B M, R M HARWIN, H E PATERSON, and M L WESTWATER. “AN EPIDEMIC OF CHIKUNGUNYA IN SOUTH-EASTERN SOUTHERN RHODESIA.” *The Central African Journal of Medicine* 43 (September 1963): 351–59.

Meertens, Laurent, Xavier Carnec, Manuel Perera Lecoin, Rasika Ramdasi, Florence Guivel-Benhassine, Erin Lew, Greg Lemke, Olivier Schwartz, and Ali Amara. “The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry.” *Cell Host & Microbe* 12, no. 4 (October 18, 2012): 544–57. doi:10.1016/j.chom.2012.08.009.

Mehrotra, P T, R P Donnelly, S Wong, H Kanegane, A Geremew, H S Mostowski, K Furuke, J P Siegel, and E T Bloom. “Production of IL-10 by Human Natural Killer Cells Stimulated with IL-2

- And/or IL-12.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 160, no. 6 (March 15, 1998): 2637–44.
- Melki, Marie-Thérèse, Héla Saïdi, Alexandre Dufour, Jean-Christophe Olivo-Marin, and Marie-Lise Gougeon. “Escape of HIV-1-Infected Dendritic Cells from TRAIL-Mediated NK Cell Cytotoxicity during NK-DC Cross-Talk--a Pivotal Role of HMGB1.” *PLoS Pathogens* 6, no. 4 (April 2010): e1000862. doi:10.1371/journal.ppat.1000862.
- Men, R, M Bray, D Clark, R M Chanock, and C J Lai. “Dengue Type 4 Virus Mutants Containing Deletions in the 3’ Noncoding Region of the RNA Genome: Analysis of Growth Restriction in Cell Culture and Altered Viremia Pattern and Immunogenicity in Rhesus Monkeys.” *Journal of Virology* 70, no. 6 (June 1996): 3930–37.
- Meyaard, Linde. “The Inhibitory Collagen Receptor LAIR-1 (CD305).” *Journal of Leukocyte Biology* 83, no. 4 (April 2008): 799–803. doi:10.1189/jlb.0907609.
- Miller, Joanna L, Barend J M de Wet, Barend J M deWet, Luisa Martinez-Pomares, Catherine M Radcliffe, Raymond A Dwek, Pauline M Rudd, and Siamon Gordon. “The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages.” *PLoS Pathogens* 4, no. 2 (February 8, 2008): e17. doi:10.1371/journal.ppat.0040017.
- Mistry, Anita R, and Chris A O’Callaghan. “Regulation of Ligands for the Activating Receptor NKG2D.” *Immunology* 121, no. 4 (August 2007): 439–47. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02652.x.
- Moesta, Achim K, Paul J Norman, Makoto Yawata, Nobuyo Yawata, Michael Gleimer, and Peter Parham. “Synergistic Polymorphism at Two Positions Distal to the Ligand-Binding Site Makes KIR2DL2 a Stronger Receptor for HLA-C than KIR2DL3.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180, no. 6 (March 15, 2008): 3969–79.
- Mongkolsapaya, Juthathip, Wanwisa Dejnirattisai, Xiao-ning Xu, Sirijitt Vasanawathana, Nattaya Tangthawornchaikul, Aroonrung Chairunsri, Siraporn Sawasdivorn, et al. “Original Antigenic Sin and Apoptosis in the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever.” *Nature Medicine* 9, no. 7 (July 2003): 921–27. doi:10.1038/nm887.
- Mongkolsapaya, Juthathip, Thaneeya Duangchinda, Wanwisa Dejnirattisai, Sirijitt Vasanawathana, Panisadee Avirutnan, Aroonroong Jairungsri, Nuanpan Khemnu, et al. “T Cell Responses in Dengue Hemorrhagic Fever: Are Cross-Reactive T Cells Suboptimal?” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176, no. 6 (March 15, 2006): 3821–29.
- Moore, D L, S Reddy, F M Akinkugbe, V H Lee, T S David-West, O R Causey, and D E Carey. “An Epidemic of Chikungunya Fever at Ibadan, Nigeria, 1969.” *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 68, no. 1 (March 1974): 59–68.
- Moore, K W, R de Waal Malefyt, R L Coffman, and A O’Garra. “Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor.” *Annual Review of Immunology* 19 (2001): 683–765. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.683.
- Moretta, Alessandro. “The Dialogue between Human Natural Killer Cells and Dendritic Cells.” *Current Opinion in Immunology* 17, no. 3 (June 2005): 306–11. doi:10.1016/j.coi.2005.03.004.
- Mota, Javier, and Rebeca Rico-Hesse. “Dengue Virus Tropism in Humanized Mice Recapitulates Human Dengue Fever.” *PloS One* 6, no. 6 (2011): e20762. doi:10.1371/journal.pone.0020762.
- Muñoz-Jordán, Jorge L, Maudry Laurent-Rolle, Joseph Ashour, Luis Martínez-Sobrido, Mundrigi Ashok, W Ian Lipkin, and Adolfo García-Sastre. “Inhibition of Alpha/beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses.” *Journal of Virology* 79, no. 13 (July 2005): 8004–13. doi:10.1128/JVI.79.13.8004-8013.2005.
- Muñoz-Jordan, Jorge L, Gilma G Sánchez-Burgos, Maudry Laurent-Rolle, and Adolfo García-Sastre. “Inhibition of Interferon Signaling by Dengue Virus.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, no. 24 (November 25, 2003): 14333–38. doi:10.1073/pnas.2335168100.
- Muntasell, Aura, Marcel Costa-Garcia, Andrea Vera, Noemí Marina-Garcia, Carsten J Kirschning, and

- Miguel López-Botet. "Priming of NK Cell Anti-Viral Effector Mechanisms by Direct Recognition of Human Cytomegalovirus." *Frontiers in Immunology* 4 (2013): 40. doi:10.3389/fimmu.2013.00040.
- Murphy, A Z, M Ennis, T A Rizvi, M M Behbehani, and M T Shipley. "Fos Expression Induced by Changes in Arterial Pressure Is Localized in Distinct, Longitudinally Organized Columns of Neurons in the Rat Midbrain Periaqueductal Gray." *The Journal of Comparative Neurology* 360, no. 2 (September 18, 1995): 286–300. doi:10.1002/cne.903600207.
- Muyembe-Tamfum, J J, C N Peyrefitte, R Yogolelo, E Mathina Basisya, D Koyange, E Pukuta, M Mashako, H Tolou, and J P Durand. "[Epidemic of Chikungunya virus in 1999 and 200 in the Democratic Republic of the Congo]." *Médecine tropicale: revue du Corps de santé colonial* 63, no. 6 (2003): 637–38.
- Myers, R M, and D E Carey. "Concurrent Isolation from Patient of Two Arboviruses, Chikungunya and Dengue Type 2." *Science (New York, N.Y.)* 157, no. 3794 (September 15, 1967): 1307–8.
- Nagler, A, L L Lanier, S Cwirla, and J H Phillips. "Comparative Studies of Human FcRIII-Positive and Negative Natural Killer Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 143, no. 10 (November 15, 1989): 3183–91.
- Napoli, Christian, Pasquale Salcuni, Maria Grazia Pompa, Silvia Declich, and Caterina Rizzo. "Estimated Imported Infections of Chikungunya and Dengue in Italy, 2008 to 2011." *Journal of Travel Medicine* 19, no. 5 (October 2012): 294–97. doi:10.1111/j.1708-8305.2012.00640.x.
- Nayar, S K, O Noridah, V Paranthaman, K Ranjit, I Norizah, Y K Chem, B Mustafa, and K B Chua. "Co-Infection of Dengue Virus and Chikungunya Virus in Two Patients with Acute Febrile Illness." *The Medical Journal of Malaysia* 62, no. 4 (October 2007): 335–36.
- Nelson, George W, Maureen P Martin, Dafna Gladman, Judith Wade, John Trowsdale, and Mary Carrington. "Cutting Edge: Heterozygote Advantage in Autoimmune Disease: Hierarchy of Protection/susceptibility Conferred by HLA and Killer Ig-like Receptor Combinations in Psoriatic Arthritis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173, no. 7 (October 1, 2004): 4273–76.
- Nguyen, Khuong B, Thais P Salazar-Mather, Marc Y Dalod, Jeffrey B Van Deusen, Xiao-qing Wei, Foo Y Liew, Michael A Caligiuri, Joan E Durbin, and Christine A Biron. "Coordinated and Distinct Roles for IFN-Alpha Beta, IL-12, and IL-15 Regulation of NK Cell Responses to Viral Infection." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169, no. 8 (October 15, 2002): 4279–87.
- Coordinated and Distinct Roles for IFN-Alpha Beta, IL-12, and IL-15 Regulation of NK Cell Responses to Viral Infection." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169, no. 8 (October 15, 2002): 4279–87.
- Nimmannitya, S, S B Halstead, S N Cohen, and M R Margiotta. "Dengue and Chikungunya Virus Infection in Man in Thailand, 1962-1964. I. Observations on Hospitalized Patients with Hemorrhagic Fever." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 18, no. 6 (November 1969): 954–71.
- Obeyesekere, I, and Y Hermon. "Arbovirus Heart Disease: Myocarditis and Cardiomyopathy Following Dengue and Chikungunya Fever--a Follow-up Study." *American Heart Journal* 85, no. 2 (February 1973): 186–94.
- Oliviero, Barbara, Stefania Varchetta, Enrica Paudice, Giuseppe Michelone, Marco Zaramella, Domenico Mavilio, Francesca De Filippi, Savino Bruno, and Mario U Mondelli. "Natural Killer Cell Functional Dichotomy in Chronic Hepatitis B and Chronic Hepatitis C Virus Infections." *Gastroenterology* 137, no. 3 (September 2009): 1151–1160. doi:10.1053/j.gastro.2009.05.047.
- Osada, T, H Nagawa, J Kitayama, N H Tsuno, S Ishihara, M Takamizawa, and Y Shibata. "Peripheral Blood Dendritic Cells, but Not Monocyte-Derived Dendritic Cells, Can Augment Human NK Cell Function." *Cellular Immunology* 213, no. 1 (October 10, 2001): 14–23. doi:10.1006/cimm.2001.1858.
- Owen, Rachel E, Eriko Yamada, Catherine I Thompson, Louisa J Phillipson, Clare Thompson, Elizabeth Taylor, Maria Zambon, Helen M I Osborn, Wendy S Barclay, and Persephone Borrow.

“Alterations in Receptor Binding Properties of Recent Human Influenza H3N2 Viruses Are Associated with Reduced Natural Killer Cell Lysis of Infected Cells.” *Journal of Virology* 81, no. 20 (October 2007): 11170–78. doi:10.1128/JVI.01217-07.

Ozden, Simona, Michel Huerre, Jean-Pierre Riviere, Lark L Coffey, Philippe V Afonso, Vincent Mouly, Jean de Monredon, et al. “Human Muscle Satellite Cells as Targets of Chikungunya Virus Infection.” *PloS One* 2, no. 6 (2007): e527. doi:10.1371/journal.pone.0000527.

Padbidri, V S, and T T Gnaneswar. “Epidemiological Investigations of Chikungunya Epidemic at Barsi, Maharashtra State, India.” *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology* 23, no. 4 (1979): 445–51.

Pagès, F, V Corbel, and C Paupy. “[*Aedes albopictus*: chronical of a spreading vector].” *Médecine tropicale: revue du Corps de santé colonial* 66, no. 3 (June 2006): 226–28.

Palmer, Dupeh R, Peifang Sun, Christina Celluzzi, John Bisbing, Somnang Pang, Wellington Sun, Mary A Marovich, and Timothy Burgess. “Differential Effects of Dengue Virus on Infected and Bystander Dendritic Cells.” *Journal of Virology* 79, no. 4 (February 2005): 2432–39. doi:10.1128/JVI.79.4.2432-2439.2005.

Panning, Marcus, Remi N Charrel, Oliver Donoso Mantke, Oliver D Mantke, Olfert Landt, Matthias Niedrig, and Christian Drosten. “Coordinated Implementation of Chikungunya Virus Reverse Transcription-PCR.” *Emerging Infectious Diseases* 15, no. 3 (March 2009): 469–71. doi:10.3201/eid1503.081104.

Panning, Marcus, Klaus Grywna, Marjan van Esbroeck, Petra Emmerich, and Christian Drosten. “Chikungunya Fever in Travelers Returning to Europe from the Indian Ocean Region, 2006.” *Emerging Infectious Diseases* 14, no. 3 (March 2008): 416–22. doi:10.3201/eid1403.070906.

Parham, Peter. “MHC Class I Molecules and KIRs in Human History, Health and Survival.” *Nature Reviews. Immunology* 5, no. 3 (March 2005): 201–14. doi:10.1038/nri1570.

Pastorino, B, J J Muyembe-Tamfum, M Bessaud, F Tock, H Tolou, J P Durand, and C N Peyrefitte. “Epidemic Resurgence of Chikungunya Virus in Democratic Republic of the Congo: Identification of a New Central African Strain.” *Journal of Medical Virology* 74, no. 2 (October 2004): 277–82. doi:10.1002/jmv.20168.

Pastorino, Boris, Maël Bessaud, Marc Grandadam, Severine Murri, Hugues J Tolou, and Christophe N Peyrefitte. “Development of a TaqMan RT-PCR Assay without RNA Extraction Step for the Detection and Quantification of African Chikungunya Viruses.” *Journal of Virological Methods* 124, no. 1–2 (March 2005): 65–71. doi:10.1016/j.jviromet.2004.11.002.

Paul, S D, and K R Singh. “Experimental Infection of *Macaca Radiata* with Chikungunya Virus and Transmission of Virus by Mosquitoes.” *The Indian Journal of Medical Research* 56, no. 6 (June 1968): 802–11.

Perussia. “The Cytokine Profile of Resting and Activated NK Cells.” *Methods (San Diego, Calif.)* 9, no. 2 (April 1996): 370–78.

Perussia, B, G Trinchieri, A Jackson, N L Warner, J Faust, H Rumpold, D Kraft, and L L Lanier. “The Fc Receptor for IgG on Human Natural Killer Cells: Phenotypic, Functional, and Comparative Studies with Monoclonal Antibodies.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 133, no. 1 (July 1984): 180–89.

Petitdemange, Caroline, Pierre Becquart, Nadia Wauquier, Vivien Béziat, Patrice Debré, Eric M Leroy, and Vincent Vieillard. “Unconventional Repertoire Profile Is Imprinted during Acute Chikungunya Infection for Natural Killer Cells Polarization toward Cytotoxicity.” *PLoS Pathogens* 7, no. 9 (September 2011): e1002268. doi:10.1371/journal.ppat.1002268.

Peyrefitte, Christophe N, Dominique Rousset, Boris A M Pastorino, Regis Pouillot, Maël Bessaud, Fabienne Tock, Helene Mansaray, et al. “Chikungunya Virus, Cameroon, 2006.” *Emerging Infectious Diseases* 13, no. 5 (May 2007): 768–71. doi:10.3201/eid1305.061500.



- Pfeffer, M, B Linssen, M D Parke, and R M Kinney. "Specific Detection of Chikungunya Virus Using a RT-PCR/nested PCR Combination." *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 49, no. 1 (February 2002): 49–54.
- Pialoux, G, B-A Gaüzère, and M Strobel. "[Chikungunya virus infection: review through an epidemic]." *Médecine et maladies infectieuses* 36, no. 5 (May 2006): 253–63. doi:10.1016/j.medmal.2006.04.002.
- Piccioli, Diego, Silverio Sbrana, Emiliano Melandri, and Nicholas M Valiante. "Contact-Dependent Stimulation and Inhibition of Dendritic Cells by Natural Killer Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 195, no. 3 (February 4, 2002): 335–41.
- Plante, Kenneth, Eryu Wang, Charalambos D Partidos, James Weger, Rodion Gorchakov, Konstantin Tsetsarkin, Erin M Borland, et al. "Novel Chikungunya Vaccine Candidate with an IRES-Based Attenuation and Host Range Alteration Mechanism." *PLoS Pathogens* 7, no. 7 (July 2011): e1002142. doi:10.1371/journal.ppat.1002142.
- Plougastel, B, and J Trowsdale. "Cloning of NKG2-F, a New Member of the NKG2 Family of Human Natural Killer Cell Receptor Genes." *European Journal of Immunology* 27, no. 11 (November 1997): 2835–39. doi:10.1002/eji.1830271114.
- Porter, Kevin R, Ratna Tan, Yunry Istary, Wuryadi Suharyono, Sutaryo, Susana Widjaja, Chairin Ma'Roef, et al. "A Serological Study of Chikungunya Virus Transmission in Yogyakarta, Indonesia: Evidence for the First Outbreak since 1982." *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 35, no. 2 (June 2004): 408–15.
- Powers, A M, A C Brault, R B Tesh, and S C Weaver. "Re-Emergence of Chikungunya and O'nyong-Nyong Viruses: Evidence for Distinct Geographical Lineages and Distant Evolutionary Relationships." *The Journal of General Virology* 81, no. Pt 2 (February 2000): 471–79.
- Powers, Ann M, and Christopher H Logue. "Changing Patterns of Chikungunya Virus: Re-Emergence of a Zoonotic Arbovirus." *The Journal of General Virology* 88, no. Pt 9 (September 2007): 2363–77. doi:10.1099/vir.0.82858-0.
- Qiu, F X, D J Gubler, J C Liu, and Q Q Chen. "Dengue in China: A Clinical Review." *Bulletin of the World Health Organization* 71, no. 3–4 (1993): 349–59.
- Qiu, Fu, Amudhan Maniar, Marco Quevedo Diaz, Andrei I Chapoval, and Andrei E Medvedev. "Activation of Cytokine-Producing and Antitumor Activities of Natural Killer Cells and Macrophages by Engagement of Toll-like and NOD-like Receptors." *Innate Immunity* 17, no. 4 (August 2011): 375–87. doi:10.1177/1753425910372000.
- Rajagopalan, S, and E O Long. "A Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-G-Specific Receptor Expressed on All Natural Killer Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 189, no. 7 (April 5, 1999): 1093–1100.
- Rajagopalan, S and Long, EO. "KIR2DL4 (D158d): An activation receptor for HLA-G". *Front Immunol* 258 (Aug 2012). doi: 10.3389/jimmu.2012.00258.
- Raulet, David H, Stephan Gasser, Benjamin G Gowen, Weiwen Deng, and Heiyoun Jung. "Regulation of Ligands for the NKG2D Activating Receptor." *Annual Review of Immunology* 31 (2013): 413–41. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095951.
- Raviprakash, Kanakatte, Danher Wang, Dan Ewing, David H Holman, Karla Block, Jan Woraratanadharm, Lan Chen, Curtis Hayes, John Y Dong, and Kevin Porter. "A Tetravalent Dengue Vaccine Based on a Complex Adenovirus Vector Provides Significant Protection in Rhesus Monkeys against All Four Serotypes of Dengue Virus." *Journal of Virology* 82, no. 14 (July 2008): 6927–34. doi:10.1128/JVI.02724-07.
- Recker, Mario, Konstantin B Blyuss, Cameron P Simmons, Tran Tinh Hien, Bridget Wills, Jeremy Farrar, and Sunetra Gupta. "Immunological Serotype Interactions and Their Effect on the Epidemiological Pattern of Dengue." *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 276, no. 1667 (July 22, 2009): 2541–48. doi:10.1098/rspb.2009.0331.

- Rigau-Pérez, J G, G G Clark, D J Gubler, P Reiter, E J Sanders, and A V Vorndam. "Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever." *Lancet* 352, no. 9132 (September 19, 1998): 971–77.
- Rinaldo, C R, Jr, J C Overall Jr, and L A Glasgow. "Viral Replication and Interferon Production in Fetal and Adult Ovine Leukocytes and Spleen Cells." *Infection and Immunity* 12, no. 5 (November 1975): 1070–77.
- Robertson, M J, M A Caligiuri, T J Manley, H Levine, and J Ritz. "Human Natural Killer Cell Adhesion Molecules. Differential Expression after Activation and Participation in Cytolysis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 145, no. 10 (November 15, 1990): 3194–3201.
- Robinson, M C. "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, no. 1 (January 1955): 28–32.
- Romero, Viviana, Jose Azocar, Joaquin Zúñiga, Olga P Clavijo, Daniel Terreros, Xiangjun Gu, Zaheed Husain, Raymond T Chung, Christopher Amos, and Edmond J Yunis. "Interaction of NK Inhibitory Receptor Genes with HLA-C and MHC Class II Alleles in Hepatitis C Virus Infection Outcome." *Molecular Immunology* 45, no. 9 (May 2008): 2429–36. doi:10.1016/j.molimm.2008.01.002.
- ROSS, R W. "The Newala Epidemic. III. The Virus: Isolation, Pathogenic Properties and Relationship to the Epidemic." *The Journal of Hygiene* 54, no. 2 (June 1956): 177–91.
- Rozilawati, H, A Y Faudzi, A A Siti Rahidah, A H Nor Azlina, A G Abdullah, N M Amal, H Wan Mansor, et al. "Entomological Study of Chikungunya Infections in the State of Kelantan, Malaysia." *The Indian Journal of Medical Research* 133 (June 2011): 670–73.
- Rumpold, H, D Kraft, G Obexer, G Böck, and W Gebhart. "A Monoclonal Antibody against a Surface Antigen Shared by Human Large Granular Lymphocytes and Granulocytes." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 129, no. 4 (October 1982): 1458–64.
- Russier, Marion, Delphine Pannetier, and Sylvain Baize. "Immune Responses and Lassa Virus Infection." *Viruses* 4, no. 11 (November 2012): 2766–85. doi:10.3390/v4112766.
- Rutcharin Potiwat, Narumon Komalamisra, Usavadee Thavara, Apiwat Tawatsin and Padet Siriyasatien. "Competitive suppression between chikungunya and dengue virus in *Aedes albopictus* C6/36 cell line". *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2011 Nov;42(6):1388-94.
- Sabin, A B, and R W Schlesinger. "PRODUCTION OF IMMUNITY TO DENGUE WITH VIRUS MODIFIED BY PROPAGATION IN MICE." *Science (New York, N.Y.)* 101, no. 2634 (June 22, 1945): 640–42. doi:10.1126/science.101.2634.640.
- Sam, I-C, and S AbuBakar. "Chikungunya Virus Infection." *The Medical Journal of Malaysia* 61, no. 2 (June 2006): 264–69.
- Samuel, C E. "Antiviral Actions of Interferons." *Clinical Microbiology Reviews* 14, no. 4 (October 2001): 778–809, table of contents. doi:10.1128/CMR.14.4.778-809.2001.
- Santhosh, S R, P K Dash, M M Parida, M Khan, M Tiwari, and P V Lakshmana Rao. "Comparative Full Genome Analysis Revealed E1: A226V Shift in 2007 Indian Chikungunya Virus Isolates." *Virus Research* 135, no. 1 (July 2008): 36–41. doi:10.1016/j.virusres.2008.02.004.
- Scalzo, Anthony A. "Successful Control of Viruses by NK Cells--a Balance of Opposing Forces?" *Trends in Microbiology* 10, no. 10 (October 2002): 470–74.
- Schilling, Stefan, Petra Emmerich, Stephan Günther, and Jonas Schmidt-Chanasit. "Dengue and Chikungunya Virus Co-Infection in a German Traveller." *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 45, no. 2 (June 2009): 163–64. doi:10.1016/j.jcv.2009.04.001.
- Schilte, Clémentine, Thérèse Couderc, Fabrice Chretien, Marion Sourisseau, Nicolas Gangneux, Florence Guivel-Benhassine, Anton Kraxner, et al. "Type I IFN Controls Chikungunya Virus via Its

- Action on Nonhematopoietic Cells.” *The Journal of Experimental Medicine* 207, no. 2 (February 15, 2010): 429–42. doi:10.1084/jem.20090851.
- Schneck, J M. “Benjamin Rush and Animal Magnetism, 1789 and 1812.” *The International Journal of Clinical and Experimental Hypnosis* 26, no. 1 (January 1978): 9–14. doi:10.1080/00207147808414458.
- Schroder, Kate, Paul J Hertzog, Timothy Ravasi, and David A Hume. “Interferon-Gamma: An Overview of Signals, Mechanisms and Functions.” *Journal of Leukocyte Biology* 75, no. 2 (February 2004): 163–89. doi:10.1189/jlb.0603252.
- Schuffenecker, Isabelle, Isabelle Iteman, Alain Michault, Séverine Murri, Lionel Frangeul, Marie-Christine Vaney, Rachel Lavenir, et al. “Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak.” *PLoS Medicine* 3, no. 7 (July 2006): e263. doi:10.1371/journal.pmed.0030263.
- Schwartz, Olivier, and Matthew L Albert. “Biology and Pathogenesis of Chikungunya Virus.” *Nature Reviews. Microbiology* 8, no. 7 (July 2010): 491–500. doi:10.1038/nrmicro2368.
- Scott-Algara, Daniel, Vincent Arnold, Céline Didier, Tarek Kattan, Gianluca Pirozzi, Françoise Barré-Sinoussi, and Gianfranco Pancino. “The CD85j+ NK Cell Subset Potently Controls HIV-1 Replication in Autologous Dendritic Cells.” *PloS One* 3, no. 4 (2008): e1975. doi:10.1371/journal.pone.0001975.
- Seligman, Stephen J, and Ernest A Gould. “Live Flavivirus Vaccines: Reasons for Caution.” *Lancet* 363, no. 9426 (June 19, 2004): 2073–75. doi:10.1016/S0140-6736(04)16459-3.
- Sergon, Kibet, Ali Ahmed Yahaya, Jennifer Brown, Said A Bedja, Mohammed Mlindasse, Naphtali Agata, Yokouide Allaranger, et al. “Seroprevalence of Chikungunya Virus Infection on Grande Comore Island, Union of the Comoros, 2005.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76, no. 6 (June 2007): 1189–93.
- SHAH, K V, C J GIBBS Jr, and G BANERJEE. “VIROLOGICAL INVESTIGATION OF THE EPIDEMIC OF HAEMORRHAGIC FEVER IN CALCUTTA: ISOLATION OF THREE STRAINS OF CHIKUNGUNYA VIRUS.” *The Indian Journal of Medical Research* 52 (July 1964): 676–83.
- Shibuya, A, D Campbell, C Hannum, H Yssel, K Franz-Bacon, T McClanahan, T Kitamura, et al. “DNAM-1, a Novel Adhesion Molecule Involved in the Cytolytic Function of T Lymphocytes.” *Immunity* 4, no. 6 (June 1996): 573–81.
- Shresta, Sujan, Jennifer L Kyle, P Robert Beatty, and Eva Harris. “Early Activation of Natural Killer and B Cells in Response to Primary Dengue Virus Infection in A/J Mice.” *Virology* 319, no. 2 (February 20, 2004): 262–73. doi:10.1016/j.virol.2003.09.048.
- Shresta, Sujan, Jennifer L Kyle, Heidi M Snider, Manasa Basavapatna, P Robert Beatty, and Eva Harris. “Interferon-Dependent Immunity Is Essential for Resistance to Primary Dengue Virus Infection in Mice, Whereas T- and B-Cell-Dependent Immunity Are Less Critical.” *Journal of Virology* 78, no. 6 (March 2004): 2701–10.
- Simasathien, Sriluck, Stephen J Thomas, Veerachai Watanaveeradej, Ananda Nisalak, Célia Barberousse, Bruce L Innis, Wellington Sun, et al. “Safety and Immunogenicity of a Tetravalent Live-Attenuated Dengue Vaccine in Flavivirus Naive Children.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78, no. 3 (March 2008): 426–33.
- Simizu, B, K Yamamoto, K Hashimoto, and T Ogata. “Structural Proteins of Chikungunya Virus.” *Journal of Virology* 51, no. 1 (July 1984): 254–58.
- Simon, Fabrice, Emilie Javelle, Manuela Oliver, Isabelle Leparç-Goffart, and Catherine Marimoutou. “Chikungunya Virus Infection.” *Current Infectious Disease Reports* 13, no. 3 (June 2011): 218–28. doi:10.1007/s11908-011-0180-1.
- Simon, Fabrice, Philippe Parola, Marc Grandadam, Sabrina Fourcade, Manuela Oliver, Philippe Brouqui, Pierre Hance, et al. “Chikungunya Infection: An Emerging Rheumatism among Travelers Returned from Indian Ocean Islands. Report of 47 Cases.” *Medicine* 86, no. 3 (May 2007): 123–37.

doi:10.1097/MD/0b013e31806010a5.

Sissoko, Daouda, Denis Malvy, Khaled Ezzedine, Philippe Renault, Frederic Moscetti, Martine Ledrans, and Vincent Pierre. "Post-Epidemic Chikungunya Disease on Reunion Island: Course of Rheumatic Manifestations and Associated Factors over a 15-Month Period." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3, no. 3 (2009): e389. doi:10.1371/journal.pntd.0000389.

Sissoko, Daouda, Denis Malvy, Claude Giry, Gilles Delmas, Christophe Paquet, Philippe Gabrie, François Pettinelli, Marie Anne Sanquer, and Vincent Pierre. "Outbreak of Chikungunya Fever in Mayotte, Comoros Archipelago, 2005-2006." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102, no. 8 (August 2008): 780–86. doi:10.1016/j.trstmh.2008.02.018.

Smith, C E G. "The History of Dengue in Tropical Asia and Its Probable Relationship to the Mosquito *Aedes Aegypti*." *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59, no. 10 (October 1956): 243–51.

Sobanov, Y, J Glienke, C Brostjan, H Lehrach, F Francis, and E Hofer. "Linkage of the NKG2 and CD94 Receptor Genes to D12S77 in the Human Natural Killer Gene Complex." *Immunogenetics* 49, no. 2 (February 1999): 99–105.

Solignat, Maxime, Bernard Gay, Stephen Higgs, Laurence Briant, and Christian Devaux. "Replication Cycle of Chikungunya: A Re-Emerging Arbovirus." *Virology* 393, no. 2 (October 25, 2009): 183–97. doi:10.1016/j.virol.2009.07.024.

Sourisseau, Marion, Clémentine Schilte, Nicoletta Casartelli, Céline Trouillet, Florence Guivel-Benhassine, Dominika Rudnicka, Nathalie Sol-Foulon, et al. "Characterization of Reemerging Chikungunya Virus." *PLoS Pathogens* 3, no. 6 (June 2007): e89. doi:10.1371/journal.ppat.0030089.

Spaggiari, G M, R Carosio, D Pende, S Marcenaro, P Rivera, M R Zocchi, L Moretta, and A Poggi. "NK Cell-Mediated Lysis of Autologous Antigen-Presenting Cells Is Triggered by the Engagement of the Phosphatidylinositol 3-Kinase upon Ligation of the Natural Cytotoxicity Receptors NKp30 and NKp46." *European Journal of Immunology* 31, no. 6 (June 2001): 1656–65. doi:10.1002/1521-4141(200106)31:6<1656::AID-IMMU1656>3.0.CO;2-V.

Spits, H, L L Lanier, and J H Phillips. "Development of Human T and Natural Killer Cells." *Blood* 85, no. 10 (May 15, 1995): 2654–70.

Strauss, J H, and E G Strauss. "The Alphaviruses: Gene Expression, Replication, and Evolution." *Microbiological Reviews* 58, no. 3 (September 1994): 491–562.

Sudiro, T M, J Zivny, H Ishiko, S Green, D W Vaughn, S Kalayanarooj, A Nisalak, J E Norman, F A Ennis, and A L Rothman. "Analysis of Plasma Viral RNA Levels during Acute Dengue Virus Infection Using Quantitative Competitor Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction." *Journal of Medical Virology* 63, no. 1 (January 2001): 29–34.

Tabiasco, Julie, Alain Vercellone, Fabienne Meggetto, Denis Hudrisier, Pierre Brousset, and Jean-Jacques Fournié. "Acquisition of Viral Receptor by NK Cells through Immunological Synapse." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170, no. 12 (June 15, 2003): 5993–98.

Taraphdar, Debjani, Arindam Sarkar, Bansi B Mukhopadhyay, and Shyamalendu Chatterjee. "A Comparative Study of Clinical Features between Monotypic and Dual Infection Cases with Chikungunya Virus and Dengue Virus in West Bengal, India." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 86, no. 4 (April 2012): 720–23. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0704.

Tarr, P E. "Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and the Immune System." *Medical Oncology (Northwood, London, England)* 13, no. 3 (September 1996): 133–40.

Tassaneeritthep, Boonrat, Timothy H Burgess, Angela Granelli-Piperno, Christine Trumpfheller, Jennifer Finke, Wellington Sun, Michael A Eller, et al. "DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 197, no. 7 (April 7, 2003): 823–29. doi:10.1084/jem.20021840.

Taubitz, Winfried, Jakob P Cramer, Anette Kapaun, Martin Pfeffer, Christian Drosten, Gerhard Doblér,

Gerd D Burchard, and Thomas Löscher. "Chikungunya Fever in Travelers: Clinical Presentation and Course." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 45, no. 1 (July 1, 2007): e1–4. doi:10.1086/518701.

Teo, Teck-Hui, Fok-Moon Lum, Carla Claser, Valeria Lulla, Aleksei Lulla, Andres Merits, Laurent Rénia, and Lisa F P Ng. "A Pathogenic Role for CD4+ T Cells during Chikungunya Virus Infection in Mice." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 190, no. 1 (January 1, 2013): 259–69. doi:10.4049/jimmunol.1202177.

Thein, S, M M Aung, T N Shwe, M Aye, A Zaw, K Aye, K M Aye, and J Aaskov. "Risk Factors in Dengue Shock Syndrome." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 56, no. 5 (May 1997): 566–72.

Thorburn, A, J Thorburn, and A E Frankel. "Induction of Apoptosis by Tumor Cell-Targeted Toxins." *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 9, no. 1 (January 2004): 19–25. doi:10.1023/B:APPT.0000012118.95548.88.

Tripp, C S, S F Wolf, and E R Unanue. "Interleukin 12 and Tumor Necrosis Factor Alpha Are Costimulators of Interferon Gamma Production by Natural Killer Cells in Severe Combined Immunodeficiency Mice with Listeriosis, and Interleukin 10 Is a Physiologic Antagonist." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, no. 8 (April 15, 1993): 3725–29.

Tseng, Chien-Te K, and Gary R Klimpel. "Binding of the Hepatitis C Virus Envelope Protein E2 to CD81 Inhibits Natural Killer Cell Functions." *The Journal of Experimental Medicine* 195, no. 1 (January 7, 2002): 43–49.

Tsetsarkin, Konstantin A, Dana L Vanlandingham, Charles E McGee, and Stephen Higgs. "A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential." *PLoS Pathogens* 3, no. 12 (December 2007): e201. doi:10.1371/journal.ppat.0030201.

Uhrberg, M, N M Valiante, B P Shum, H G Shilling, K Lienert-Weidenbach, B Corliss, D Tyan, L L Lanier, and P Parham. "Human Diversity in Killer Cell Inhibitory Receptor Genes." *Immunity* 7, no. 6 (December 1997): 753–63.

Umareddy, Indira, Kin Fai Tang, Subhash G Vasudevan, Shamala Devi, Martin L Hibberd, and Feng Gu. "Dengue Virus Regulates Type I Interferon Signalling in a Strain-Dependent Manner in Human Cell Lines." *The Journal of General Virology* 89, no. Pt 12 (December 2008): 3052–62. doi:10.1099/vir.0.2008/001594-0.

Valés-Gómez, M, H T Reyburn, M Mandelboim, and J L Strominger. "Kinetics of Interaction of HLA-C Ligands with Natural Killer Cell Inhibitory Receptors." *Immunity* 9, no. 3 (September 1998): 337–44.

Valiante, N M, M Uhrberg, H G Shilling, K Lienert-Weidenbach, K L Arnett, A D'Andrea, J H Phillips, L L Lanier, and P Parham. "Functionally and Structurally Distinct NK Cell Receptor Repertoires in the Peripheral Blood of Two Human Donors." *Immunity* 7, no. 6 (December 1997): 739–51.

Vaughn, D W, S Green, S Kalayanarooj, B L Innis, S Nimmannitya, S Suntayakorn, T P Endy, et al. "Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity." *The Journal of Infectious Diseases* 181, no. 1 (January 2000): 2–9. doi:10.1086/315215.

Vazeille, Marie, Sara Moutailler, Daniel Coudrier, Claudine Rousseaux, Huot Khun, Michel Huerre, Julien Thiria, et al. "Two Chikungunya Isolates from the Outbreak of La Reunion (Indian Ocean) Exhibit Different Patterns of Infection in the Mosquito, *Aedes Albopictus*." *PloS One* 2, no. 11 (2007): e1168. doi:10.1371/journal.pone.0001168.

Velardi, Andrea, Loredana Ruggeri, Alessandro Moretta, and Lorenzo Moretta. "NK Cells: A Lesson from Mismatched Hematopoietic Transplantation." *Trends in Immunology* 23, no. 9 (September 2002): 438–44.

Vieillard, Vincent, Jack L Strominger, and Patrice Debré. "NK Cytotoxicity against CD4+ T Cells during HIV-1 Infection: A gp41 Peptide Induces the Expression of an NKp44 Ligand." *Proceedings of*

*the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, no. 31 (August 2, 2005): 10981–86. doi:10.1073/pnas.0504315102.

Vitale, M G, and D L Skaggs. “Developmental Dysplasia of the Hip from Six Months to Four Years of Age.” *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 9, no. 6 (December 2001): 401–11.

Vivier, E, N Rochet, J P Kochan, D H Presky, S F Schlossman, and P Anderson. “Structural Similarity between Fc Receptors and T Cell Receptors. Expression of the Gamma-Subunit of Fc Epsilon RI in Human T Cells, Natural Killer Cells and Thymocytes.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 147, no. 12 (December 15, 1991): 4263–70.

Vivier, E, Raulet, DH, Moretta, A, Caligiuri, MA, Zitvogel, L, Lanier, LL, Yokoyama, WM, Ugolini, S. “Innate or adaptative immunity ? The example of natural killer cells.” *Science* 331 (6013) (Jan 2011): 44-9. doi: 10.1126/science.1198687.Review

Wagtmann, N, R Biassoni, C Cantoni, S Verdiani, M S Malnati, M Vitale, C Bottino, L Moretta, A Moretta, and E O Long. “Molecular Clones of the p58 NK Cell Receptor Reveal Immunoglobulin-Related Molecules with Diversity in Both the Extra- and Intracellular Domains.” *Immunity* 2, no. 5 (May 1995): 439–49.

Wallach, D, M Fellous, and M Revel. “Preferential Effect of Gamma Interferon on the Synthesis of HLA Antigens and Their mRNAs in Human Cells.” *Nature* 299, no. 5886 (October 28, 1982): 833–36.

Wang, S-H, C-X Huang, L Ye, X Wang, L Song, Y-J Wang, H Liang, X-Y Huang, and W-Z Ho. “Natural Killer Cells Suppress Full Cycle HCV Infection of Human Hepatocytes.” *Journal of Viral Hepatitis* 15, no. 12 (December 2008): 855–64. doi:10.1111/j.1365-2893.2008.01014.x.

Warfield, Kelly L, Jeremy G Perkins, Dana L Swenson, Emily M Deal, Catharine M Bosio, M Javad Aman, Wayne M Yokoyama, Howard A Young, and Sina Bavari. “Role of Natural Killer Cells in Innate Protection against Lethal Ebola Virus Infection.” *The Journal of Experimental Medicine* 200, no. 2 (July 19, 2004): 169–79. doi:10.1084/jem.20032141.

Watson, Rory. “Europe Witnesses First Local Transmission of Chikungunya Fever in Italy.” *BMJ (Clinical Research Ed.)* 335, no. 7619 (September 15, 2007): 532–33. doi:10.1136/bmj.39332.708738.DB.

Wauquier, Nadia, Pierre Becquart, Dieudonné Nkoghe, Cindy Padilla, Angélique Ndjoyi-Mbiguino, and Eric M Leroy. “The Acute Phase of Chikungunya Virus Infection in Humans Is Associated with Strong Innate Immunity and T CD8 Cell Activation.” *The Journal of Infectious Diseases* 204, no. 1 (July 1, 2011): 115–23. doi:10.1093/infdis/jiq006.

Weaver, Jimmie D, Being J Ka, David K Morris, Ward Thompson, and Jon A Tunge. “Stereospecific Decarboxylative Allylation of Sulfones.” *Journal of the American Chemical Society* 132, no. 35 (September 8, 2010): 12179–81. doi:10.1021/ja104196x.

WEINBREN, M P, A J HADDOW, and M C WILLIAMS. “The Occurrence of Chikungunya Virus in Uganda. I. Isolation from Mosquitoes.” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 52, no. 3 (May 1958): 253–57.

Welte, Stefan, Sabrina Kuttruff, Inja Waldhauer, and Alexander Steinle. “Mutual Activation of Natural Killer Cells and Monocytes Mediated by Nkp80-AICL Interaction.” *Nature Immunology* 7, no. 12 (December 2006): 1334–42. doi:10.1038/ni1402.

Whitehead, Stephen S, Joseph E Blaney, Anna P Durbin, and Brian R Murphy. “Prospects for a Dengue Virus Vaccine.” *Nature Reviews. Microbiology* 5, no. 7 (July 2007): 518–28. doi:10.1038/nrmicro1690.

WHO, Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control (2009)

WHO, Epidemiological Record, 2007, 82(31): 273-284

Widman, Douglas G, Ilya Frolov, and Peter W Mason. “Third-Generation Flavivirus Vaccines Based on

Single-Cycle, Encapsidation-Defective Viruses.” *Advances in Virus Research* 72 (2008): 77–126. doi:10.1016/S0065-3527(08)00402-8.

Wilson, J L, J Charo, A Martín-Fontecha, P Dellabona, G Casorati, B J Chambers, R Kiessling, M T Bejarano, and H G Ljunggren. “NK Cell Triggering by the Human Costimulatory Molecules CD80 and CD86.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163, no. 8 (October 15, 1999): 4207–12.

Winter, C C, and E O Long. “A Single Amino Acid in the p58 Killer Cell Inhibitory Receptor Controls the Ability of Natural Killer Cells to Discriminate between the Two Groups of HLA-C Allotypes.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 158, no. 9 (May 1, 1997): 4026–28.

Wu, J, Y Song, A B Bakker, S Bauer, T Spies, L L Lanier, and J H Phillips. “An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10.” *Science (New York, N.Y.)* 285, no. 5428 (July 30, 1999): 730–32.

Ye, Jing, Bibo Zhu, Zhen F Fu, Huanchun Chen, and Shengbo Cao. “Immune Evasion Strategies of Flaviviruses.” *Vaccine* 31, no. 3 (January 7, 2013): 461–71. doi:10.1016/j.vaccine.2012.11.015.

Yergolkar, Prasanna N, Babasaheb V Tandale, Vidya A Arankalle, Padmakar S Sathe, A B Sudeep, Swati S Gandhe, Mangesh D Gokhle, George P Jacob, Supriya L Hundekar, and Akhilesh C Mishra. “Chikungunya Outbreaks Caused by African Genotype, India.” *Emerging Infectious Diseases* 12, no. 10 (October 2006): 1580–83. doi:10.3201/eid1210.060529.

Yossef, Rami, Benyamin Rosental, Michael Y Appel, Oren HersHKovitz, and Angel Porgador. “Upregulation of MHC Class I Expression Following Dengue Virus Infection: The Mechanism at the Promoter Level.” *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 10, no. 3 (March 2012): 285–87. doi:10.1586/eri.12.7.

Yu, Jianhua, Hsiaoyin C Mao, Min Wei, Tiffany Hughes, Jianying Zhang, Il-kyoo Park, Shujun Liu, et al. “CD94 Surface Density Identifies a Functional Intermediary between the CD56bright and CD56dim Human NK-Cell Subsets.” *Blood* 115, no. 2 (January 14, 2010): 274–81. doi:10.1182/blood-2009-04-215491.

Yusoff, Ahmad Faudzi, Amal Nasir Mustafa, Hani Mat Husaain, Wan Mansor Hamzah, Apandi Mohd Yusof, Rozilawati Harun, and Faedah Noor Abdullah. “The Assessment of Risk Factors for the Central/East African Genotype of Chikungunya Virus Infections in the State of Kelantan: A Case Control Study in Malaysia.” *BMC Infectious Diseases* 13 (2013): 211. doi:10.1186/1471-2334-13-211.

Ziegler, Sarah A, Liang Lu, Amelia P A Travassos da Rosa, Shu-Yuan Xiao, and Robert B Tesh. “An Animal Model for Studying the Pathogenesis of Chikungunya Virus Infection.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79, no. 1 (July 2008): 133–39.

Zivna, Iva, Sharone Green, David W Vaughn, Siripen Kalayanarooj, Henry A F Stephens, Dasnayanee Chandanayingyong, Ananda Nisalak, Francis A Ennis, and Alan L Rothman. “T Cell Responses to an HLA-B\*07-Restricted Epitope on the Dengue NS3 Protein Correlate with Disease Severity.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168, no. 11 (June 1, 2002): 5959–65.

**- ANNEXE -**



## **Control of acute dengue virus infection by natural killer cells**

Caroline Petitdemange<sup>1,2,3</sup>, Nadia Wauquier<sup>1,4</sup>, Juliana Rey<sup>1</sup>, Baptiste Hervier<sup>1,2</sup>, Eric Leroy<sup>3</sup>, Vincent Vieillard<sup>1,2,5\*</sup>

<sup>1</sup>Sorbonne Universités, UPMC, Univ Paris 06, CR7, CIMI-Paris, F-75005, Paris, France; <sup>2</sup>INSERM, U1135, CIMI-Paris, F-75013, Paris, France; <sup>3</sup>Centre International de Recherches Médicales de Franceville, Franceville, Gabon. <sup>4</sup>Metabiota, Inc., San Francisco, CA and Washington D.C., USA; <sup>5</sup>CNRS, ERL8255, CIMI-Paris, F-75013, Paris, France;

\*Correspondence: Vincent Vieillard, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Equipe 14 – Cellules NK et Pathologies, Hôpital La Pitié-Salpêtrière, 83 Boulevard de l'Hôpital, Paris, F-75013, France. e-mail: vincent.vieillard@upmc.fr

**Running Title:** NK cells and DENV

**Keywords:** NK cells, Dengue viral infection, cytokines, cytotoxicity, viral escape mechanisms

Word count : 2950 words

Dengue fever is the most important arthropod-borne viral disease worldwide, affecting 50 to 100 million individuals annually. The clinical picture associated with acute dengue virus (DENV) infections ranges from classical febrile illness to life-threatening disease. The innate immunity is the first line of defense in the control of viral replication. This review will examine the particular role of natural killer (NK) cells in DENV infection. Over recent years, our understanding of the interplay between NK cells and viral pathogenesis has improved significantly. NK cells express an array of inhibitory and activating receptors that enable them to detect infected targets while sparing normal cells, and to recruit adaptive immune cells. To date, the exact mechanism by which NK cells may contribute to the control of DENV infection remains elusive. Importantly, DENV has acquired mechanisms to evade NK cell responses, further underlining the relevance of these cells in pathophysiology. Hence, understanding how NK cells affect the outcome of DENV infection could benefit the management of this acute disease.

## **INTRODUCTION**

Dengue virus (DENV) is the most widespread arbovirus worldwide transmitted by mosquitoes of the *Aedes* genus and is responsible for major outbreaks leading to serious health and

economical problems (Halstead, 2007). Approximately 500,000 DENV cases progress to be a life-threatening disease each year causing up to 20,000 deaths (Sam et al., 2013). DENV is a member of the genus *Flavivirus* and is divided into four different serotypes (DENV1 to DENV4). Early 1970, Halstead et al. (1970) suggested that primary infection with one serotype of DENV only confers short-term partial cross-protection against other serotypes. Furthermore, secondary heterologous infections contribute to the development of severe forms of Dengue fever (DF) (Dengue hemorrhagic fever; DHF and Dengue shock syndrome; DSS) (Martina et al., 2009).

The clinical picture of primary DENV infection includes fever, headache, myalgia, arthralgia and petechial rash. Patients rapidly develop high viremia for up to six days after the onset of fever. The rapid initiation of the hosts' innate defense mechanisms might be a limiting factor in the development of DENV infection. In rare cases patients may develop complications including plasma leakage and coagulation disorders which may lead to a fatal outcome (Wichmann et al., 2004; Barnes et al., 1974). One of the most important questions in regards to dengue pathogenesis is the identity of the cells that play a crucial antiviral role in during the innate immune response to DENV at the earliest stages of infection (Schmidt, 2010). Natural killer (NK) cells are a major component of the innate arm of the immune system. Although NK cells hold an early and central role early after number of viral infections, not only for viral containment but also for timely and efficient induction of adaptive responses, their role in the control of DENV infection is still poorly documented. The observation in the late 1970s that viral infections induce NK cell-mediated killing stimulated a frenzy of research focused on evaluating the role of these cells in defense against several viral infections and cancer. The clearest demonstration of this role derives from the growing number of cases of NK cell deficiency. Since the initial known case of a girl with multiple severe or disseminated herpesvirus infections, about 40 other unrelated cases have been described and were mainly associated with severe herpesvirus infections, and EBV- or HPV-related cancers (Orange, 2013). Major progress has been achieved since, in several important fields related to NK cells. NK cells represented a wonderful biological paradox in that they appeared fully competent to kill target cells and yet were clearly self-tolerant. As such, NK cells were 'armed' but not dangerous. Scientists focused their attention on understanding how these potent killers were contained and controlled. We now appreciate that a precise balance of inhibitory and activating signals mainly regulates the functional outcome of these cells (Lanier, 2008; Vivier et al., 2008; Jost and Altfeld, 2013). A flood of information concerning multiple types of negative receptors on NK cells was gathered. Many of these receptors respond to stimulation by MHC class-I molecules expressed on the surface of target cells and this is considered to be the predominant mechanism responsible for NK cell tolerance to self. These inhibitory NK receptors include ILT-2 and the CD94/NKG2A complex, which recognize HLA-G and HLA-

E respectively, whereas the inhibitory killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) recognize polymorphic major histocompatibility complex (MHC) class-I molecules; in particular: KIR2DL1/KIR2DL2 and KIR2DL3 bind group 2 (C2) and group 1 (C1) HLA-C alleles, respectively, while KIR3DL1 recognizes HLA-Bw4 epitopes (Kulkarni et al., 2008). Numerous studies have shown that these factors likely synergize to generate susceptibility or resistance to pathogens and disease (Kulkarni et al., 2008; Ahlenstiel et al., 2008). In patients from southern Brazil, the susceptibility to dengue fever is positively associated with the presence of KIR3DS1-Bw4, KIR3DL1-Bw4, KIR2DL1-C2 and KIR2DS1-C2 genes, and negatively associated with KIR2DL3-C1/C1 (Beltrame et al., 2013).

To destroy a target, NK cells also present several cell-surface activating receptors such as: NKG2D, DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1), an adhesion molecule physically and functionally associated to LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1), and the natural cytotoxicity receptors (NCRs: NKp30, NKp44, and NKp46) (Koch et al., 2013; Raulet et al., 2013). Simultaneous interactions of certain of these activating receptors on NK cells with their specific ligands on the target cells, lead to the integration of different signals including the modulation of the cell-cycle, and together dictate the quality and intensity of the effector NK cell response (Baychelier and Vieillard, 2013). The relative contribution of each of the activating receptors to NK cytotoxicity against target cells differs, indicating the existence of an array of specific ligands that will be presented and their role in DENV infection further developed by Beltrán and Lopez Verges, under the research topic 'Protective Immune Response to Dengue Virus Infection and Vaccines: perspectives from the field to the bench'. In this mini-review we focused on what is currently known about the mounting of the NK cell response with its role in cytotoxicity and immunoregulation during DENV infection as well as the mechanisms acquired by the virus to evade NK-cell killing.

### **ACTIVATION OF NK CELLS AFTER DENV INFECTION**

Very early after infection, interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) is the mainstay of host defenses. This type I IFN, is a crucial mediator of the antiviral response directly inhibiting viral replication and modulating downstream immune responses to counteract viral spread (Samuel, 2001). Elevated IFN- $\alpha$  plasmatic levels are observed shortly after onset of symptoms in children and adult DENV-infected patients (Kurane et al., 1993; Becquart et al., 2010). Recently, Gandini et al. (2013) have shown that DENV-2 efficiently activated IFN- $\alpha$  production by plasmacytoid dendritic cells (pDCs), which produced up to 1,000-fold more IFN- $\alpha$  than other cell types in response to virus exposure. The infected pDCs could then decrease DENV infection of monocytes. The importance of the IFN- $\alpha$  response is also illustrated by the increased lethality of IFN- $\alpha/\beta$  receptor knockout mice when administered DENV-2 by intraperitoneal injection (Johnson and Roehrig, 1999). Although it was shown that the *in vitro* pretreatment of cultured

cells with IFN- $\alpha/\beta$  dramatically reduces DENV replication, type I IFN has little effect on DENV replication after viral replication has been established (Jones et al., 2005). Indeed, DENV can reach high titers ( $<10^9$  infectious doses per ml) in humans despite the induction of high levels of circulating IFN- $\alpha$  (Kurane et al., 1993; Sudiro et al., 2001). Therefore it seems likely that DENV has evolved mechanisms to counteract the IFN response, a characteristic that is shared by many pathogenic viruses (Munoz-Jordan et al., 2003).

It has long been established that one of the main mechanisms accounting for the efficacy of the type I IFNs is their ability to activate NK functions (**Figure 1**); thus, they promote the accumulation and/or survival of proliferating NK cells by the STAT1-dependent induction of IL-15 secretion (Hervas-Stubbs et al., 2011). This early activity of NK cells may be important for clearing primary DENV infection. In a sensitive mouse model, acute infection with DENV showed a rapid increase of NK cell levels (Shresta et al., 2004). A significant increase in the frequency of NK cell circulation was also shown in patients who developed an acute DF (Azeredo et al., 2006). In addition, patients with a mild DF have elevated NK cell rates when compared to those with severe DF (Green et al., 1999). Interestingly however, levels of circulating MIP-1 $\beta$  are higher in mild acute DF and are associated with higher NK cell frequencies (Bozza et al., 2008). To characterize the primary NK response to DENV infection in mice, the phenotype of NK cells in the spleen was assessed by flow cytometric analysis. Three days after infection, the DENV-infected mice had twice as many NK cells than the mock-infected mice, and more than 50% of these NK cells expressed the early activation marker CD69, although only 5–10% of NK cells in the mock-infected animals expressed CD69 (Shresta et al., 2004). Concomitantly, NK cells from DENV-infected patients display simultaneously high levels of CD69, HLA-DR and CD38 (Green et al., 1999; Azeredo et al., 2006). For example, a significant increase in the percentage of CD69<sup>+</sup>-expressing NK cells was observed in DENV-infected patients at the early and acute phase of infection (days 1–5 with 29% vs 13%), maintained at days 6–10 (24 vs 18%), but decreased after 11 days (13% vs 5%) (Azeredo et al., 2006). Altogether, these observations support the concept that DENV infection induces the selection and proliferation of a subset of activated NK cells further reinforcing their potentially important role during the early stages of the disease.

## **NK CELL FUNCTION IN THE PROTECTION AGAINST DENV**

### **CYTOKINES PRODUCED BY ACTIVATED NK CELLS**

Upon activation, NK cells may produce cytokines that favor the complete *elimination* of the disease and the *infectious agent* during the adaptive response, such as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , G-CSF, and GM-CSF, as well as chemokines, such as MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  and Rantes (Rathakrishnan et al., 2012) (**Figure 1**). Numerous investigations have shown that DENV-infected patients presented significantly elevated levels of IFN- $\gamma$ , G-CSF and GM-CSF (Green et al., 1999;

Avilo-Aguero et al., 2004; Becquart et al., 2010), whereas other reports suggest that TNF- $\alpha$  elevation could be associated with disease severity (Azeredo et al., 2001; Restepo et al., 2008). However, the results were obtained by measuring cytokine levels in sera collected from DENV-infected patients, and do not reveal which specific cells are activated and involved in their production. To date, the role played by NK cells in the production of these soluble factors is unknown. Deeper investigations will be necessary to precisely determine the implication of the immune-regulation by NK cells during the acute DENV infection.

#### NK CELL AND THEIR RECEPTORS DURING DENV INFECTION

One of the most prominent functions of NK cells is the capacity to lyse virus-infected cells. When the balance of inhibitory/activating signals is in favor of activation, the engagement of activating receptors on the surface of NK cells leads to directed exocytosis of granules containing perforin and granzymes, which in turn elicit the disruption of the target cell membrane and/or the activation of apoptosis pathways within the infected cell (Jost and Altfeld, 2013). It has been shown that activated NK cells are cytotoxic against DENV-infected cells (Kurane et al., 1984). Furthermore, a marker of cytotoxicity, the granule cytotoxic T cell intracellular antigen TIA-1, as well as two adhesion molecules, CD44 and CD11a, both involved in NK cell migration to various tissues and NK cytotoxicity, have been found to be significantly elevated on NK cells collected from acutely infected patients (Azeredo et al., 2006).

Hershkovitz et al. (2009) have demonstrated the existence of a direct protein-protein interaction between recombinant DENV soluble envelope E protein and NKp44 (but not NKp30 or NKp46) that could be involved in the triggering of cytolysis (**Figure 1**). Using West Nile virus (WNV) like particles (VLPs) and WNV-infected cells, they have shown that E-NKp44 interaction triggers the secretion of cytotoxic granules contained in NK cells, the lysis of target cells and the increased production of IFN- $\gamma$  suggesting that flavivirus E proteins activate NK cytotoxic activity through NKp44 engagement.

Overall our understanding of the mechanisms involved in the cytolysis of target DENV-infected cells by NK cells is in its infancy. The receptors and signaling pathways essential to this major function are yet to be clearly identified. Recent investigations focusing on the various target ligands involved in the cytotoxic response by Beltrán and Lopez-Verges, under the Research topic 'Protective Immune Response to Dengue Virus Infection and Vaccines: perspectives from the field to the bench' may bring some insight as to these questions

#### ACTIVATION OF NK CELLS BY ADCC RESPONSES DURING EARLY DENV INFECTION

Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) is another known mechanism by which NK cells recognize and lyse antibody-coated target cells, through the engagement of antibody binding to the Fc gamma receptor IIIA (CD16) (Campbell and Hasagawa, 2013). In an *in vitro* model, Kurane et al (1984) reported that human blood NK cells are cytotoxic against DENV-infected cells via direct cytolysis but also via ADCC (**Figure 1**). Indeed, PBMC collected from a DENV-infected patient successfully lysed DENV-infected cells that did not express MHC class-I molecules, and lysis of infected cells was significantly increased upon addition of anti-DENV1 and DENV2 monoclonal antibodies. The addition of sera from an individual without DENV antibodies did not lead to an increase in lysis of infected cells. More recently, Garcia et al. (2006) tested acute and convalescent patients' sera for ADCC activity, differentiating mild and severe forms of DF. ADCC activity was observed with acute sera only in cases of DHF/DSS but not DF. However using convalescent sera collected one year later, all samples induced ADCC activity. This suggests that the development of ADCC activity during the acute phase of the infection could be associated to the pathological manifestations of the severe syndrome and that the systematic development of ADCC activity after a primary infection, in convalescent patients could be associated with the development of severe forms during a subsequent heterologous DENV infection. However, other studies suggest a protective role for ADCC against DENV secondary infections. Indeed higher ADCC activities have been associated with higher plasma neutralizing antibody levels and lower viral loads during secondary infection but solely if the patient was secondarily infected by DENV3 and not DENV2 (Laoprasopwattana et al., 2007).

Altogether, this data support a strong implication of ADCC after DENV infection, however careful investigations are needed to determine its exact contribution both in the viral clearance during the initial acute phase of this infection and DENV pathogenesis in secondary infections.

### **DENV EVASION OF NK CELLS**

Co-existence of viruses and their infected hosts imposes an evolutionary pressure on both the virus and the host's immune system. The host has developed an immune system able to attack viruses and virally infected cells, and viruses have developed an array of immune evasion mechanisms to escape being killed by the host's immune system (Orange et al., 2002; Alcami, 2010). A wide variety of viruses have developed mechanisms to evade the NK cell response, and among these the flaviviruses are known to have developed particularly evolved mechanisms to escape NK cell mediated lysis. Many viruses evade T-cells recognition by down-regulating MHC class-I restricted antigen presentation, whereas flaviviruses induce their cell surface expression. This leaves infected cells less susceptible to NK lysing, MHC class I molecules being able to effectively engage NK cell inhibitory receptors (Yossef et al., 2012;

Jost and Altfeld, 2013; Ye et al., 2013). Regarding DENV infection, a number of studies have demonstrated that DENV replicon expression is sufficient to enhance membrane expression of MHC class-I inducing a reduced susceptibility to NK lysis (Yossef et al., 2012; Hershkovitz et al., 2008). The way by which DENV induces MHC class-I up-regulation on the surface of infected cells has been associated with an activation of NF- $\kappa$ B, independently of IFN and without an increased synthesis of MHC class-I molecules (King and Kesson, 2003). The exact mechanism(s) and especially the viral components involved are still obscure yet several hypotheses were proposed. The upregulation of MHC class I expression could be the result of: (i) an increase in the supply of peptides to the endoplasmic reticulum mediated by the transporter associated with antigen processing (TAP) (Momburg et al., 2001) (ii) the expression of DENV non-structural protein(s) and/or viral RNA replication (Hershkovitz et al., 2008) and (iii) the accumulation of uncleaved C-prM protein during viral assembly (Lobigs and Lee, 2004).

The major biological consequence of DENV-induced MHC class-I increase is a profound reduction of NK cell lysis as shown in *in vitro* cytotoxicity assays (Hershkovitz et al., 2008; Kurane et al., 1984). Moreover, an aggregation of MHC class-I molecules at the surface of infected cells seems to lead to increased affinity with NK-cell inhibitory receptors (Hershkovitz et al., 2008). Given that the kinetics of DENV viremia coincide with the peak of NK cell response, the modulation of MHC class-I expression may have physiological relevance in counteracting host NK cell defense. It is likely that there is a complex balance between DENV-induced activation of NK cells and subversion of NK killing by DENV-induced MHC class-I expression on infected cells. An additional component to take into account is the genetic background of the host since KIRs/HLA molecules combinations play a crucial role in the strength of NK cell inhibitory function (Ahlenstiel et al., 2008), and this could clearly play important role on DENV infection susceptibility, protection and severity. These viral escape mechanisms certainly reflect evolutionary pressure exerted by the host immune response on the pathogen but also highlight the importance of NK cells in the defense against DENV infection.

## CONCLUSION

Overall, several lines of evidence converge to suggest that NK cells are activated early during an acute DENV infection, and produce major cytokines, such as IFN- $\gamma$ , which participate in the control of the viral replication while promoting the development of an efficient adaptive immune response. In the future it will be interesting to determine if and how DENV leaves an imprint on the NK receptor repertoire possibly favoring cells with a strong cytolytic potential, as previously shown, by us and other groups, with several other viruses, including Chikungunya virus, which is yet another arbovirus (Petitdemange et al., 2011). Numerous

studies have also shown that DENV increases MHC class-I and adhesion molecule expression, allowing the virus to escape NK-cell lysis. Whilst underlining the importance of NK cells in DENV infection, these observations must be interpreted with great caution. Due to the lack of extensive phenotypic and functional studies in DENV-infected patients, we cannot conclude in favor of a beneficial or a deleterious role of the NK cells in the control and/or the evolution of the disease. Future studies based on the depletion of NK cells in a relevant animal model for DENV infection, will be able to unravel this fascinating topic.



## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the Université Pierre et Marie Curie (Paris-6), France.

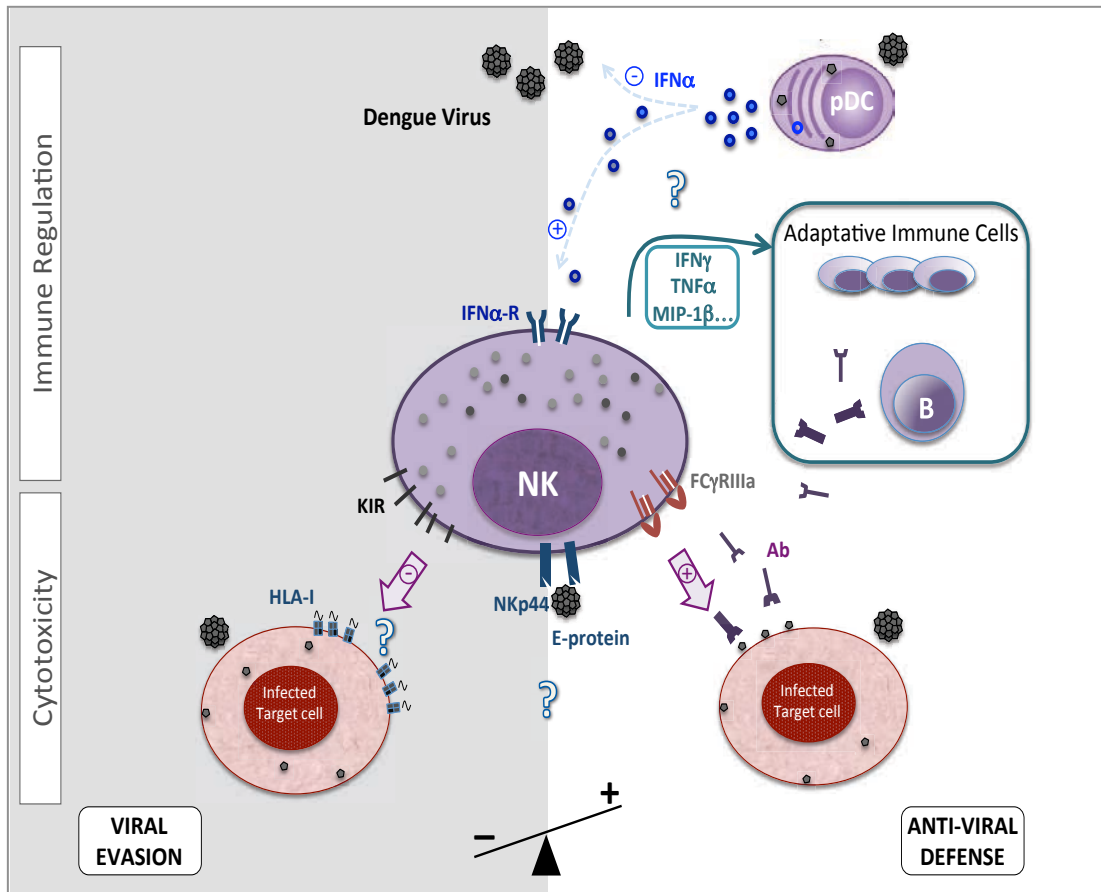
## REFERENCES

- Ahlenstiel G, Martin MP, Gao X, Carrington M, Rehermann B. [Distinct KIR/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses.](#) *J Clin Invest* (2008) 118:1017-26. doi: 10.1172/JCI32400.
- Alcami A. [The interaction of viruses with host immune defenses.](#) *Curr Opin Microbiol* (2010) 13:501-2. doi: 10.1016/j.mib.2010.07.001.
- Avila-Aguero ML, Avila-Aguero CR, Um SL, Soriano-Fallas A, Cañas-Coto A, Yan SB. [Systemic host inflammatory and coagulation response in the Dengue virus primo-infection.](#) *Cytokine* (2004) 27:173-9.
- Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves-Souza PC, [Nogueira RM, Miagostovich MP, Kubelka CF. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever.](#) *Immunobiology* (2001) 204:494-507.
- Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. [NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease.](#) *Clin Exp Immunol* (2006) 143:345-56.
- Barnes [WJ, Rosen L.](#) Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. *Am J Trop Med Hyg* (1974) 23:495-506.
- Baychelier F, Vieillard V. [The modulation of the cell-cycle: A sentinel to alert the NK Cells of dangers.](#) *Front Immunol* (2013) 4:325. eCollection 2013
- Becquart P, Wauquier N, Nkoghe D, Ndjoyi-Mbiguino A, Padilla C, Souris M, Leroy EM. [Acute dengue virus 2 infection in Gabonese patients is associated with an early innate immune response, including strong interferon alpha production.](#) *BMC Infect Dis* (2010) 10:356. doi: 10.1186/1471-2334-10-356.
- Beltrame LM, Sell AM, Moliterno RA, Clementino SL, Cardozo DM, Dalalio MM, Fonzar UJ, Visentainer JE. Influence of KIR genes and their HLA ligands in susceptibility to dengue in a population from southern Brazil. *Tissue Antigens* (2013) 82:397-404. doi: 10.1111/tan.12256.
- Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, Bozza PT, Kubelka CF. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis* (2008) 8:86. doi: 10.1186/1471-2334-8-86.
- Campbell KS, Hasegawa J. [Natural killer cell biology: an update and future directions.](#) *J Allergy Clin Immunol* (2013) 132:536-44. doi: 10.1016/j.jaci.2013.07.006.

- Gandini M, Gras C, Azeredo EL, Pinto LM, Smith N, Despres P, da Cunha RV, de Souza LJ, Kubelka CF, Herbeuval JP. Dengue virus activates membrane TRAIL relocalization and IFN-alpha production by human plasmacytoid dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS Negl Trop Dis* (2013) 7:e2257. doi: 10.1371/journal.pntd.0002257.
- García G, Arango M, Pérez AB, Fonte L, Sierra B, Rodríguez-Roche R, [Aguirre E](#), [Fiterre I](#), [Guzmán MG](#). [Antibodies from patients with dengue viral infection mediate cellular cytotoxicity](#). *J Clin Virol* (2006) 37:53-7.
- Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Nisalak A, [Kurane I](#), [Rothman AL](#), [Ennis FA](#). [Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever](#). *J Infect Dis* (1999) 180:1429-35.
- Halstead SB, Simasthien P. [Observations related to the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. II. Antigenic and biologic properties of dengue viruses and their association with disease response in the host](#). *Yale J Biol Med* (1970) 42:276-92.
- Halstead SB. [Dengue](#). *Lancet* (2007) 370:1644-52. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.06.079.
- Hershkovitz O, Zilka A, Bar-Ilan A, Abutbul S, Davidson A, Mazzon M, [Kümmerer BM](#), [Monsoengo A](#), [Jacobs M](#), [Porgador A](#). [Dengue virus replicon expressing the nonstructural proteins suffices to enhance membrane expression of HLA class I and inhibit lysis by human NK cells](#). *J Virol* (2008) 82:7666-76. doi: 10.1128/JVI.02274-07.
- Hershkovitz O, [Rosental B](#), [Rosenberg LA](#), [Navarro-Sanchez ME](#), [Jivov S](#), [Zilka A](#), [Gershoni-Yahalom O](#), [Brient-Litzler E](#), [Bedouelle H](#), [Ho JW](#), [Campbell KS](#), [Rager-Zisman B](#), [Despres P](#), [Porgador A](#). NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells. *J Immunol* (2009) 183:2610-21. doi: 10.4049/jimmunol.0802806.
- Hervas-Stubbs S, Perez-Gracia JL, Rouzaut A, Sanmamed MF, Le Bon A, Melero I. [Direct effects of type I interferons on cells of the immune system](#). *Clin Cancer Res* (2011) 17:2619-27. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1114.
- Johnson AJ, Roehrig JT. New mouse model for dengue virus vaccine testing. *J Virol* (1999) 73:783-6.
- Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Schlaak J, Ball S, [Foster GR](#), [Jacobs M](#). [Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression](#). *J Virol* (2005) 79:5414-20.
- Jost S, Altfeld M. [Control of human viral infections by natural killer cells](#). *Annu Rev Immunol* (2013) 31:163-94. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100001.
- King NJ, Kesson AM. [Interaction of flaviviruses with cells of the vertebrate host and decoy of the immune response](#). *Immunol Cell Biol* (2003) 81:207-16.

- Koch J, Steinle A, Watzl C, Mandelboim O. [Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection.](#) *Trends Immunol* (2013) 34:182-91. doi: 10.1016/j.it.2013.01.003.
- Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. [The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease.](#) *Semin Immunol* (2008) 20:343-52. doi: 10.1016/j.smim.2008.06.003.
- Kurane I, [Hebblewaite D](#), [Brandt WE](#), [Ennis FA](#). Lysis of dengue virus-infected cells by natural cell-mediated cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Virol* (1984) 52:223-30.
- Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Ennis FA. [High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection.](#) *Am J Trop Med Hyg* (1993) 48:222-9.
- Lanier LL. [Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition.](#) *Nat Immunol* (2008) 9:495-502. doi: 10.1038/ni1581.
- Laoprasopwattana K, Libraty DH, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Ennis FA, Rothman AL, Green S. [Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by plasma obtained before secondary dengue virus infections: potential involvement in early control of viral replication.](#) *J Infect Dis* (2007) 195:1108-16.
- Lobigs M, Lee E. [Inefficient signalase cleavage promotes efficient nucleocapsid incorporation into budding flavivirus membranes.](#) *J Virol* (2004) 78:178-86.
- Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. [Dengue virus pathogenesis: an integrated view.](#) *Clin Microbiol Rev* (2009) 22:564-81. doi: 10.1128/CMR.00035-09.
- Momburg F, Müllbacher A, Lobigs M. [Modulation of transporter associated with antigen processing \(TAP\)-mediated peptide import into the endoplasmic reticulum by flavivirus infection.](#) *J Virol* (2001) 75:5663-71.
- Muñoz-Jordan JL, Sánchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, García-Sastre A. [Inhibition of interferon signaling by dengue virus.](#) *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 100:14333-8.
- Orange JS, Fassett MS, Koopman LA, Boyson JE, Strominger JL. [Viral evasion of natural killer cells.](#) *Nat Immunol* (2002) 3:1006-12.
- Orange JS. [Natural killer cell deficiency.](#) *J Allergy Clin Immunol* (2013) 132:515-25. doi: 10.1016/j.jaci.2013.07.020.
- Petitdemange C, Becquart P, Wauquier N, Béziat V, Debré P, Leroy EM, [Vieillard V](#). [Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity.](#) *PLoS Pathog* (2011) 79:e1002268. doi: 10.1371/journal.ppat.1002268.
- Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan AM, Ponnampalavanar S, Lum LC, [Manikam R](#), [Sekaran SD](#). Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. *PLoS One* (2012) 7:e52215. doi: 10.1371/journal.pone.0052215.

- Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. [Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor](#). *Annu Rev Immunol* (2013) 31:413-41. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095951.
- Restrepo BN, Ramirez RE, Arboleda M, Alvarez G, Ospina M, Diaz FJ. [Serum levels of cytokines in two ethnic groups with dengue virus infection](#). *Am J Trop Med Hyg* (2008) 79:673-7.
- Sam SS, Omar SF, Teoh BT, Abd-Jamil J, AbuBakar S. [Review of Dengue hemorrhagic fever fatal cases seen among adults: a retrospective study](#). *PLoS Negl Trop Dis* (2013) 7:e2194. doi: 10.1371/journal.pntd.0002194.
- Samuel CE. [Antiviral actions of interferons](#). *Clin Microbiol Rev* (2001) 14:778-809.
- Schmidt AC. [Response to dengue fever--the good, the bad, and the ugly?](#) *N Engl J Med* (2010) 363:484-7. doi: 10.1056/NEJMcibr1005904.
- Shresta S, Kyle JL, Robert Beatty P, Harris E. [Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice](#). *Virology* (2004) 319:262-73.
- Sudiro TM, Zivny J, Ishiko H, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, [Nisalak A](#), [Norman JE](#), [Ennis FA](#), [Rothman AL](#). Analysis of plasma viral RNA levels during acute dengue virus infection using quantitative competitor reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol* (2001) 63:29-34.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* (2008) 9:503-10. doi: 10.1038/ni1582.
- Wichmann O, Hongsiriwon S, Bowonwatanuwong C, Chotivanich K, Sukthana Y, Pukrittayakamee S. [Risk factors and clinical features associated with severe dengue infection in adults and children during the 2001 epidemic in Chonburi, Thailand](#). *Trop Med Int Health* (2004) 9:1022-9.
- Ye J, Zhu B, Fu ZF, Chen H, Cao S. [Immune evasion strategies of flaviviruses](#). *Vaccine* 2013 31:461-71. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.11.015.
- Yossef R, Rosental B, Appel MY, Hershkovitz O, Porgador A. [Upregulation of MHC class I expression following dengue virus infection: the mechanism at the promoter level](#). *Expert Rev Anti Infect Ther* (2012) 10:285-7. doi: 10.1586/eri.12.7.



**Figure 1.** Overview of the suggested NK-cell features after acute and primary DENV infection.