



**HAL**  
open science

# Caractérisation de l'implication de l'hélicase DHX9 (RHA) dans le cycle de multiplication du virus Chikungunya

Roy Matkovic

► **To cite this version:**

Roy Matkovic. Caractérisation de l'implication de l'hélicase DHX9 (RHA) dans le cycle de multiplication du virus Chikungunya. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONTT007 . tel-02986807

**HAL Id: tel-02986807**

**<https://theses.hal.science/tel-02986807>**

Submitted on 3 Nov 2020

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

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

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
**Docteur**

Délivré par l'**Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale **CBS2**  
Et de l'unité de recherche **CPBS FRE3689 CNRS**

Spécialité : **Virologie**

Présentée par **Roy MATKOVIC**

**Caractérisation de l'implication de  
l'hélicase DHX9 (RHA) dans le cycle de  
multiplication du virus Chikungunya**

Soutenue le **20 septembre 2016** devant le jury composé de

Monsieur Bruno COUTARD, IR,  
FMB UMR7257, Marseille

Rapporteur

Monsieur Pierre ROQUES, DR,  
IMETI-CEA UMR1184, Fontenay sur Roses

Rapporteur

Monsieur Thierry DUPRESSOIR, PrU,  
EPHE-DGIMI- UMR1333, Montpellier

Examineur

Madame Laurence BRIANT, DR2,  
CPBS FRE3689 CNRS, Montpellier

Directrice de Thèse





# Remerciements

Mes premiers remerciements iront à Dr. Bruno Coutard et Dr. Pierre Roques qui ont très gentiment accepté de me faire l'honneur de juger ces travaux en tant que rapporteurs de cette thèse et pour leurs apports très éclairés et enrichissants dans la rédaction de ce manuscrit. Merci au Professeur Thierry Dupressoir de m'avoir suivi au cours de ces trois années, pour ses sages conseils et de mettre un point final à tout ce travail en tenant le rôle de président du Jury et d'examineur.

Merci beaucoup à ma directrice de thèse, Laurence Briant, qui m'a offert une place de thésard dans son équipe de recherche. Merci de m'avoir fait confiance dans mes travaux en me laissant une liberté de conduire mon projet de recherche et en le recadrant quand il le fallait.

Merci beaucoup à la direction du CPBS : Stephan Köhler pour sa bonne humeur et à Jean-Michel Mesnard, d'abord pour son écoute, ses conseils avisés, et son soutien, et ensuite pour nos discussions sportives !

Je ne remercierai jamais assez Eric Bernard (« Tonton ») ; Patrick Eldin (« Papy » / « Georges ») ; Simon Fontanel (« l'ingénieur ») ; Aymeric Neyret (« Sergent »), qui ont fait la science tous les jours dans le module de l'équipe au cours de ma thèse, pour leur bonne humeur, les fous rires, tous les moments passés en amis au sein et hors du laboratoire, les « piscines », les « coursettes »... vivre la Science dans cette ambiance a été très motivant, même dans les moments difficiles. A ce boys band, j'ajoute Laurent Chaloin (« chouchou ») qui est toujours là pour rajouter de très bonnes notes humoristiques, Charlotte Grimmaud (« Tata ») pour m'avoir partagé son expérience, ses conseils, Sébastien Lainé (« Canadien » ; « mon kanak ») pour toutes les « déconnades »... Merci à Jérôme Viard (« Jéjé » ou « mon deuxième moi », « mon champion ») pour ces moments de « rigolades », et à Mickaël Blaise (« Maïkeul-keul ») aussi là pour rire pendant les déjeuners et les weekends au laboratoire. Merci à Fabien Blanchet (« père spirituel »), Matteo Bonazzi, Franck Cantet (« Candéloro ») pour tous les moments amicaux, sorties cinématographiques, activités sportives de Laser Game, Patinoire (dont je me rapellerai toujours) merci aux très adorables Martine Biard, Lucile Espert, Charlotte André (« Carlotta »). Vous allez tous beaucoup me manquer...

Merci à Nathalie Chazal pour m'avoir partagé ses connaissances en virologie depuis le Master 1. C'était mes cours préférés à l'époque, rendus clairs et passionnants par LA grande spécialiste du domaine. Merci Nath' d'avoir pris

beaucoup de ton temps, et même perso pour les relectures et les corrections constructives de ce manuscrit !

Jean-Marie Péloponèse, Corinne Lionne, Virginie Georget, Sylvain de Rossi, Frédéric Lionneton et Bruno Beaumelle, Fabien Blanchet et Matteo Bonazzi (encore) pour leurs conseils avisés sur mes questions scientifiques et pour m'avoir fourni différents outils techniques qui ont grandement contribué à l'avancement de mes recherches.

Pascale, « ma reine », la « colonne vertébrale » du CPBS qui nous aide tous dans l'institut. Une femme aux grandes qualités humaines toujours là pour me conseiller, pour me donner ses bras quand ça ne va pas, et m'orienter dans des moments pas très faciles.

Merci beaucoup à Olivier Moncorgé et Caroline Goujon, pour leur grande gentillesse, leur altruisme, leur aide précieuse, et leurs sourires au quotidien.

Arrivent maintenant « mes frères de lutte » comme on dit dans le Pacifique : Charlotte Mariani-Floderer (« Chama » /« cousine »), Eric Martinez, Sophie Sagnier, Simon Lachambre, Adeline Kerviel, Célia Chamontin, Lucie Pessel Vivares, Marie Terol (ma camarade de rédaction, de « craquage »), Christophe Chopard, Maria Alessandra Damiano, Rahila Rahimova, Nadia Leban, pour tout ce qu'on a vécu ensemble, pour les rigolades, les évasions sportives ou touristiques, et surtout pour avoir toujours été là en toutes circonstances.

Merci à toute l'équipe de gestion du CPBS pour leur grande aide : Pierre Diamante (« la torpille »), Christaïne, Sandraïne, Meurtaïne, et enfin à tous les membres du CPBS que je n'ai pas cités.

Hvala mojim jugoslovenskim drugovima Katarina Bacevic, Marko Ristic, Nikola Arsic, Matija Brozovic, et mes amis de l'IGMM avec qui j'ai passé de très bons moments sportifs et culinaires : Chloé Maurizy, Ildem Sanli, Madhi Laaref.

Au cours de ma thèse j'ai rencontré une petite famille, avec qui j'ai passé de très beaux moments festifs, et familiaux, presque comme chez moi, au coin d'une vraie cheminée ou dans un jardin printanier plein de pollens, ou en croisière sur la Saône et le Rhône : Merci Martine Deleage, Jérôme Efe Kaplan, et Merci Elise d'avoir illuminé une partie de cette thèse...

Merci à mon entraîneur Julien Bongibault, à Jérôme Boudet, Alexandre Unkovic pour nos supers moments en tant que représentants de la France aux jeux européens, à Aurélie Villette et à l'handballeur Vincent Thouvenot pour leur grande gentillesse, leur amitié chère, nos soirées Sushis, Pizza, Foot, et leur chat Coco. Merci à tous les nageurs et au Staff que je ne peux citer et que j'ai

côtoyés au cours de mes entrainements au 3MUC (Montpellier Méditerranée Métropole UC Natation), ou en compétitions. Pratiquer la natation avec eux été une manière de me déconnecter, de me détendre avant ou après le travail.

Mes amis de longue date : Merci à Antoine Barbieri (« Toinou ») et Ambre Picca (« papuche »), vous êtes les meilleurs tout simplement. Je vous aime fort. Julie Razungles et Kevin Marcachi, Geoffrey Segura, Marion Pierrejean et Renaud, Clément Garrigos, Laurent Cabanié et sa Laurène, pardon de ne pas avoir été très présent au cours d'évènements précieux, soirées de « l'amicale montpelliéraine », et merci beaucoup pour votre compréhension.

Merci au Dr. Salomé Paillas qui m'avait dit alors que j'étais stagiaire en M2 « Tu feras une très bonne thèse et tu seras un grand chercheur ». Un message que j'ai retenu et qui m'a toujours boosté. Merci pour ta sagesse et ton grand cœur.

Merci à mes amis calédoniens que je n'ai pas beaucoup vus au cours de mes études doctorales mais qui ont toujours été près du cœur : Alizée Couraud (« mon Alizée »), Karine Laurent (« ma Karine »), le futur médecin Thomas Crassous (« mon frerot »).

A ma famille :

Parce que tu es la femme la plus importante de ma vie, aux plus belles qualités humaines, parce que tu as toujours tout fait pour tes enfants au prix de gros sacrifices, parce que tu fais en sorte que le bonheur de ton entourage est une priorité, cette thèse, tout ce travail, t'est dédié maman.

Je remercie mon frère Jefferson Gandelin-Paris et ma sœur Ophélie Matkovic pour tout leur soutien, pour tout... je ne vous l'ai jamais dit... je vous aime.

Merci à mon beau-père Eric Jeambon, pour tout ce qu'il a fait aussi, son humour, sa gentillesse, son aide, ses conseils...tout ce qu'un père fait tout naturellement !

Merci à Antoine Gandelin-Paris (« Tonton Tony »), Anabelle Almeida (« TatAnabelle »), Patricia Gandelin-Paris (« Tata Patou »), Marie-José Gandelin-Paris (« Tata Marie-Jo »), Cindy Gabel (« Couz »), Karine Matkovic, Maureen et Douglas, Bernadette Matkovic pour les moments qu'on a passés ensemble en France depuis mon retour.

Merci à mes grand-parents Claudine Gandelin, Philippe Gandelin, pour leur soutien au cours de mes études à 18000kms d'ici.

Many thanks also go to Australia: thanks dad, Laurent Matkovic, Sonia Matkovic (« Step-mother ») and to the kid brothers Kyle Matkovic, Cy

Matkovic, Anastasia Ellie Matkovic for their support, encouraging messages, calls during my studies and some time spent together, here, in Europe.

Ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans le support financier et de mes interlocuteurs au Gouvernement de la Nouvelle-Calédonie, et sans le soutien de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie.

*L'imagination est plus importante que la connaissance. La connaissance est limitée alors que l'imagination englobe le monde entier, stimule le progrès, suscite l'évolution.*

**Albert Einstein**

## Abréviations

6K: protéine de 6 Kda	HSP70: «Heat Shock Protein 70»
ATRS : séquence riche en A/T	HSV-1: Virus de l'herpès simplex 1
AUD: « Alphavirus Unique Domain »	HTLV-1: Virus T-lymphotropique humain 1
BRCA1: «Breast Cancer 1»	HuR : Human antigen R
CHIKV: Virus Chikungunya	HVR: « Hyper Variable Region »
CPE : Effets cytopathiques	IFIT1: « Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1»
CR : Complexe de réplication	IFN $\alpha$ : Interféron de type $\alpha$
CRM1: «Exportine- Chromosomal Region Maintenance 1 »	IFNAR : Récepteur à l'interféron
CSE: «Conserved sequence element »	IPS-1: « IFN $\beta$ promoter stimulator 1 »
CTE: «Constitutive transport element »	IRES: « Internal Ribosome Entry Site »
DDX $n$ : « DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide $n$	IRF $x$ : «Interferon Regulatory Factor»
DHX9: « DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 9»	ITS: « Internal Transcribed Spacers »
E1: Glycoprotéine d'enveloppe 1	LTR: « Long Terminal Repeat »
EEEV: Virus de l'encéphalite équine de l'Est	mTOR: « mammalian Target Of Rapamycin »
EGFR: «Epidermal Growth Factor Receptor»	MyD88: « Myeloid differentiation primary response gene 88 »
EIF $x$ : «Eukaryotic translation initiation Factor»	NES: Signal d'export nucléaire
EEF $x$ : «Eucaryotic translation elongation factor»	NF- $\kappa$ B: «Nuclear factor- $\kappa$ B»
ER $\alpha$ : «Estrogen receptor alpha»	NLRP3: « NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 »
ETS: «External Transcribed Spacers»	NLS: Signal de localisation nucléaire
FASN : «Fatty acid synthase»	NPC: Complexe du pore nucléaire
HCV: Virus de l'hépatite C	NTC: « NineTeen Complex »
hnRNP: « heterogeneous nuclear RiboNucleoProteins»	nsP1: protéine non-structurale 1
	nsP2: protéine non-structurale 2
	nsP3: protéine non-structurale 3

nsP4: protéine non-structurale 4

nsPs: protéines non-structurales

NTP: Nucléoside triphosphate

NTPase: Nucléoside Triphosphatase

PABP: « Poly(A)-binding protein »

PAMP: « Pathogen-associated molecular pattern »

PCE: « Post-transcription control element»

PERK: « PKR-like ER resident Kinase »

pE2 : Précurseur de la protéine d'enveloppe 2

PIC : Complexe de pré-initiation de la traduction

Poly(dA :dT) : Acide poly(deoxyadénylique-deoxythymidylique)

Poly(A:U): Acide polyadénylique–polyuridylique

Poly(I:C): Acide polyinosinique-polycytidylique

PRRSV: Virus du syndrome respiratoire et reproductif porcin

RLR: « RIG-like receptor »

RIG-1: « Retinoic acid inducible gene I »

RPL: Protéine de la grande sous-unité ribosomale

RPS: Protéine de la petite sous-unité ribosomale

RRV : Virus Ross River

SFV: Virus Semliki Forest

SINV: Virus Sindbis

snRNA: « Small nuclear RNA »

shRNA: « Short hairpin RNA »

STAT: « Signal transducer and activator of transcription »

TAP: « Tip-associated protein »

TAR: « Transactivating response element »

TBK1: «TANK-binding kinase 1»

TF: Protéine TransFrame

TNF $\alpha$ : « Tumor Necrosis Factor alpha »

TPR: « Translocated promoter region protein »

UBF: « Upstream Binding Factor »

UTR: Région non traduite

VEEV: Virus de l'encéphalite équine vénézuélienne

HIV : Virus d'immunodéficience humaine

WEEV: Virus de l'encéphalite équine de l'Ouest

XIAP: Inhibiteur d'apoptose lié au chromosome

# SOMMAIRE

<b>CHAPITRE I-INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>I. LES ARBOVIRUS.....</b>	<b>2</b>
A. Définition.....	2
B. Cycles épidémiques et vecteurs d'Arbovirus.....	2
<b>II. LES ALPHAVIRUS.....</b>	<b>8</b>
A. Historique.....	8
B. Les Alphavirus de l'ancien et du nouveau monde.....	9
1) Une organisation commune.....	9
2) Une évolution différente.....	10
<b>III. LE VIRUS DU CHIKUNGUNYA.....</b>	<b>13</b>
A. Distribution des vecteurs.....	13
B. Epidémiologie et maladie du Chikungunya.....	15
1) Epidémiologie.....	15
a) Tropisme cellulaire et pathologie.....	17
1. Le tropisme cellulaire du virus Chikungunya.....	17
2. Les pathologies et l'immunité de l'infection au CHIKV.....	17
C. La biologie du CHIKV.....	19
1) L'organisation du virus du Chikungunya.....	19
a) Son génome.....	19
1. Les régions non-codantes.....	20
i. Les CSEs.....	20
ii. Les structures de la partie 5'UTR.....	22
iii. Les structures de la partie 3'UTR.....	23
2. Les cadres de lecture.....	24
b) Les protéines non-structurales et leurs partenaires cellulaires.....	25
1. nsP1.....	25
2. nsP2.....	27
3. nsP3.....	29
4. nsP4.....	31
c) Les protéines structurales et leurs partenaires cellulaires.....	33
1. La protéine de capsid.....	33
2. Les glycoprotéines d'enveloppe.....	35
3. La protéine 6k.....	36
4. La protéine « TransFrame » (TF).....	36
2) Le cycle de multiplication du virus Chikungunya.....	37
a) L'entrée du CHIKV dans sa cellule cible.....	37
b) La traduction des protéines non-structurales virales.....	38
c) La réplication du CHIKV.....	41
d) La traduction des protéines structurales.....	43
e) L'assemblage et bourgeonnement de virions CHIK.....	44
f) Les réponses cellulaires à la réplication et les effets cytopathiques.....	45
1. Les réponses cellulaires liées à la réplication.....	45
2. Les effets cytopathiques liés à l'infection.....	47
D. Réplication virale et formation des complexes de réplication.....	49
1) Utilisation des membranes cellulaires pour la formation des complexes de réplication.....	49
a) Localisation intra-cytoplasmique des complexes de réplication.....	49
1. Diversité de localisation des complexes de réplication intra-cytoplasmiques.....	49
b) Agencement des courbures de membranes.....	52
1. Courbure membranaire et lipides.....	52
2. La formation de la sphérule répliquative du CHIKV et l'organisation des protéines non-structurales.....	53
2) Protéines cellulaires relocalisées dans les compartiments de répliquations du CHIKV.....	55

<b>IV.</b>	<b>LES HELICASES A DOMAINE DEXD/H, DES COFACTEURS CELLULAIRES REGULANT LES CYCLES REPLICATIFS VIRAUX. ....</b>	<b>56</b>
A.	<i>Structure des hélicases à domaine DEXD/H.....</i>	57
B.	<i>Fonction des hélicases DEXD/H dans les cellules eucaryotes .....</i>	59
1)	Transcription de gènes .....	60
2)	Epissage d'ARN pré-messagers.....	62
3)	Biogenèse des ribosomes .....	63
4)	Les DEXD/H et la traduction protéique.....	65
1.	Rôle dans l'assemblage de ribosomes.....	65
2.	Rôle dans le dépliement des structures secondaires de l'ARNm .....	66
5)	Rôle dans le transport d'ARNs .....	68
6)	Rôle dans les défenses innées .....	69
C.	<i>Les hélicases à domaine DEXD/H à l'interface de la réplication virale.....</i>	71
1)	Des facteurs antiviraux .....	71
a)	Implication dans la reconnaissance de PAMPs.....	72
b)	Implication dans la formation de granules de stress .....	74
2)	Des cofacteurs pro-viraux .....	77
a)	Le transport des ARNs viraux.....	77
b)	Implication dans la transcription et réplication de génomes viraux .....	78
c)	Implication dans la traduction de protéines virales.....	81
d)	Implication dans l'encapsidation du génome viral et dans l'infectiosité des particules produites.....	82
	<b>CHAPITRE II-PROJET DE RECHERCHE ET RESULTATS.....</b>	<b>83</b>
<b>I.</b>	<b>OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE.....</b>	<b>84</b>
<b>II.</b>	<b>ETUDE FONCTIONNELLE DU COMPLEXE DE REPLICATION DU CHIKV .</b>	<b>85</b>
A.	<i>Implication de protéines à domaine DEXD/H dans le cycle de réplication du virus Chikungunya : DHX9 une protéine à deux visages.....</i>	85
1)	DHX9 est relocalisée au complexe de réplication du CHIKV .....	85
2)	NsP3 interagit avec le domaine HelicC de DHX9 .....	88
3)	DHX9 est impliquée dans la traduction de l'ARN génomique en protéines non- structurales.....	93
4)	DHX9 empêche la réplication du génome de CHIKV .....	96
5)	Certaines hélicases dont DHX9 sont dégradées au cours de la réplication du CHIKV.....	98
6)	DHX9 ne conduit pas à la mise en place d'un état antiviral au cours de l'infection par CHIKV .....	102
B.	<i>CHIKV, granules de stress et traduction des nsPs.....</i>	103
<b>III.</b>	<b>ETUDE STRUCTURALE DU COMPLEXE DE REPLICATION DU CHIKV ...</b>	<b>109</b>
	<b>CHAPITRE III-DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>113</b>
<b>I.</b>	<b>ETUDE FONCTIONNELLE DU COMPLEXE DE REPLICATION DU CHIKV : DHX9 ET TRADUCTION DES NSPs.....</b>	<b>114</b>
A.	<i>La liaison de DHX9 sur nsP3.....</i>	114
B.	<i>Le CHIKV détourne les granules de stress à son profit .....</i>	116
<b>II.</b>	<b>CARACTERISATION STRUCTURALE DU COMPLEXE DE REPLICATION ..</b>	<b>123</b>
	<b>CHAPITRE IV-MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>126</b>
	<b>CHAPITRE V-CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>137</b>
	<b>CHAPITRE VI-BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>139</b>



# **Chapitre I- Introduction**

# I. Les Arbovirus

## A. Définition

Si le monde des virus est vaste, leur mode de transmission est également diversifié. Beaucoup d'entre eux sont transmis par contact direct des muqueuses infectées (ex : HIV) où le virion libre passe, par exemple, d'un épithélium d'un hôte à l'épithélium de son nouvel hôte ; par inhalation au niveau des voies respiratoires de gouttelettes transportant du virus (ex : Virus Influenza) ; par ingestion d'aliment et d'eau (ex : Virus de l'Hépatite E), ou bien via des vecteurs zoonotiques. Dans ce dernier cas, sont retrouvés les Arbovirus. Ce terme provient de la contraction de « Arthropod-borne virus ». Il existe plus de 500 Arbovirus à répartition mondiale, 1/10<sup>ème</sup> d'entre eux sont pathogènes pour l'Homme. A l'exception de la famille des *Asfarviridae* dans laquelle on retrouve le virus de la fièvre porcine africaine, la plupart des virus transmis par des arthropodes possède un génome ARN (Figure 1).

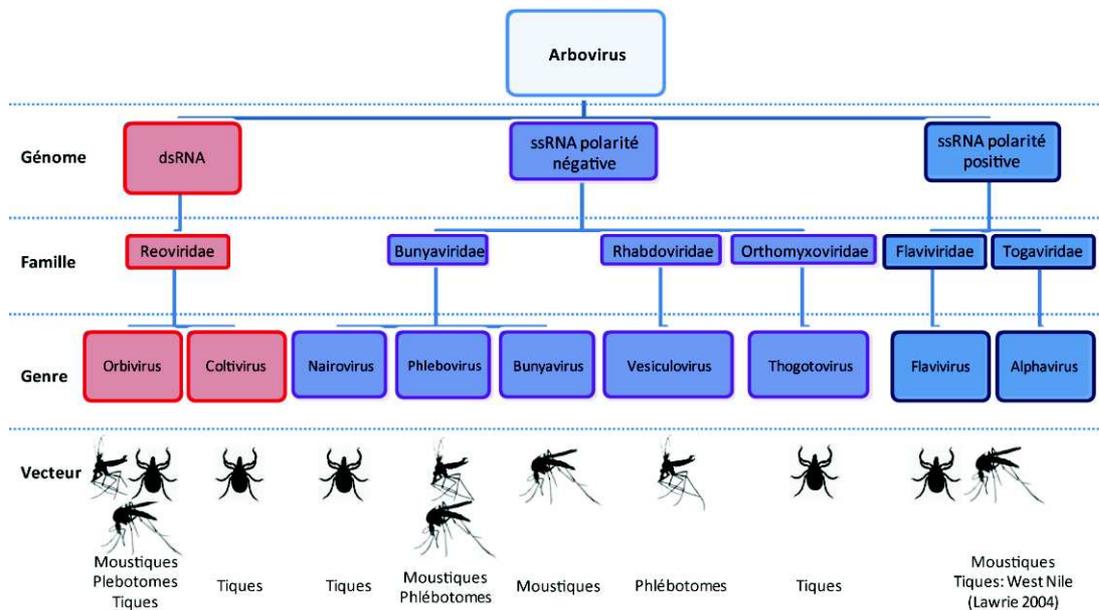


Figure 1: Classification d'Arbovirus et de leurs vecteurs

## B. Cycles épidémiques et vecteurs d'Arbovirus

La plupart des vecteurs d'Arbovirus appartiennent à deux classes d'invertébrés : les arachnides et les insectes (Figure 2). Le grand point commun aux vecteurs de ces deux classes est leur mode d'alimentation. En effet, les vecteurs d'Arbovirus sont des arthropodes à pièces buccales de type « piqueur-suceur » afin de pouvoir accéder à la nourriture liquide de la plante ou de l'animal parasité. Les Arbovirus doivent pénétrer la barrière épithéliale de la peau d'un hôte afin de pouvoir infecter des cellules cibles et se multiplier, ainsi, l'infection doit s'effectuer par ces vecteurs capables de transpercer cet obstacle. Si l'infection des hôtes se fait par ce moyen, c'est aussi par cette voie que le vecteur récupère les particules virales de l'hôte réservoir.

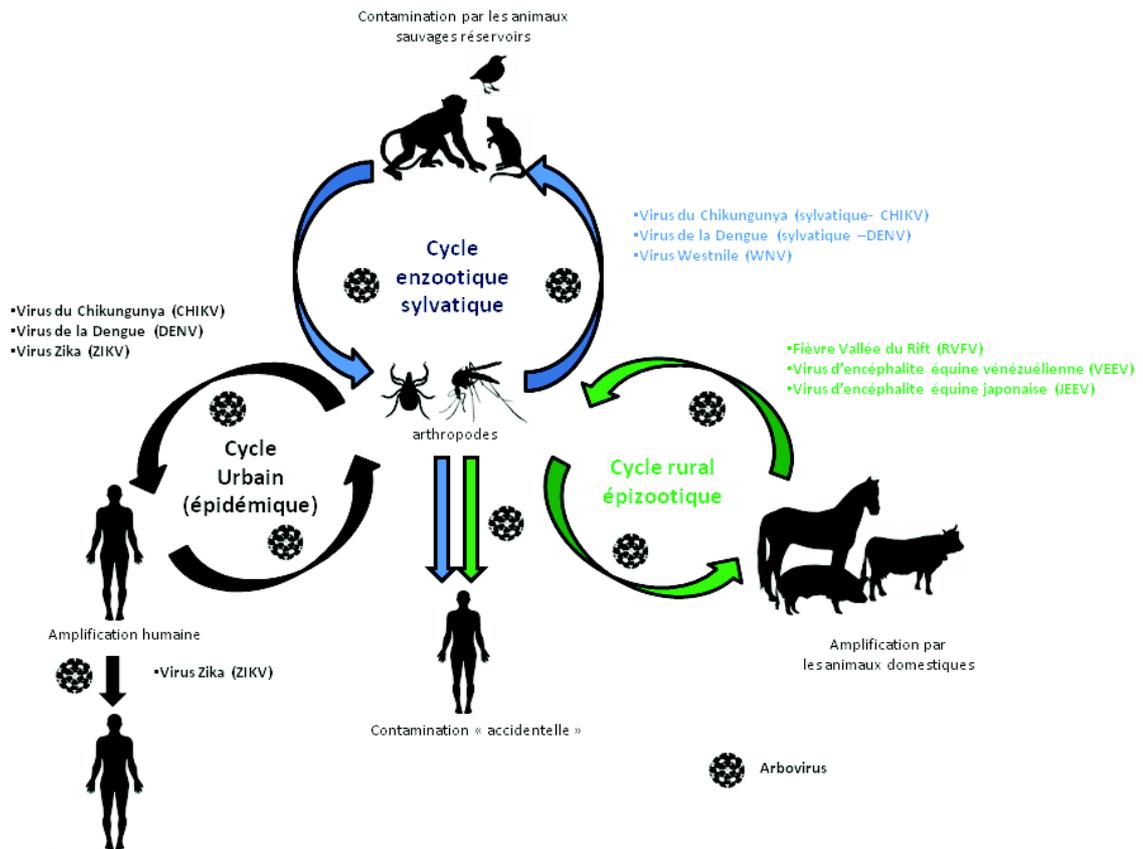
Classe	Ordre	Famille	Genre	Arbovirus vectorisé
Arachnides	Ixodida (Tiques)	Ixodidae		Nairovirus (Fièvre hémorragique Congo-Criméenne) Thogotovirus Bunyaviridae
		Argasidae		Bunyaviridae (Phlebovirus: RVFV); Rhabdoviridae (Vesiculovirus: VSV)
Insectes	Diptères	Psychodidae (phlébotomes)		Bunyaviridae (Phlebovirus: RVFV); Rhabdoviridae (Vesiculovirus: VSV)
		Culicidae (Moustiques)	Anophèles	Virus O'nyong nyong Virus Orungo Virus West Nile (WNV) Virus de l'encéphalite Japonaise (JEEV) Virus de l'encéphalite équine de l'ouest (WEEV) Virus de l'encéphalite équine de l'est (EEEV) Virus de l'encéphalite vénézuélienne (VEEV) Virus Ross River (RRV) Virus Sindbis (SINV)
			Culex	Virus de l'encéphalite vénézuélienne (VEEV) Virus Ross River (RRV) Virus Sindbis (SINV)
			Mansonia	Virus de l'encéphalite vénézuélienne (VEEV) Virus Mayaro
			Aedes	Virus du Chikungunya (CHIKV) Virus de la forêt Semliki (SFV) Virus de la Dengue (DENV) Virus Zika (ZIKV) Virus de la fièvre Jaune (YFV) Virus Ross River (RRV) Virus Orungo Virus de l'encéphalite équine de l'est (EEEV)

Figure 2: Classifications des vecteurs d'Arbovirus

Concernant les vecteurs des Arbovirus, il apparaît que les *Culicidae* ou moustiques, regroupant entre autres les genres *Culex* et *Aedes* semblent majoritairement les vecteurs pour les Arbovirus à ARN simple brin de polarité positive (*Flavivirus* et *Alphavirus*) que d'autres virus. Ces deux derniers genres regroupent respectivement au moins 68 et 27 espèces virales (Schmaljohn et McClain 1996) alors que les *Reoviridae*, transmis par les phlébotomes, tiques et parfois moustiques, ne comptent que 4 Arbovirus pathogènes à l'Homme (Kapikian et Shope 1996) les *thogotovirus* transmis par les tiques comprennent aujourd'hui 4 espèces virales. Ainsi, les Arbovirus utilisant préférentiellement les moustiques, arthropodes capables de se mouvoir sur de plus grandes distances que les rampants, augmentant ainsi les chances de transmission virale, sont plus diversifiés. Les cycles de transmission de ces virus peuvent mettre en jeu différents animaux réservoirs tels des rongeurs, des oiseaux, des primates, les arthropodes étant les acteurs de la circulation du pathogène au sein d'un écosystème. En fonction des espèces animales réservoirs présentes dans un environnement de propagation virale lors de repas sanguins de l'arthropode, ou de la migration d'espèces hôtes dans des régions géographiques où des vecteurs compétents sont établis, plusieurs types de cycles peuvent être définis : un cycle urbain, un cycle rural et un cycle enzootique (Figure 3).

**Le cycle enzootique** de contamination par un Arbovirus prend généralement pour place une forêt, où l'écosystème animalier est riche, on le qualifie ainsi de cycle sylatique. La reproduction des moustiques et tiques nécessitant une humidité élevée, pour éviter la dessiccation des larves, l'émergence d'un Arbovirus débute souvent dans des forêts tropicales. Ce sont dans ces milieux que les virus peuvent être isolés notamment chez des mammifères (rongeurs, primates) mais aussi chez des oiseaux. Ces animaux servent de réservoirs et ne présentent aucun signe de maladies. L'absence de maladie, chez ces animaux réservoirs, souligne une co-évolution du virus avec ces espèces animales où un porteur sain a été naturellement sélectionné par sa résistance. L'animal ayant développé une virémie suite à l'infection par un Arbovirus peut ensuite être la proie d'arthropodes de types moustique ou tique. Ces invertébrés hématophages de type piqueur-suceurs récupèrent, dans leur repas sanguin, des virus qui circulent ensuite chez le vecteur de l'intestin moyen aux glandes salivaires où ils se multiplieront. Ainsi, dans les cellules des glandes salivaires de

l'arthropode, de nouveaux virions sont libérés dans la salive de l'invertébré qui contaminera un nouvel hôte réservoir au cours d'un autre repas sanguin. C'est un cycle fermé très localisé pouvant être modifié par un phénomène anthropologique. En effet, la déforestation et l'implantation de fermes aux abords des systèmes forestiers vierges apportent de nouveaux protagonistes et ont conduit à l'apparition d'un nouveau type de cycle.



**Figure 3: Cycles de transmission des Arbovirus.** Les arthropodes sont infectés par un Arbovirus suite à l'ingestion d'un repas sanguin contaminé d'un hôte réservoir. Plusieurs cycles de transmission peuvent être mis en place en fonction de la localisation et des hôtes présents dans le cycle.

Dans le **cycle rural**, les animaux domestiqués par l'Homme peuvent également être la proie des hématophages infectés précédemment dans un cycle sylvatique. Si une arbovirose touche un animal ou un groupe d'animaux domestiques dans une région donnée, le cycle de transmission portera alors le nom de « cycle épizootique ». L'animal domestique n'étant pas un réservoir adapté, mais un simple moyen d'amplification virale, des symptômes peuvent-être observés. Parmi ces virus à cycle épizootique, figure le Virus d'encéphalite équin vénézuélien (van den Bergh et al. 2015). En 1938, des chercheurs américains ont isolé du cerveau de chevaux morts d'encéphalite au Venezuela un virus capable de réinfecter des cochons d'inde, des souris et de provoquer une paralysie de ces animaux en 48h, puis dans les 3 à 5 jours d'induire la mort de l'ensemble des animaux. Dans ce cas, les cerveaux des cochons d'inde présentaient des titres élevés de VEEV (Beck et Wyckoff 1938). Cet *Alphavirus* provoque une inflammation importante du cerveau de ces animaux domestiques, due à une multiplication très active du virus dans le système nerveux central. Il est possible

parfois que les virus présents dans les cycles sylvatiques et épizootiques puissent infecter l'Homme lorsque celui-ci s'aventure dans une forêt ou dans une zone géographique rurale où circule l'Arbovirus. En 1954, le VEEV a été incriminé dans le décès d'un colombien (Sanmartin-Barberi et al. 1954) et c'est en 1967, qu'il a été isolé pour la première fois chez l'Homme atteint d'encéphalite mortelle au nord du Vénézuéla (Rossi 1967). L'Homme peut alors également servir d'hôte au même titre que les animaux qu'il domestique, dans lequel le virus est capable de se multiplier. Cette contamination « accidentelle » peut être à l'origine d'apparition d'épidémies.

Grâce aux technologies modernes, il est de plus en plus facile à l'Homme de se déplacer ou d'échanger des matières premières ou produits transformés en très peu de temps et sur de longues distances. Dans ce cas, les vecteurs d'Arbovirus peuvent profiter de ces transports pour migrer d'une région à l'autre, et s'implanter de manière durable dans une nouvelle niche. Au fil du temps, l'Homme s'est installé et a développé des villes sur tous les espaces possibles du moment où il y trouve une ressource obligatoire à proximité : l'eau. Cette eau est aussi indispensable au vecteur pour sa reproduction, ainsi, les hématophages sont très bien adaptés à l'habitat de l'Homme, la ville. Chez les arthropodes infectés, l'Arbovirus n'induit pas de pathologie, et peut être porteur du virus dès son stade larvaire jusqu'à la mort de l'invertébré. Si un de ces arthropodes infectés s'installe dans une ville, alors un **cycle viral urbain « épidémique »** peut être mis en place. Toutes les épidémies majeures liées à ces Arbovirus (Virus Chikungunya depuis 2005-2006 ; Virus Zika depuis 2013) sont retrouvées dans ces contextes. Après importation du pathogène dans cet environnement favorable et infection d'un Homme, d'autres arthropodes compétents vont transporter le virus et infecter de nouveaux hôtes humains non immunisés qui développeront alors une virémie et une pathogenèse aigüe. Cependant, il est probable que l'arthropode lui-même ne soit pas toujours responsable de la vectorisation du pathogène. En effet, il a été montré que le virus Zika pouvait être présent dans le sperme et l'urine de patients infectés et qu'il existait une transmission sexuelle de ce virus (Foy et al. 2011, Musso et al. 2015). Ainsi, dans le cas du virus Zika, l'Homme, considéré au départ comme un hôte intermédiaire, est également devenu un vecteur du virus Zika. Cette particularité de la transmission du virus Zika soulève la question de l'impact de cette voie de transmission dans l'épidémie fulgurante de virus Zika en Amérique du Sud au cours des années 2015-2016. De la même manière, il n'est pas impossible que ce mode de transmission et en particulier, la transmission du père vers la mère enceinte, puisse être impliquée dans l'infection de femmes au cours de la grossesse et donc à l'incidence de microcéphalies des nouveaux nés, notamment au Brésil. En tout état de cause, les grandes épidémies d'Arbovirus du XXI<sup>ème</sup> siècle ont pour principal vecteur le moustique du genre *Aedes*, mais de nouvelles épidémies de zoonoses peuvent également émerger de part la capacité évolutive et d'adaptation rapide de la plupart des Arbovirus et de la très grande diversité des arthropodes pouvant servir de vecteur.

Un arthropode compétent dans la vectorisation d'un Arbovirus doit en premier lieu se nourrir de sang contaminé (Figure 4 - Page 7). Cela ne peut arriver que si l'animal réservoir présente une virémie au moment du repas sanguin de l'hématophage. Après ingestion de ce sang virémique, il a été montré que chez les moustiques *Aedes*, les titres en EEEV et WEEV chutait pendant les deux jours suivants et ré-augmentaient ensuite. Le plus haut titre ( $10^7$ /mL) pouvait être obtenu 4 à 6 jours après le repas sanguin et la transmission de l'EEEV était optimale 13 à 17 jours après le repas sanguin (Chamberlain et Sudia 1955). Ces études suggèrent que les Arbovirus récupérés par ces arthropodes vont se répliquer dans ses différents organes avant d'accéder au site responsable de la transmission à l'hôte. En effet, le sang virémique ingurgité circule dans l'appareil digestif de l'arthropode et arrive au niveau de l'intestin moyen, ou mésentéron, où le virus pénètre dans les cellules épithéliales et se

multiplie (Figure 4 - Page 7). La multiplication du virus dans ces cellules cibles est une étape obligatoire afin qu'il puisse accéder à d'autres compartiments. C'est dans ce compartiment que les premiers signes de réponses antivirales sont observés. En effet, si le virus EEEV est abondant dans le mésentéron du moustique 2-3 jours après infection, seulement quelques cellules contiennent du virus au 7<sup>ème</sup> jour post-repas sanguin contaminé, alors qu'une accumulation virale est remarquée à cette période dans les glandes salivaires (Scott et Weaver 1989). Il existe donc un système d'élimination du virus dans le tractus digestif chez le moustique. En effet, les Arbovirus à ARN sont capables d'induire des réponses innées dans les cellules du mésentéron selon plusieurs voies : la voie d'ARN interférence (Campbell et al. 2008) la voie IMD (De Gregorio et al. 2002), la voie JAK/STAT (Agaisse et Perrimon 2004), la voie ERK, grâce à certains facteurs sanguins comme l'insuline, activant la transcription de gènes antiviraux (Xu et al. 2013) et la voie des récepteurs Toll (Sanders et al. 2005). Le caractère antiviral de la voie d'ARN interférence a été premièrement décrite chez l'*Anophèles gambiae* (Keene et al. 2004) dans lequel le virus O'nyong nyong est multiplié efficacement lorsque les composants de la machinerie à interférence sont inhibés (Carissimo et al. 2015). De même, l'inhibition de la voie des IMD semble être propice à la multiplication du virus de la Dengue dans le mésentéron du moustique *Aedes aegypti*. (Sim et al. 2013). La voie JAK/STAT est également inhibitrice de la réplication du O'nyong nyong (Carissimo et al. 2015) et des *Flaviviridae* Dengue (Souza-Neto et al. 2009) et West Nile (Paradkar et al. 2012). En ce qui concerne les récepteurs Toll, aucun des *Alphavirus* n'est touché par l'activation de cette voie. Le virus Dengue quant à lui active la voie des Toll ce qui induit des titres viraux réduits dans le mésentéron du vecteur (Xi et al. 2008). Enfin, autre moyen de défense, l'apoptose de la cellule infectée. La mort cellulaire programmée d'une cellule mésentérique infectée par un Arbovirus limite la réplication des virus. Pour exemple, le virus Semliki Forest (Mims et al. 1966), le virus Sindbis (Bowers et al. 2003), le virus EEEV (Weaver et al. 1988), le virus WEEV (Weaver et al. 1992) et le virus West Nile (Girard et al. 2005) provoquent la mort des cellules épithéliales de l'intestin moyen des moustiques vecteurs. Lorsque le cycle viral a eu lieu dans ce tissu ou une pression de sélection est donc effectuée, les Arbovirus bourgeonnent à la membrane basale de ces cellules et franchissent l'hémocoèle contenant l'hémolymphe qui permettra la diffusion du virus aux autres organes et les glandes salivaires (Scott et Weaver 1989). Au niveau de ces glandes, le virus Chikungunya, par exemple, pénètre la lame basale qui entoure les acini où le virus va se multiplier (Figure 4). Les virions néo-formés vont être libérés dans les cavités apicales et baigneront dans la salive produite par les glandes du moustique (Vega-Rua et al. 2015). Au sein de cet organe, le virus Chikungunya se réplique de manière intense (Scott et Burrage 1984, Scott et Weaver 1989) sans provoquer d'effets cytopathiques durant les 6 premiers jours (Vega-Rua et al. 2015). Ainsi de grandes quantités de virions sont produites efficacement dans les acini. La salive joue un rôle central dans la prise en charge des virions dans les cavités apicales des acini puisqu'elle permet le transport des particules virales jusqu'à aux pièces buccales de l'insecte par lesquelles la transmission au futur hôte sera effectuée.

Elle est également acteur de la pathogenèse chez la proie du vecteur infecté. En effet, la salive contient des facteurs nécessaires à la colonisation de son nouvel hôte. En 2011, Styer et coll. démontrent que la salive de moustiques infectés du genre *Culex*, augmente la capacité du pouvoir infectieux du virus West Nile, en effet, une hausse de la virémie est observée chez la souris (Styer et al. 2011). Cette propriété est également observée pour le virus responsable de la fièvre de la vallée du Rift (Le Coupanec et al. 2013) et le virus de la Dengue (Conway et al. 2014) infectant les moustiques du genre *Aedes*. Lors de cette dernière étude des composés de la salive ont été identifiés. Il s'agit notamment de sérine-protéases qui, en dégradant la matrice extracellulaire, permettent au virus de la Dengue de se fixer sur les cellules cibles et ainsi d'augmenter le pouvoir de dissémination du virus. Dans des études antérieures, certains

composés salivaires ont été décrits comme étant des modulateurs d'effecteurs immunitaires chez la proie du vecteur arthropode. En effet, la salive de moustique est capable d'inhiber l'inflammation localement en empêchant la libération de TNF $\alpha$  par les mastocytes (Bissonnette et al. 1993), mais aussi de moduler l'activation des lymphocytes T et leurs productions de cytokines (Zeidner et al. 1999).

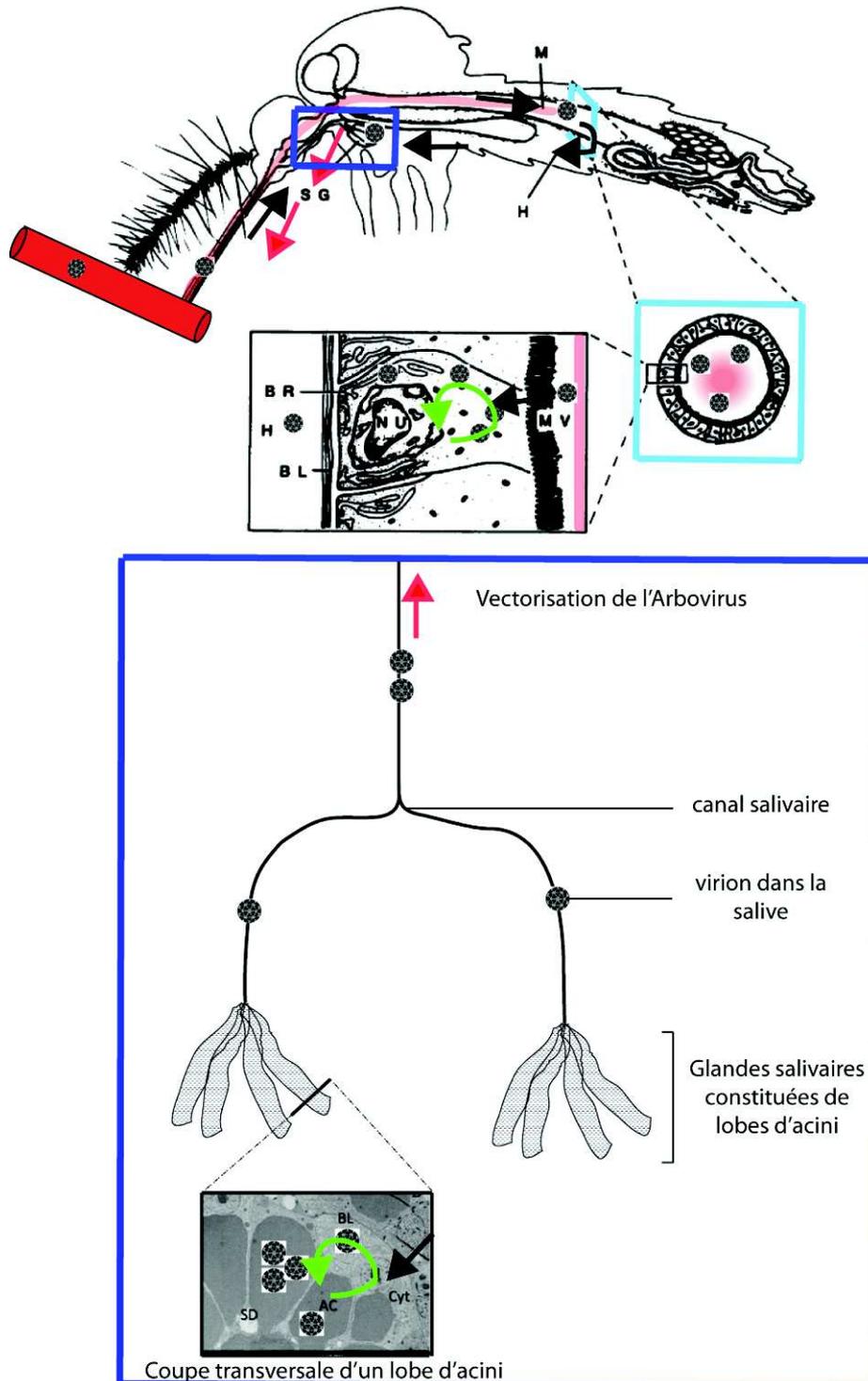


Figure 4: Schéma de l'anatomie interne d'un Moustique *Aedes*, et de ses glandes salivaires, infecté par le virus Chikungunya. Le virus infecte le moustique lors de la piqûre d'un animal virémique et pénètre dans les cellules du mésentéron où une première étape de réplication se met en place. Le pathogène libéré et circulant dans l'hémocoèle pénètre dans les acini des glandes salivaires par la lame basale. Après réplication et stockage dans les cavités apicales des acini, les virions néo-synthétisés sont transportés par la salive dans le canal salivaire et jusqu'à

l'appareil buccal du moustique. La flèche noire représente le transport du CHIKV au cours de l'infection du moustique. La flèche verte situe la réplication du CHIKV dans les cellules infectées. La flèche rouge représente le transport des virions néo-synthétisés vers les pièces buccales de l'arthropode et jusqu'au site d'infection d'un nouvel hôte. H = Hémo-coele. M = Mésentéron. MV = Microvillosités. BR = Labyrinthe basal. AC = Cavité apicale. Cyt = Cytoplasme. BL = Lame Basale. Nu = Noyau. SG = Glandes salivaires. SD = Conduit salivaire. Adapté de Vega-Rua et al., 2015

De la même manière, de très nombreuses études, ont également révélé l'importance de facteurs salivaires de la tique pour la transmission des Arbovirus. En effet, ces composants salivaires sont capables de moduler l'immunité des mammifères piqués en inhibant localement la synthèse d'interleukine 2 par les lymphocytes T (Ribeiro et al. 1985); (Ramachandra et Wikel 1992); (Ferreira et Silva 1998), l'activité des lymphocytes B (Wikel et al. 1994); (Fivaz 1989), des « natural killer » (Kubes et al. 1994), (Kopecky et Kuthejlva 1998), des macrophages (Ramachandra et Wikel 1992); (Ferreira et Silva 1998), et des neutrophiles (Ribeiro et al. 1990). En conséquence, les principaux vecteurs d'Arbovirus, tiques et moustiques, créent un environnement favorable à la multiplication du pathogène vectorisé et sont, de ce fait, directement impliqués dans le développement de la pathogenèse chez l'hôte mammifère. En raison de la plus grande capacité de déplacements des diptères, certains Arbovirus sont plus enclin à créer des épidémies que d'autres. En effet, les plus grandes arboviroses sont dues aux *Flaviviridae*: virus de la Dengue (Linares et al. 2013), virus Zika (plus de 1,3 millions de cas au Brésil entre 2015-2016 – données OMS, février 2016), ou au *Togaviridae*: virus Chikungunya (plus de 4 millions de cas depuis 2005-données OMS, avril 2016), tous étant transmis par piqûre de moustiques du genre *Aedes*. Au contraire, les arboviroses vectorisées par les tiques, ont une incidence plus modeste. A titre d'exemple, la fièvre du Congo-Crimée a infecté environ 5000 personnes dans le monde depuis 1967 (Mishra et al. 2011).

Aujourd'hui, parce qu'ils sont responsables de plusieurs vagues épidémiques majeures, les recherches visant à approfondir les connaissances sur les *Flavivirus* et les *Alphavirus* sont très développées. La prochaine partie du manuscrit sera consacrée à l'étude des *Alphavirus*, genre virus du Chikungunya.

## II. Les *Alphavirus*

### A. Historique

Les premières épidémies résultant de l'infection par des *Alphavirus* documentées datent de 1831. Dans le Massachusetts, durant l'été 1831, sur 100 chevaux présentant des signes de paralysie, de prostration, 75 d'entre eux succombèrent après un coma de 1 à 4 jours après l'apparition des premiers symptômes (Hanson 1957). L'autopsie de certains de ces chevaux morts sur trois contrées côtières de l'état, ont révélé une inflammation importante des méninges. A la fin du mois de septembre 1831, la pathologie avait disparue chez les chevaux. Un siècle plus tard, en 1931, Meyer, Haring et Howitt isolent le virus responsable d'encéphalites chez des chevaux en Californie, durant l'été 1930 (Meyer et al. 1931). Deux ans après avoir publié ces résultats, Ten Broeck, Merrill, Giltner et Shahan isolent également un virus responsable des mêmes symptômes chez les chevaux que la souche ouest américaine, mais dans les états est-américains du Maryland et ses voisins New Jersey, Virginie

(TenBroeck C 1933). Les sérums des animaux infectés par le virus de l'Est bien que responsable de la même maladie ne protégeaient pas des cochons d'inde infectés avec le virus de l'Ouest. Finalement, en 1938, les chercheurs Beck et Wickoff découvrent le Venezuelian Equine Encephalitis Virus (VEEV). Tous ces pathogènes responsables d'encéphalites ont été regroupés dans la famille des *Togaviridae* et dans le genre *Alphavirus*. Plus tard en 1944, Smithburn et Haddow isolent à partir de filtrat de moustiques *Aedes* capturés dans la forêt de Semliki dans l'Ouest de l'Ouganda, un virus très virulent et mortel chez les rongeurs et chez des singes lorsqu'il est inoculé dans leur cerveau. En revanche, ils constatent que lorsque l'inoculation est effectuée dans une autre partie du corps très peu de signes pathologiques sont observés et les animaux infectés développent une réponse anticorps efficace (Smithburn 1944). Ainsi, l'*Alphavirus* « Semliki Forest » est décrit comme étant un Arbovirus transmis par les moustiques, peu pathogène dans des conditions naturelles chez ses potentiels réservoirs, mais pouvant affecter dans certains cas précis le système nerveux causant un syndrome encéphalitique. Près de 20 ans après l'identification des premiers virus encéphalitiques équins, au cours d'une expédition dans le village de Sindbis à 30km au nord du Caire, Taylor et coll. capturent des moustiques du genre *Culex* durant l'été 1952. Ils isolent un virus « Coxsackie-like » provoquant le décès de jeunes souris infectées en laboratoire, mais pas des souris adultes (Taylor et al. 1955). Il s'agit d'un nouveau *Alphavirus*, nommé virus Sindbis. Ce dernier est alors incriminé dans des fièvres arthritiques. Durant cette même année, dans la province de Tanganyika, en Tanzanie, Marion Robinson observe au début de saison chaude et humide, en octobre, une épidémie proche du virus de la Dengue, en termes cliniques, alors que la présence du virus de la Dengue est extrêmement rare sur le continent Est-africain. La forte douleur ressentie aux articulations par les personnes infectées les force à se déplacer, quand ils le peuvent, de manière courbée. Cette maladie est appelée alors « Chikungunya » signifiant « qui se courbe » dans la langue locale du plateau de Makonde (Robinson 1955) et est causée par un nouvel *Alphavirus* à pathologies arthritiques : « Chikungunya Virus ».

Au sein du genre *Alphavirus*, il existe donc des espèces virales provoquant soit des pathologies de type encéphalitiques, soit arthritiques. Ces différences de symptômes sont liées à des divergences dans le genre *Alphavirus*. Ainsi deux groupes peuvent être définis : les virus de « l'ancien monde », dont le prototype est le SINV, responsables d'arthrites et d'éruptions cutanées et les virus du « nouveau monde », retrouvés en Amérique et responsables d'encéphalites : EEEV, VEEV (Causey et Maroja 1957).

## **B. Les *Alphavirus* de l'ancien et du nouveau monde**

### **1) Une organisation commune**

Tous les *Alphavirus* de l'ancien et nouveau monde sont organisés génétiquement et structurellement de la même manière. Ils possèdent un génome en ARNs<sup>b</sup>(+). Ce sont tous des virus enveloppés possédant une capsidie à symétrie icosaédrique. Les *Flaviviridae* ont également ces mêmes caractéristiques, ce qui les distingue des *Togaviridae*, genre *Alphavirus*, est en fait la plus grande taille du virion des *Togaviridae* (60 à 70nm pour 40-50nm pour les *Flaviviridae*) et l'organisation du génome : les *Togaviridae* ont les séquences de leurs protéines non-structurales en partie 5' de l'ARN génomique alors que celles des *Flaviviridae* sont en partie 3' (Figure 5). Enfin la taille du génome est également différente : environ 12 000 bases pour les *Alphavirus* alors que le génome des *Flaviviridae* est de 10 000 bases.

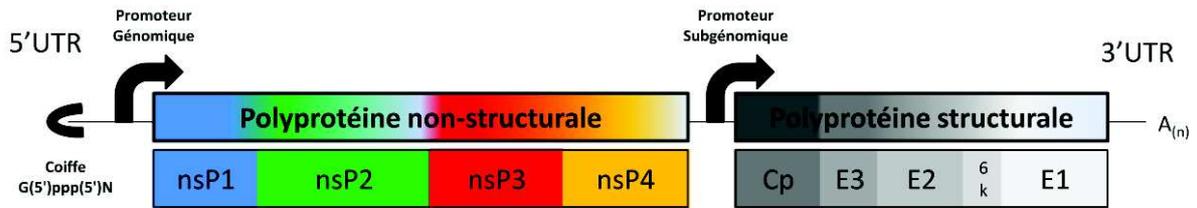


Figure 5: Organisation du génome des *Alphavirus*. L'ARN génomique contient deux cadres de lecture : le premier en 5' code pour une polyprotéine non-structurale impliquée dans la réplication du génome. Le deuxième cadre de lecture en 3' code pour une polyprotéine structurale.

## 2) Une évolution différente

Les *Alphavirus* regroupent environ 30 espèces virales distribuées en 7 séro-complexes au sein desquels des anticorps produits envers un virus d'un séro-complexe peuvent reconnaître d'autres virus de ce même groupe. L'établissement d'un arbre phylogénétique utilisant comme critère la séquence de la glycoprotéine d'enveloppe 1 (E1) peut également illustrer différents groupes divergents au sein du genre *Alphavirus* (Figure 6) (Powers et al. 2001).

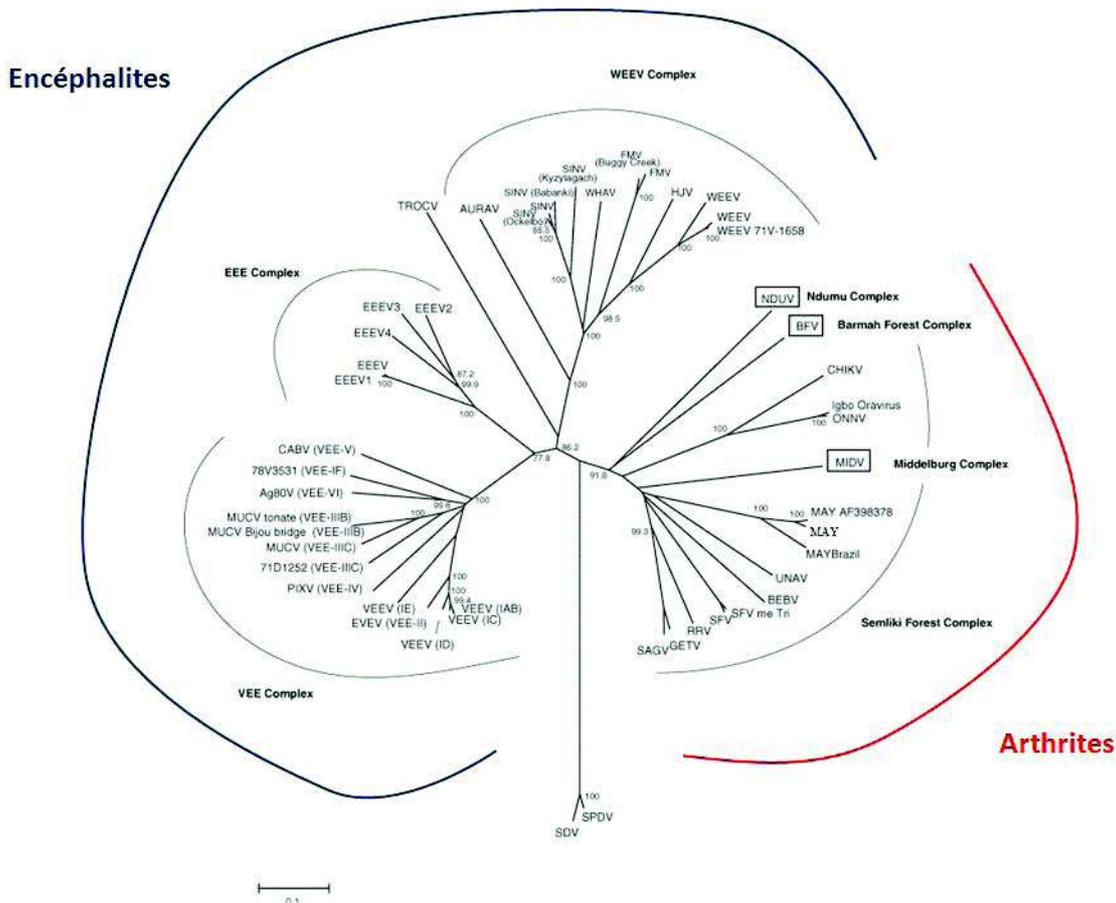


Figure 6: Arbre phylogénétique non raciné des *Alphavirus* et de la principale pathologie associée. L'arbre a été construit par comparaison des séquences nucléotidiques de la glycoprotéine d'enveloppe 1 des différents *Alphavirus*. Adapté de Lavergne et al, 2006

Si à ces séro-complexes, y sont associés les symptômes observés lors de la réplication du virus chez son hôte, à savoir « encéphalites » ou « arthrites », de fait les modifications de la glycoprotéine d'enveloppe peuvent également être reliées à l'un ou l'autre type de

symptôme. En effet, une divergence ancienne, liée à des mutations dans les glycoprotéines d'enveloppe aurait permis à une partie des virus d'acquérir un tropisme cérébral plus accru pouvant expliquer les pathologies encéphalitiques. Cependant, lorsque des mutations interviennent dans d'autres séquences codantes, comme celles des protéines non-structurales et en particulier dans celle de nsP3, cela peut conduire à une modification de la virulence de la souche conduisant par exemple à une neurovirulence accrue et des encéphalites chez la souris (Tuittila et al. 2000). Des modifications génétiques des glycoprotéines d'enveloppe confèrent donc un tropisme différent chez les *Alphavirus* et des variations de séquences codantes pour les nsPs et de la capsid modifient leur cytotoxicité et leur virulence. En effet, lors de l'infection virale, l'arrêt de la transcription des gènes cellulaires est contrôlé par la protéine non-structurale 2 (nsP2) pour les virus de « l'ancien monde » (Garmashova et al. 2006) alors que pour les virus du « nouveau monde », cet effet dépendrait de la protéine de capsid (Garmashova et al. 2007). De la même manière, les virus de « l'ancien monde » et du « nouveau monde » activent des voies de signalisation différentes au cours de l'infection et de la réplication virale. En effet Voss et coll. ont démontré que l'inhibition de la voie des MAP kinases via ERK1/2 diminue la réplication de VEEV (Voss et al. 2014) tandis que la réplication du CHIKV ne semble pas touchée par l'inhibition de cette voie (Scholte, Thèse, 2015). Outre des divergences dans la séquence nucléotidique codante des *Alphavirus*, les séquences non codantes du génome diffèrent aussi grandement entre les espèces et surtout entre ces virus de l'ancien et nouveau monde. Mis à part, l'Aura virus (un « Sindbis-like virus » du nouveau monde) et le virus de l'encéphalite équine de l'ouest (WEE, dont le génome est dérivé du virus de l'encéphalite équine de l'Est alors que les deux glycoprotéines virales et une partie de 3'UTR sont dérivés d'un virus « Sindbis-like » anciennement présent aux Amériques), tous les virus du nouveau monde ont des extrémités non-traduites plus courtes que les virus de l'ancien monde (Rumenapf et al. 1995)(Figure 7). Ainsi les virus de l'ancien monde pourraient avoir profité de plus grandes séquences non-codantes, régulatrices, pour leur conférer un plus grand tropisme et de meilleures capacités réplcatives dans des diverses cellules hôtes infectées en recrutant des protéines, et machineries de la cellule infectée (Hyde et al. 2015). Si des différences majeures sont notables entre les *Alphavirus* de l'ancien et du nouveau monde, même au sein même des espèces virales, des évolutions rapides s'effectuent au fil de réplcations chez un vertébré hôte, au cours de propagations virales durant une épidémie ou entre différents cycles zoonotiques. Si nous reprenons l'exemple des séquences non-codantes, une espèce virale peut contenir des extrémités régulatrices plus ou moins longues modulant la réplication et virulence de la souche mutante dans un hôte infecté (George et Raju 2000, Hyde et al. 2015).

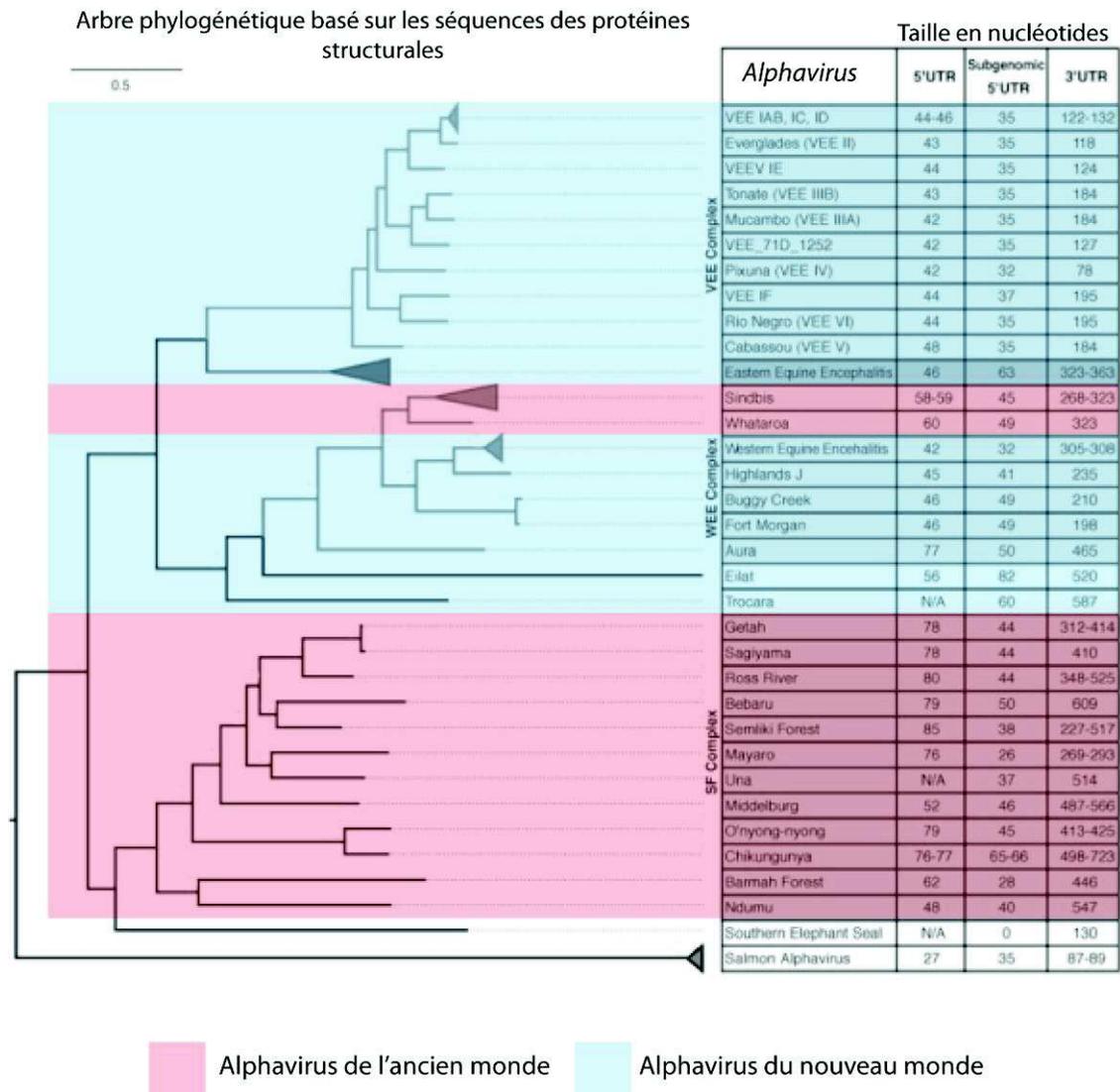
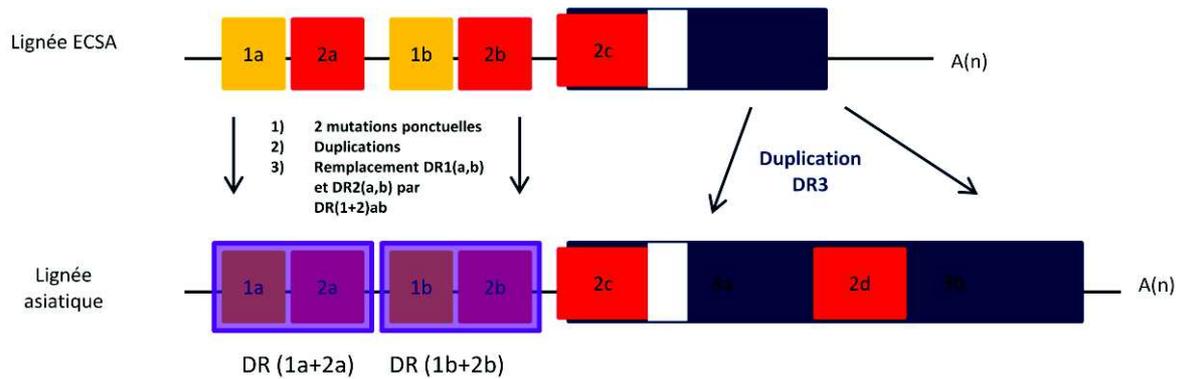


Figure 7: Evolution des *Alphavirus* et taille de leurs régions non traduites. Adapté de Hyde et al, 2015

Cette évolution d'espèces virales peut être illustrée avec le virus du Chikungunya qui peut appartenir à trois lignées (Volk et al. 2010):

- La lignée Est-Centre-Sud africaine (ECSA) à laquelle appartient le groupe monophylétique IOL (Indian Ocean Lineage)
- La lignée d'Afrique de l'Ouest qui a divergé d'un virus ancêtre commun avec la lignée ECSA dans les 500 dernières années (Volk et al. 2010)
- La lignée asiatique

La lignée asiatique a divergé de la lignée ECSA, il y a environ 100 ans en raison de profondes modifications par délétions puis insertions, et duplications de séquences au 3'UTR (Figure 8).



**Figure 8: Modification évolutive de la partie 3'UTR de la lignée asiatique du CHIKV à partir de la lignée ECSA. D'après Chen et al, 2013**

Cette modification du génome du virus a eu pour conséquence une réduction de sa capacité à se multiplier dans le vecteur moustique et chez l'hôte mammifère (Chen et al. 2013). D'autres modifications génétiques, dont notamment une mutation dans la glycoprotéine d'enveloppe E1 de la lignée ECSA conférant au virus une adaptation à *Ae. albopictus*, ont permis à la forme mutante ECSA nommée « IOL » pour « Indian Ocean Lineage », de supplanter les lignées asiatiques endémiques aux longues séquences 3'UTR, entre 2005 et 2008 en Asie du Sud-Est (Tsetsarkin et al. 2011). Ces données démontrent la complexité des liens entre les diverses modifications génétiques que subit une lignée/souche du virus Chikungunya, par exemple, l'adaptation moléculaire à l'arthropode vecteur, à l'hôte, et l'épidémiologie du virus. Les recherches menées sur le CHIKV conduisent à élucider les mécanismes moléculaires de réplication employés par ces pathogènes. Elles permettent en de trouver des cibles pharmacologiques inhibant la multiplication de ces pathogènes, capables d'entraîner de grandes épidémies à conséquences sanitaires, économiques lourdes notamment en ce qui concerne le virus du Chikungunya : 266 000 cas et 43,9 millions d'euros de coûts à l'île de la Réunion au cours de l'épidémie 2005-2006 (Renault et al. 2007, Soumahoro et al. 2011). En effet, depuis la ré-émergence du virus au Kenya, puis son apparition sur l'île de la Réunion en 2005-2006, l'intérêt porté sur ce virus ré-émergent a explosé

### III. Le virus du Chikungunya

#### A. Distribution des vecteurs

Les arthropodes vecteurs du virus du Chikungunya sont des moustiques de genre *Aedes*. Parmi eux, deux espèces ont un rôle majeur dans la vectorisation de ce virus : L'*Aedes aegypti* et l'*Aedes albopictus*.

Le vecteur historique, l'*Aedes aegypti*, est originaire d'Afrique. Cette espèce prolifère dans les forêts tropicales humides et dans des gîtes aquifères fabriqués par l'Homme dans les milieux ruraux, urbains (Morrow et al. 1957). La domestication de ces moustiques a grandement favorisé son expansion géographique à partir des régions tropicales africaines, le moustique s'est implanté dans les régions nord africaines il y a plus de 6000 ans avant l'assèchement de la partie nord-africaine qui deviendra le Sahara (Kropelin et al. 2008). Le manque d'eau a conduit les Hommes à se réfugier vers des points d'eau où le stockage de

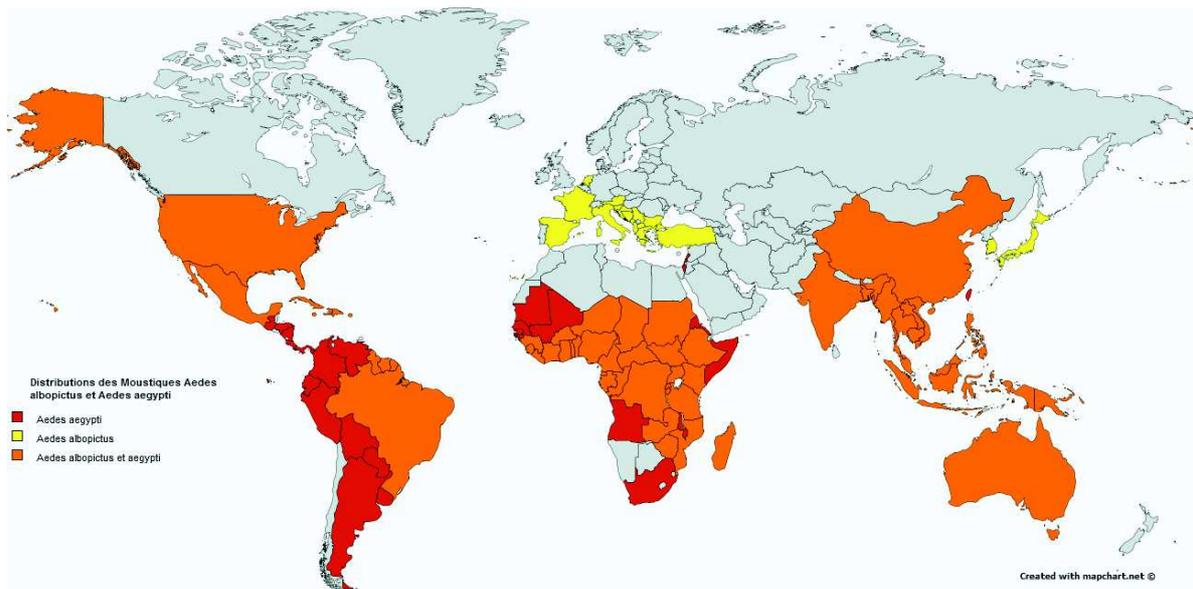
cette ressource précieuse a favorisé le maintien des populations de moustiques (Powell et Tabachnick 2013). Puis, les échanges commerciaux et humains ont entraîné la dissémination d'*Aedes aegypti* dans des régions vierges de cette espèce :

- De la partie Nord-Ouest africaine, le moustique s'est répandu vers l'Est au cours d'échanges de matières premières.
- La découverte du « nouveau monde » a conduit dès la fin du 15<sup>ème</sup> siècle à un commerce appelé « triangulaire » et flux humains importants depuis le Portugal, et Espagne vers l'Afrique de l'Ouest où des Hommes asservis sont ensuite partis aux Amériques, avec eux, des moustiques *Aedes aegypti*.
- Depuis le 18<sup>ème</sup>, les échanges grandissant entre la partie Est-africaine et le continent asiatique ont permis au diptère de s'installer dans les régions densément peuplées asiatiques et de migrer ensuite vers les îles tropicales du Pacifique au 20<sup>ème</sup> siècle.

Des épidémies liées à l'infection par le virus de la Dengue, de Fièvre Jaune, sont apparues dans des zones colonisées par ce moustique. Ce dernier a fait l'objet de luttes d'éradication dès le début du 20<sup>ème</sup> siècle.

Aujourd'hui, le moustique *Aedes aegypti*, se retrouve très majoritairement dans les pays à climats tropicaux (Figure 9) où l'humidité et chaleur permettent une reproduction efficace des populations et notamment dans les zones urbaines où ce moustique, domestiqué, trouve son gîte de reproduction et ses repas sanguins. C'est donc encore un acteur majeur de la vectorisation du virus Chikungunya dans les pays, îles de la ceinture tropicale.

Le second moustique devenu très récemment vecteur du virus du Chikungunya est *Aedes albopictus*. Il a été décrit pour la première fois par l'entomologiste Frederick Skuse du musée australien de Sydney, en 1894. Skuse écrit que ce grand moustique, isolé au Bengale, est noir et rayé de blanc et d'argent. C'est un moustique des forêts asiatiques qui a pu étendre sa présence aux îles de l'océan Indien et Pacifique au début du 20<sup>ème</sup> siècle (Gratz 2004) du fait de l'importation de pneus contenant des œufs dormants d'*Ae. albopictus*. En effet, c'est le mode d'introduction majoritaire de propagation de cet arthropode car les œufs du moustique *Aedes albopictus* ont la particularité de pouvoir résister à la dessiccation et d'éclore dès que de l'eau les immerge à nouveau. C'est également par le transport des pneus que cette espèce de moustique arrive en Europe, en Albanie dès 1979 (Adhami et Reiter 1998). Depuis, le moustique s'est implanté tout au long des côtes de la mer Adriatique jusqu'aux pays de l'Europe de l'ouest, Italie, France et Pays-Bas. En 1986, des travaux décrivent la présence de cet insecte dans l'état du Texas aux Etats-Unis (Sprenger et Wuithiranyagool 1986). Il s'en suit une migration du moustique du Nord de l'Amérique vers le Mexique (Ibanez-Bernal et Martinez-Campos) jusqu'au Brésil. Ainsi, le moustique parvient à coloniser les régions tropicales comme *Ae. aegypti*. En revanche, contrairement à *Ae. aegypti*, l'*Ae. albopictus* est plus agressif, et a la particularité de très bien résister aux conditions extrêmes et de proliférer dans les zones tempérées. Sa distribution devient donc ainsi globale et pose un vrai problème dans l'émergence ou de réémergence d'arboviroses.



**Figure 9: Planisphère montrant les répartitions des deux vecteurs du virus du Chikungunya: *Ae.aegypti* et *Ae.albopictus* en 2015. Créé à partir de données présentées dans Kraemer et al, 2015.**

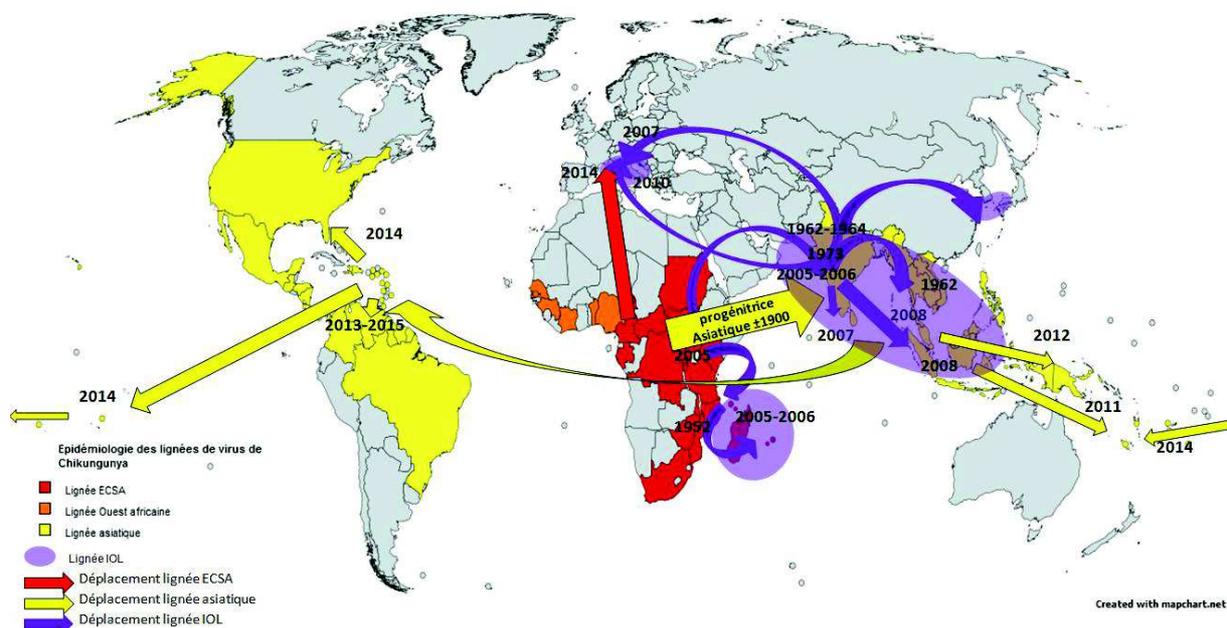
Depuis 2006, le moustique *Ae.albopictus* est le vecteur majeur du CHIKV. En 2005-2006, une mutation (une valine remplaçant une alanine en 226<sup>ème</sup> position) dans la glycoprotéine d'enveloppe 1 (E1) du virus, au cours d'une épidémie dans l'océan Indien et à la Réunion, a permis au moustique *Ae.albopictus* de devenir vecteur de cet *Alphavirus* et à largement contribuer au virus à proliférer dans des contrées n'ayant jamais répertorié ce pathogène. En effet, cette mutation a conduit à une meilleure dissémination du CHIKV dans les glandes salivaires d'*Ae.Albopictus* résultant en l'augmentation de la multiplication et transmission virale (Tsetsarkin et al. 2007, Vazeille et al. 2007, Tsetsarkin et Weaver 2011).

## B. Épidémiologie et maladie du Chikungunya

### 1) Épidémiologie

La première grande épidémie due au CHIKV a été observée par Marion Robinson en Tanzanie en 1952. Parce que les symptômes de la maladie ressemblent à ceux provoqués par une infection du virus de la Dengue, on ne peut pas exclure que de précédentes épidémies aient pu avoir lieu en Afrique ou en Asie depuis l'introduction et l'implantation de la lignée asiatique. Cette épidémie en Afrique du Sud-Est a permis d'identifier le CHIKV, comme étant un des agents causaux des pathogénèses arthritiques. Depuis cette date, le CHIKV a été également impliqué de façon avérée dans d'autres vagues épidémiques : en Thaïlande au début des années 1960 où plus de 31% de la population vivant à Bangkok est séropositive au CHIKV (Halstead et al. 1969), et aussi en Inde de 1962 à 1973 (Padbidri et Gnaneswar 1979). En 2004, le CHIKV ré-émerge dans la ville de Mombasa au Kenya. La souche Est-Centre-Sud-Africaine (ECSA) ré-émergeante et a été transportée dans les îles des Comores en 2004 où 60% de la population est devenue infectée (Sergon et al. 2007) puis sur l'île de la Réunion en décembre 2005 où la mutation A226V a permis à *Ae.Albopictus* de vectoriser le CHIKV

qui a infecté plus de 35% de la population réunionnaise. Cette même souche a été ensuite importée sur l'île Maurice et dans les îles proches en 2006. De manière concomitante, une épidémie majeure éclate en Inde avec plus d'un million de cas référencés (Mavalankar et al. 2008). Alors qu'habituellement les cas d'infection observés étaient liés à la lignée asiatique, la lignée incriminée dans cet épisode épidémique correspondait à la lignée ECSA non porteuse de la mutation A226V, apparue en Afrique de l'Est quelques mois plus tôt (Arankalle et al. 2007). Cette lignée va ensuite supplanter la lignée asiatique, présentant des capacités prolifératives moindres lors des épidémies recensées en Asie du Sud-Est jusqu'en 2008. En 2007, une autre épidémie liée cette fois-ci à la souche ECSA portant la mutation A226V est déclarée en Inde (Sumathy et Ella 2012). Cette souche sera transportée depuis l'Inde jusqu'en Europe, Italie en 2007 (Rezza et al. 2007), et en France 2010 (Grandadam et al. 2011) (Figure 10). La souche Asiatique, quant à elle, s'est répandue dès 2011 dans les îles du Pacifique Sud-Ouest. Deux voyageurs revenus d'Indonésie ont importé le CHIKV en Nouvelle-Calédonie (Cao-Lormeau et Musso 2014) où 33 cas de transmissions autochtones ont été recensés. En 2012, La Papouasie Nouvelle-Guinée enregistre sa première épidémie, puis c'est au tour des îles de Micronésie en 2013. La souche qui circule alors dans ces archipels atteint ensuite jusqu'à l'île de Saint Martin (Lanciotti et Valadere 2014) où l'*Aedes aegypti*, déjà présent, sert de vecteur. Les échanges entre îles et continent étant nombreux, il faudra moins de deux ans pour que le virus de la lignée asiatique ne provoque la première grande épidémie en Amérique avec 1 675 387 cas recensés et 240 morts dans 45 pays de décembre 2013 à septembre 2015 (Petersen et Powers 2016). Des Caraïbes, le virus est transporté ensuite en Polynésie en 2014 où environ 320 cas d'infections ont été déclarés (Aubry et al. 2015). En octobre 2014, 12 cas autochtones de Chikungunya, d'une souche virale importée d'Afrique de l'Ouest, ont été reportés à Montpellier (Delisle et al. 2015).



**Figure 10. Planisphère montrant la répartition des vagues épidémiques liées à l'infection par le CHIKV et la distribution des différentes lignées de CHIKV au cours de ces épidémies. Adapté de Weaver, 2014.**

## a) Tropisme cellulaire et pathologie

### 1. Le tropisme cellulaire du virus Chikungunya

Les manifestations de la maladie sont étroitement liées au tropisme du virus, à sa réplication dans les cellules cibles et à l'inflammation provoquée localement. Le CHIKV se multiplie de manière efficace dans diverses cellules adhérentes en culture notamment dans les cellules dérivées d'épithéliums de rein HEK293T, de col utérin HeLa, de bronches BEAS-2B (Sourisseau et al. 2007), dans des cellules endothéliales primaires (du foie par exemple), les cellules satellites musculaires CD34+ (Ozden et al. 2007), dans des fibroblastes de peau, des poumons, de muscles (Couderc et al. 2008), dans des macrophages (Sourisseau et al. 2007) et des cellules du système nerveux, neurones et cellules gliales (Das et al. 2010). Les lymphocytes B, lymphocytes T et les cellules sanguines (sauf macrophages et plaquettes), les kératinocytes, sont réfractaires à l'infection du CHIKV (Sourisseau et al. 2007, Solignat et al. 2009) soit parce qu'ils n'expriment pas le récepteur du virus à leur surface (Solignat et al. 2009) soit parce qu'ils empêchent la mise en place d'un cycle réplicatif à une étape post-fusion comme c'est le cas avec les cellules de carcinome de poumon A549 (Salvador et al. 2009) ou les kératinocytes (Bernard et al. 2015). Le tropisme du virus Chikungunya est donc large et peut s'expliquer de deux raisons : soit sa protéine d'enveloppe E2 peut se lier à différents récepteurs grâce à plusieurs sites de liaisons, ou soit parce qu'il existe un récepteur exprimé de façon ubiquitaire par de nombreuses cellules chez l'Homme et partagé par différentes espèces impliquées dans les cycles de transmission du pathogène.

### 2. Les pathologies et l'immunité de l'infection au CHIKV

Le Chikungunya est caractérisée une phase aiguë et une possible phase chronique. 2 à 4 jours après piqûre d'un *Aedes* porteur du virus, les premiers symptômes caractéristiques apparaissent de manière concomitante à l'augmentation de la charge virale dans l'organisme et de sa réponse inflammatoire par l'Interféron de type 1 (Schwartz et Albert 2010). On estime que de 15 à 20 % des personnes infectées sont des porteurs asymptomatiques. Ainsi, la plupart des personnes infectées par le CHIKV présenteront un tableau clinique aigu : fièvre intense, maux de têtes, douleurs articulaires intenses, rigidité musculaire et éruptions cutanées. Dans de très rares cas, on observe des symptômes sévères tels que : méningo-encéphalite, syndrome de Guillain-Barré, myocardites (Lemant et al. 2008, Oehler et al. 2015, Crosby et al. 2016).

Certains modèles animaux (souris et primates) ont été utilisés pour permettre d'analyser les mécanismes d'apparition de la pathologie liée à la multiplication de CHIKV. Ainsi, Gardner et coll. ont montré que le rhumatisme lié à l'infection CHIKV chez la souris était associé à une production accrue de médiateurs proinflammatoires et au recrutement de cellules immunitaires mononucléaires (monocytes, macrophages, et natural killer) dans les articulations et muscles (Gardner et al. 2010). Dans ce modèle, un pré-traitement à l'interféron  $\alpha$  avant infection, prévient l'apparition de la maladie (Gardner et al. 2010) et la souris déficiente pour le récepteur à l'interféron de type I (Souris IFNAR<sup>-/-</sup>) développe une forme sévère de la maladie démontrant ainsi l'effet protecteur de l'interféron de type I sécrété au cours de l'infection par CHIKV (Couderc et al. 2008). Dans ce cas, le virus est retrouvé dans les muscles, les fibroblastes de la peau et les articulations, dans différents épithéliums et endothéliums du foie, de la rate, et du cerveau (Couderc et al. 2008). Par la suite, Labadie et

coll. ont développé un modèle d'infection plus proche de l'Homme: le macaque (*Macaca fascicularis*). Dans ce modèle, cette équipe a inoculé le CHIKV soit en intraveineuse ou de manière intradermique. Les paramètres virémiques et les sites de réplication du virus ont été analysés. Chez le macaque, le CHIKV cible particulièrement les tissus lymphoïdes, le système nerveux central, les articulations, le foie et les muscles en phase aigüe. Durant cette phase aigüe, la virémie est maximale (allant jusqu'à  $10^9$  particules virales par mL de sang chez ces macaques), puis décroît jusqu'à ne plus être détectable la semaine suivant l'infection (Labadie et al. 2010). Toutefois, même si la guérison semble être obtenue, une phase chronique peut éventuellement se développer. Si les mécanismes conduisant à l'apparition d'arthralgies sont encore mal connus, plusieurs indices semblent indiquer que les réactions immunitaires et la persistance virale pourraient être incriminées. Chez les patients souffrant de formes sévères, une synthèse accrue de cytokines comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF $\alpha$  est observée (Ng et al. 2009, Chow et al. 2011, Kelvin et al. 2011, Wauquier et al. 2011). Ces réponses inflammatoires peuvent induire une réaction localisée au niveau de la peau où des éruptions cutanées ont été reportées (Prashant et al. 2009) et de sévères arthralgies aux articulations osseuses (Ng et al. 2009, Hoarau et al. 2010, Chow et al. 2011). Gasque et coll. postulent ensuite que l'arthralgie persistante chez des patients développant une forme chronique de la maladie pourrait être liée à une activation perpétuelle des réactions inflammatoires au niveau des articulations (Hoarau et al. 2010, Gasque et al. 2015) notamment du fait de la persistance du CHIKV dans les articulations, comme démontré chez le macaque, 90 jours suivant l'infection (Labadie et al. 2010). La synthèse des médiateurs proinflammatoires pourraient donc avoir un rôle dans l'établissement de la chronicité et l'apparition de ces symptômes invalidants (Gasque et al. 2015). Il est particulièrement intéressant de souligner ici que chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (maladie articulaire inflammatoire et chronique), les concentrations élevées d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6, tout comme d'IFN- $\alpha$ , sont les marqueurs principaux de la sévérité de la maladie (Ng et al. 2009, Hoarau et al. 2010, Wauquier et al. 2011). Dans le cas du CHIKV, les mécanismes à l'origine de cette production excessive au niveau des articulations ne sont pas encore élucidés. Toutefois, dans une étude récente, Phuklia et coll. démontrent que les synoviocytes infectés par CHIKV produisent et libèrent dans le milieu extracellulaire des médiateurs de recrutement de phagocytes (RANKL, IL-6, IL-8, Monocyte chemoattractant protein-1) et de différenciation des monocytes/macrophages en cellules présentant un phénotype voisin des ostéoclastes. Ces cellules différenciées sécrètent de grandes quantités d'IL-6 et de TNF $\alpha$ , qui induisent une importante inflammation et une résorption osseuse dans l'articulation (Phuklia et al. 2013). Si ces réactions perdurent après la phase aigüe et en l'absence de virémie, cela indique que potentiellement le virus ou ses constituants persistent dans certaines cellules ou tissus. Ce qui semble être en effet confirmé par la présence du CHIKV dans les macrophages (Labadie et al. 2010, Dupuis-Maguiraga et al. 2012) et les fibroblastes au niveau des articulations (Jaffar-Bandjee et al. 2009). Dans le modèle souris, l'équipe d'Hawman montre que le virus persiste dans les articulations de souris Rag 1 $^{-/-}$ , présentant des défauts de mise en place d'une immunité adaptative, provoquant des synovites caractéristiques d'arthrites. L'injection d'anticorps neutralisant dirigés contre le CHIKV empêche l'établissement de cette persistance dans ces mêmes souris (Hawman et al. 2013). Ainsi, le développement de formes chroniques de Chikungunya serait une à la réponse inflammatoire excessive. La persistance du virus dans certaines cellules et possiblement un contexte génétique entravent la mise en place d'une réponse adaptative appropriée et conduiraient à l'apparition du Chikungunya chronique.

L'infection par le CHIKV conduit normalement à l'établissement d'une immunité adaptative protectrice. En effet, dès le premier jour d'infection des immunoglobulines M (IgM) peuvent déjà être détectées dans les sérums des patients infectés suivis par des IgG au second jour de l'infection, leur concentration sérique augmentant de concert avec la charge

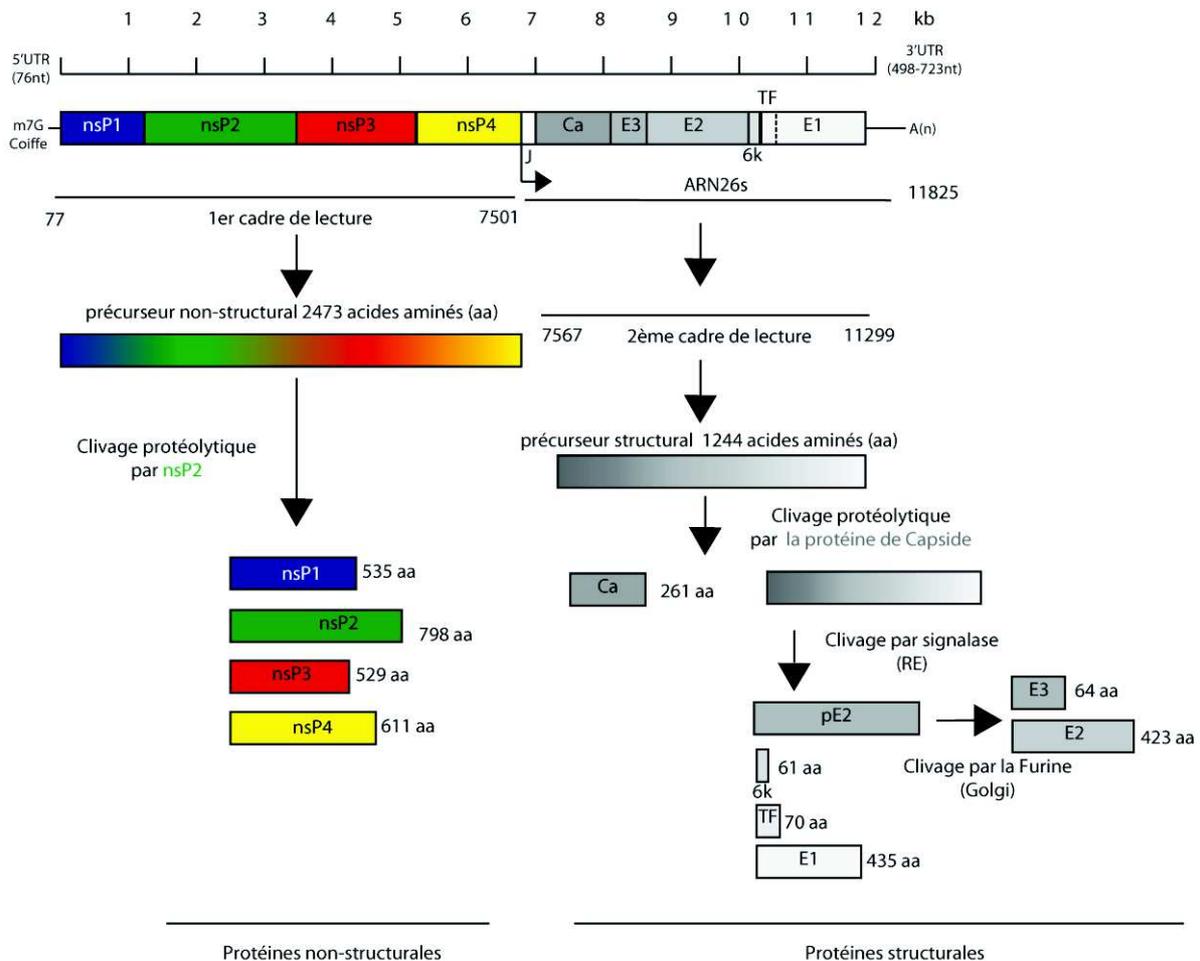
virale au cours de la phase aigüe (Panning et al. 2008). Les anticorps produits sont capables de neutraliser le CHIKV et de prévenir l'infection virale de nouvelles cellules (Couderc et Lecuit 2009). La production de ces anticorps peut permettre d'activer des effecteurs permettant l'élimination du virus, par exemple des lymphocytes « natural killer » qui grâce à leur récepteur CD16 lient les IgG et éliminent les cellules infectées présentant les antigènes viraux (Beltran et Lopez-Verges 2014). Les lymphocytes « natural killer » sont activés dès le début de l'infection (Hoarau et al. 2010, Petitdemange et al. 2011) tout comme les lymphocytes T CD8+ puis CD4+ reconnaissant les protéines virales E2, nsP1 et capsid et favorisant l'élimination virale (Wauquier et al. 2011). L'étude approfondie de ces mécanismes d'activation et réactionnels pourraient, dans le futur, apporter des réponses quant aux processus de mise en place de pathologies graves et ouvrir la voie au développement de vaccins protégeant les populations naïves au virus.

## **C. La biologie du CHIKV**

### **1) L'organisation du virus du Chikungunya**

#### **a) Son génome**

Le CHIKV possède un génome de 11.8 kb. Il est composé de régions non-codantes et de régions qui codent pour les protéines nécessaires pour la réplication de ce génome et la formation de nouveaux virions (Figure 11).



**Figure 11: Organisation du génome de CHIKV et des protéines codées par le génome.** Le génome du CHIKV possède une coiffe à son extrémité 5' et une queue poly(A) en 3'. A ces extrémités sont situées des séquences non traduites régulatrices (UTR). La jonction J est non codante. L'ARN subgénomique de polarité positive est référé en tant qu'ARN 26S et est transcrit à partir de l'ARN génomique simple brin de polarité négative. Il sert d'ARNm codant pour les protéines structurales du virus. Adapté de Solignat et al, 2009.

## 1. Les régions non-codantes

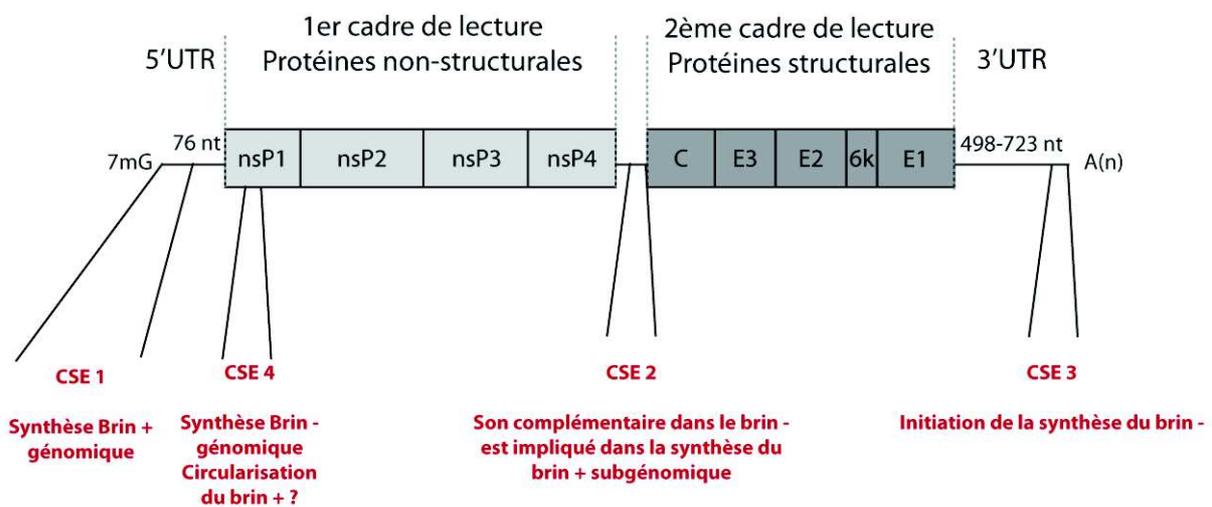
Les parties non traduites des *Alphavirus* sont essentielles pour assurer la multiplication de virus chez les vertébrés hôtes et chez leur vecteur. Les parties 5' et 3' UTRs contiennent des séquences conservées « Conserved Sequence Elements » (Fayzulín et Frolov, 2004 (Fayzulín et Frolov 2004)) au sein des différentes espèces virales du genre *Alphavirus*, et des structures secondaires particulières, toutes deux importantes pour la synthèse des brins positifs et négatifs (intermédiaires de réplication) des ARNs viraux.

### i. Les CSEs

Le premier CSE se situe en début de partie 5'UTR du génome CHIKV, et forme une structure en tige-boucle (Figure 12). Cette séquence fonctionnerait comme un promoteur de la synthèse du brin d'ARN génomique à polarité positive à partir du brin négatif (Ou et al. 1983)

Le deuxième CSE identifié est une séquence de 24 nucléotides présente au début du promoteur subgénomique du virus Sindbis et est parfaitement conservé chez CHIKV (Figure 12). Le complémentaire de cette séquence, présent dans le brin négatif d'ARN est caractérisé comme étant le promoteur de transcription du brin positif de l'ARN subgénomique (Ou et al. 1982, Levis et al. 1990)

Le troisième CSE identifié se situe juste en amont de la queue polyadénylée en 3' du génome des *Alphavirus* (Kuhn et al, 1990 ; Hardy et Rice, 2005 ; Hardy, 2006). Cette séquence de 19 nucléotides (Figure 12) serait nécessaire pour que la polymérase virale synthétise le brin d'ARN négatif du sens 3' vers 5' (Ou et al. 1981). En effet, des mutations dans cette séquence réduisent significativement la quantité de brin d'ARN à polarité négative dans une cellule infectée par le virus Sindbis. Raju et ses collaborateurs ont montré que l'effet délétère de la suppression de cette séquence peut être contrecarrée par ajout d'une séquence riche en adénines et en uraciles (Raju et al. 1999).



**Figure 12: Localisation des CSEs dans le génome du CHIKV.** Le CSE 1 serait impliquée dans la synthèse du brin + génomique à partir d'une matrice de polarité négative. Le CSE2 est situé dans la jonction séparant les deux cadres de lectures. Le CSE3 est situé directement en amont de la queue poly adénylée. Le CSE4 est situé dans la partie 5' de la région codante pour nsP1 et est prédite pour former des structures secondaires (Michel et al. 2007).

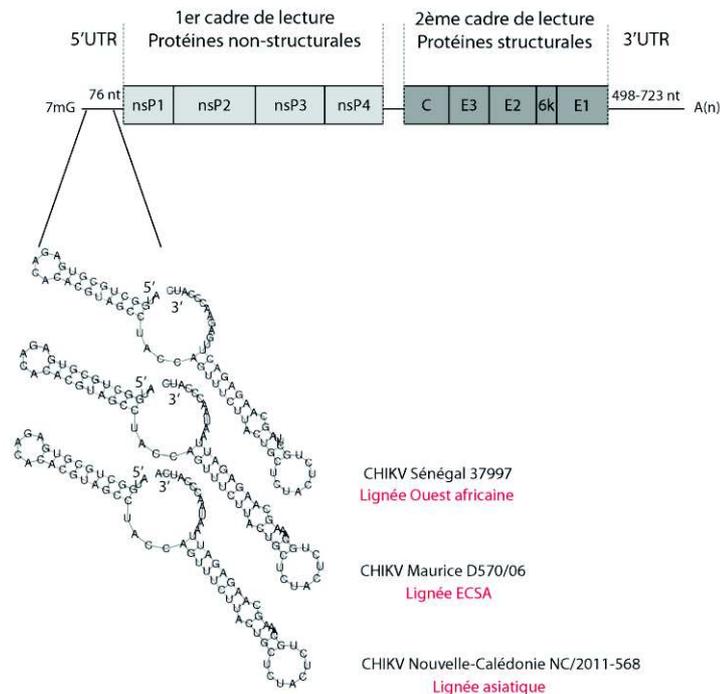
Un quatrième CSE est présent dans la séquence codante de nsP1 (Figure 12). Il est constitué de 51 nucléotides et pourrait correspondre à une séquence stimulatrice de la réplication virale de manière virus et cellule dépendante (Niesters et Strauss 1990, Fayzulín et Frolov 2004). Cette séquence, parce qu'elle se situe dans la séquence codante pour la protéine nsP1, ne peut être modifiée par mutation car cela changerait la structure et la fonction de nsP1. Si toutefois la séquence codante pour nsP1 devait subir des mutations, des modifications génétiques adaptatives pourraient apparaître dans les séquences codantes de nsP2 et nsP3 (Fayzulín et Frolov 2004). Ce quatrième CSE est très important pour la réplication du virus Sindbis dans les cellules de moustique infectées (Fayzulín et Frolov 2004) puisqu'il serait impliqué dans la traduction des nsPs, de la synthèse du génome en brin positif et négatif et que les modifications des structures secondaires (Figure 12) réduit considérablement la réplication virale du VEEV (Michel et al. 2007). Ces observations peuvent être expliqués par la présence de sites de fixation des protéines virales ou de protéines cellulaires impliquées dans la réplication du génome viral (Pardigon et Strauss 1992, Pardigon et al. 1993). Par ailleurs, une autre hypothèse suggère que le CSE présent dans nsP1 est nécessaire pour la synthèse du brin négatif et que le CSE de 19 nucléotides précédant la queue

poly A est considéré comme étant le promoteur de l'initiation de la transcription de brin d'ARN, permettraient au génome viral de se circulariser pour permettre sa réplication. Cette potentielle circularisation ne serait pas directement liée à une interaction ARN-ARN, les séquences des extrémités du génome n'étant pas complémentaires, mais impliquerait des interactions avec des protéines cellulaires et virales (Frolov et al. 2001).

## ii. Les structures de la partie 5'UTR

La première structure rencontrée à l'extrémité du 5'UTR est la coiffe. La coiffe est une structure moléculaire reconnue par la machinerie traductionnelle de la cellule. Les acteurs cellulaires de la synthèse protéique s'assemblent autour de la coiffe et permettent la traduction des séquences codantes des protéines en aval de cette coiffe. Dans le cas des *Alphavirus*, les ARN viraux synthétisés et empaquetés dans les virions se voient ajouter une 7-méthylguanosine grâce à l'action des protéines nsp1 et nsp2, cette modification serait responsable d'une plus grande stabilité des ARN viraux « coiffe-dépendante » de l'ARN (Ahola et Kaariainen 1995, Ahola et al. 1997, Vasiljeva et al. 2000, Li et al. 2015). La coiffe des *Alphavirus* est légèrement différente de celle des ARNm de la cellule hôte ou d'autres virus puisque c'est une coiffe de structure « Cap 0 ». En effet, contrairement aux ARNm cellulaires et par exemple à l'ARN d'Ebola ou du virus Marburg. La coiffe de l'ARN de polarité positive du CHIKV et des autres *Alphavirus* ne possède pas de méthylation sur le groupement hydroxyle (OH) du deuxième carbone du ribose (2'-O-méthyl), mais sur l'atome d'azote en position 7, de la Guanosine (7mG). Cette structure « Cap 0 » est reconnue par des ISGs (« Interferon Stimulated Gene ») des protéines cellulaires comme RIG-I (Devarkar et al. 2016) et Ifit1 (Hyde et al. 2014) conduisant à la mise en place d'une réponse antivirale. Le CHIKV peut empêcher la reconnaissance de cette structure par Ifit1 grâce à ses structures secondaires en tige-boucle du 5'UTR (Hyde et al. 2014), mais le mécanisme exact de cette restriction reste encore méconnu. Une autre hypothèse développée le groupe de Pestova suggère que la restriction de la réplication virale par Ifit1 serait liée à l'absence d'interaction d'eIF4E et d'eIF4F (Kumar et al. 2014) sur l'ARN viral où Ifit1 se serait préalablement fixée, dès lors l'initiation de la traduction des protéines virales serait inhibée.

Deux autres structures possiblement importantes dans la traduction des protéines virales en aval de la coiffe seraient les deux tiges-boucles présentes dans le 5'UTR du CHIKV (Figure 13). A l'heure actuelle, leurs fonctions ne sont pas élucidées et l'interaction avec des protéines cellulaires n'est pas démontrée. Toutefois, les ARN génomiques et subgénomiques de polarité positive étant coiffés de manière identique mais entraînant une association différentielle des facteurs de traduction (Gonzalez-Almela et al. 2015), il est possible que les structures secondaires du 5'UTR participent à l'association de facteurs d'initiation de la traduction des protéines non-structurales virales.



**Figure 13: L'extrémité 5'UTR des différentes lignées de CHIKV contiennent une séquence et une structure secondaire conservée. Les structures secondaires de l'extrémité 5'UTR des souches de CHIKV Sénégal (37997 : GenBank: AY726732.1), île Maurice (D570/06 : GenBank: EF012359.1), Nouvelle-Calédonie (NC/2011-568 : GenBank: HE806461.1) ont été prédites avec le serveur « RNA Fold ».**

### iii. Les structures de la partie 3'UTR

Si l'extrémité 5' du CHIKV contient une coiffe, l'extrémité 3' possède une autre caractéristique partagée par les ARN messagers, une queue polyadénylée. Cette structure est ajoutée par nsP4 au cours de la polymérisation du nouveau brin d'ARN. Cette séquence riche en adénines doit au moins être constituée de 11 à 12 nucléotides en plus du CSE2 pour un amorçage et une synthèse efficace du brin d'ARN négatif (Hardy et Rice 2005). Sa taille, d'au moins 11 nucléotides, est nécessaire à l'interaction de la protéine PABP (Poly(A)-Binding Protein) avec les queues polyA des ARNm induisant une circularisation de ces ARNm et permettant leur traduction de manière efficace (Lemay et al. 2010).

En amont de cette queue poly A on retrouve une cytosine parfaitement bien conservée chez toutes les souches de CHIKV et chez tous les *Alphavirus*. Cette cytosine serait responsable de l'initiation de la synthèse du brin de polarité négative au niveau du CSE2. (Figure 12 - Page 21) (Hardy 2006b). Les extrémités 3' UTR des *Alphavirus* sont de tailles variables même au sein des différentes souches du CHIKV. En effet, l'extrémité 3'UTR peut être constituée de 498 à 723 nucléotides (Hyde et al. 2015). Cette différence importante est notamment liée à la présence de séquences répétées nommées RSE (« Repeated Sequence Element »). La fonction exacte de ces séquences n'est pas connue actuellement, mais elles pourraient jouer un rôle dans la réplication du CHIKV dans les cellules de moustiques. En effet, les moustiques utilisant le système des miRNA en guise de système de défense contre un pathogène en particulier dans le mésentéron moyen. Ces RSEs seraient potentiellement une cible pour des miRNA complémentaires qui dans ce contexte moduleraient la réplication du CHIKV. Un des miRNAs étudiés lors de l'infection par l'EEEV est le miR-142-3p. Celui-ci

se fixe sur les séquences répétées du 3'UTR et empêche la traduction de protéines virales, la réplication du génome et limite ainsi la production d'interféron de type I (Trobaugh et al. 2014). Dès lors, une extrémité 3'UTR plus longue pourrait être la cible de miRNAs qui moduleraient possiblement la capacité du virus à se répliquer notamment dans son vecteur moustique. Dans le cas du CHIKV la lignée asiatique possède un 3'UTR plus long que les autres lignées de CHIKV, de la même manière que précédemment, ce virus présente une moins bonne aptitude à se répliquer que d'autres CHIKV possédant un 3'UTR plus court dans les vecteurs moustiques. Chez ces diptères, le système de miRNA étant très utilisé en réponse à un pathogène, il est donc probable que cette extrémité 3'UTR de la souche asiatique, soit la cible de miRNAs, modifiant sa réplication dans le vecteur moustique.

L'extrémité 3'UTR peut également interagir avec des protéines cellulaires afin de réguler la réplication de l'*Alphavirus*. L'un des exemples les plus connus est la fixation de la protéine Human antigen R (HuR) sur l'extrémité 3'UTR des *Alphavirus*. A l'exception du virus O'Nyong-nyong, du virus Ross River et du CHIKV qui possèdent une séquence RSE, pour les autres Alphavirus il existe une queue polyA précédée d'un CSE de 19 nucléotides en aval d'une séquence riche en Uraciles. Le RSE et la séquence riche en uraciles induisent la fixation de HuR (Sokoloski et al. 2010). Lors de l'infection par un *Alphavirus* une fuite de HuR du noyau vers le cytoplasme où la protéine s'accumule dans des granules cytoplasmiques est observée (Dickson et al.). Le signal qui entraîne cette fuite nucléaire est contenu dans la séquence riche en uraciles et la séquence CSE du génome de Sindbis (Barnhart et al. 2013). Ce mécanisme se produisant également pour le CHIKV, il est possible que la séquence CSE soit de la même façon capable d'entraîner cette fuite de HuR du noyau vers le cytoplasme. La liaison de HuR sur l'extrémité 3' de l'ARN viral a pour fonction de stabiliser ce dernier en empêchant l'ARN d'être déadénylé et donc de prévenir la dégradation de l'ARN dans les cellules de moustiques et de mammifères (Garneau et al. 2008, Sokoloski et al. 2010, Dickson et al. 2012). Si des facteurs pro-viraux peuvent se fixer sur cette extrémité 3'UTR, il pourrait être de même avec des protéines à fonction antivirale. La protéine DDX58 appelée aussi RIG-I reconnaît des régions riches en adénines et uraciles de la partie 3'UTR du CHIKV (Sanchez David et al. 2016). Cette reconnaissance pourrait conduire après activation d'une cascade de signalisation à la transcription de gènes d'IFN- 1 ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et la mise en place d'un état antiviral.

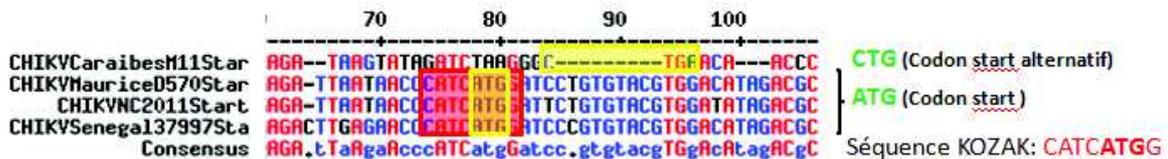
Ainsi, les régions non codantes retrouvées dans les parties 5' et 3' UTR du CHIKV pourraient avoir un rôle extrêmement important dans le cycle réplcatif du virus, puisque par l'intermédiaire de leurs séquences ou de leurs structures secondaires elles pourraient permettre de stabiliser le génome viral, mais également de réguler la traduction des protéines virales ainsi que la réplication du virus. Ces mécanismes pourraient être facilités par le recrutement de différents cofacteurs cellulaires.

## 2. Les cadres de lecture

Le CHIKV, comme tous les *Alphavirus*, possède deux cadres de lecture.

Dans son génome de 11,8 kb, un premier cadre de lecture, de 7.4 kb, permet de synthétiser une polyprotéine qui, après clivage/maturation par nsP2 du fait de son activité protéase, permettra d'obtenir quatre protéines non-structurales (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) qui participeront à la réplication du génome viral et au contrôle des réponses cellulaires grâce à leurs interactions avec des partenaires protéiques de la cellule hôte infectée. Ce cadre de lecture est sous la dépendance d'un promoteur situé en 5' qui dirige la traduction de la polyprotéine de 2473 acides aminés à partir d'un codon initiateur AUG (sauf exception pour

la souche M111 CHIKV isolée aux caraïbes, où ce codon initiateur est remplacé par un codon alternatif CUG (Figure 14) en position 77. Au niveau de l'AUG une séquence kozak est retrouvée (en cadre rouge sur la figure 14) permettant le recrutement de sous-unités ribosomales dans une cellule eucaryote et une traduction efficace de la polyprotéine non-structurale dans cette cellule infectée (Kozak 1981, Ou et al. 1983). La présence d'un codon initiateur CUG permet une traduction certes moins efficace que les situations précédentes (Mehdi et al. 1990), mais a l'avantage d'être active même en conditions de stress (Kim et al. 2011b, Starck et al. 2012).



**Figure 14:** L'alignement des séquences de la jonction 5'UTR-nsP1 de quatre souches de CHIKV montre la modification du codon initiateur de la polyprotéine non-structurale dans la souche caribéenne M111. Les séquences de la jonction 5'UTR-nsP1 de deux souches de la lignée asiatique (isolées aux Caraïbes (GenBank: LN898112.1) et en Nouvelle-Calédonie (NC/2011-568 : GenBank: HE806461.1)), d'une souche de la lignée d'Afrique de l'Ouest (Sénégal, 37997 : GenBank: AY726732.1), et d'une souche de la lignée ECSA (île Maurice, D570/06 : GenBank: EF012359.1) ont été alignées avec le logiciel Multalin (INRA-Toulouse). Le cadre jaune surligne le codon initiateur de la traduction du premier cadre de lecture. Dans l'ARN T=U.

Après ce premier cadre de lecture, se trouve une séquence « promoteur » qui régule le deuxième cadre de lecture (3,7kb) codant une polyprotéine de 1244 acides aminés (Figure 11- Page 20) qui sera clivée d'une part par la protéine de capsidite et par une enzyme cellulaire (« Furin ») pour obtenir les protéines de Capsidite, pE2, 6K et E1 qui permettront *in fine*, de former de nouveaux virions.

## b) Les protéines non-structurales et leurs partenaires cellulaires

Les protéines nsPs du CHIKV sont indispensables à la multiplication virale au sein des cellules infectées, car elles forment les sphérules abritant la réplication du génome viral. Dans ces complexes de réplication (CRs), au delà des protéines nsPs, il est tout à fait probable que des partenaires cellulaires interagissant avec les nsPs soient retrouvés et puissent influencer la réplication virale.

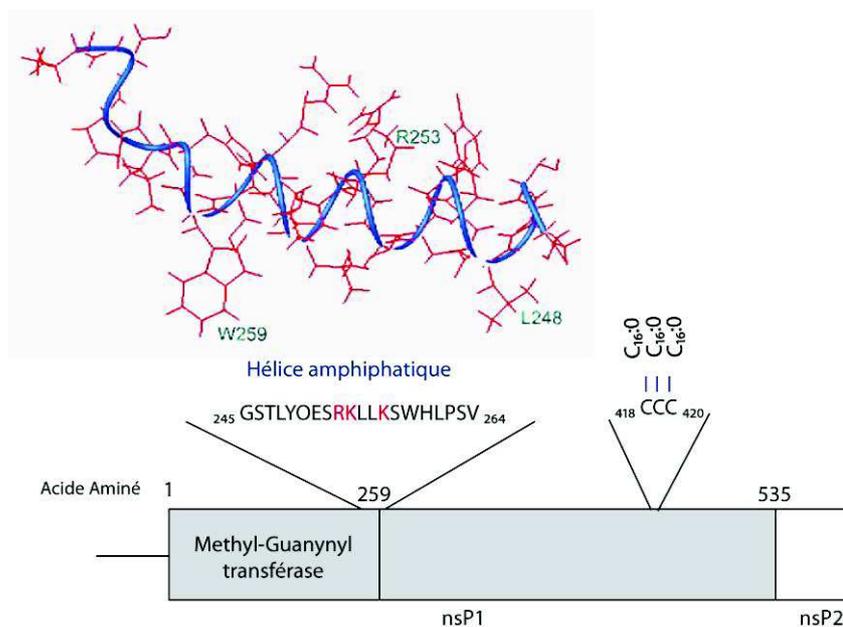
### 1. nsP1

Si les ARNs à polarité positive des *Alphavirus* possèdent une coiffe à leur extrémité 5' c'est grâce aux deux activités enzymatiques que possède nsP1. En effet, grâce à son activité méthyltransférase, nsP1 transfère un groupement méthyl depuis une S-adenosylméthionine jusqu'à l'atome d'azote, en 7<sup>ème</sup> position de la guanine d'un GTP pour former un m<sup>7</sup>GTP. Cette molécule liée à nsP1 va entraîner l'activation de sa deuxième fonction enzymatique, la guanylation conduisant à la formation de m<sup>7</sup>GMP + PPI. L'ARN néo-formé sur lequel la

coiffe doit être positionnée va subir une déphosphorylation à l'extrémité 5' pour que la coiffe m<sup>7</sup>GMP puisse être ajoutée sur cette extrémité 5'-diphosphate. L'ARN viral est ainsi coiffé. Ce mécanisme proposé n'est pas totalement élucidé bien qu'étudié chez les *Alphavirus* de l'ancien monde (Mi et Stollar 1991, Laakkonen et al. , Ahola et Kaariainen 1995) et chez les *Alphavirus* du nouveau monde (Li et al. 2015).

NsP1 est une protéine de 535aa, 60kDa, essentielle dans la réplication du génome du CHIKV puisqu'en se liant à des phospholipides anioniques membranaires tels les phosphatidylsérines (Ahola et al. 1999, Ahola et al. 2000), et en liant toutes les protéines nsPs (Sreejith et al. 2012) permet l'ancrage du complexe de réplication sur la membrane cellulaire. Cet ancrage serait favorisé par les acides aminés 245 à 264 présentant une structure putative en hélice  $\alpha$  possédant un caractère amphipatique et par la présence de 3 résidus positifs (R253, K254 et K257 chez CHIKV) (Figure 15) qui permettraient une liaison efficace aux membranes lipidiques négatives (Ahola et al. 1999). Cette liaison aux membranes est d'autant plus forte que la protéine est palmitoylée sur les cystéines 418 et 420. Alors que la liaison de nsP1 aux lipides anioniques est importante pour ses activités méthyltransferase, et de guanylation (Ahola et al. 1999), la palmitoylation de nsP1 ou sa suppression ne modifient pas ses fonction enzymatiques et la réplication virale dans des cellules de vertébrés (Laakkonen et al. , Ahola et al. , Karo-Astover et al. 2010). Cependant, dès lors que nsP1 est palmitoylée, une modification de la morphologie des cellules devient visible: de nombreuses structures ressemblant à des filopodes ne contenant ni filaments d'actine, ni microtubule, ni composants des filaments intermédiaires sont produites (Laakkonen et al.). Parallèlement, il semble également que la mutation des cystéines palmitoylées affecte l'interaction de nsP1 avec la polymérase virale nsP4 et que des mutations compensatoires sont rapidement identifiées sur d'autres résidus de nsP1, principalement en partie N-terminale qui permettent de rétablir cette liaison à nsP4 et de fait de maintenir les mêmes niveaux de réplication virale (Zusinaite et al. 2007).

En ce qui concerne les partenaires cellulaires interagissant avec nsP1, très peu d'interactions ont été décrites. Il semblerait qu'elle pourrait interagir avec des protéines « chaperones » du réticulum endoplasmique (Rana et al. 2013), toutefois les protéines cellulaires responsables de la palmitoylation des cystéines restent inconnues.



**Figure 15: La protéine nsP1 de CHIKV.** En N-terminal se situe l'activité méthyl-guanylyl transférase nécessaire à l'addition de la coiffe des ARN positifs synthétisés. Une hélice-□□ à caractère amphiphatique est située en C-ter du domaine méthyl-guanylyl transférase (Lampio et al. 2000) et est requise pour l'association à la membrane plasmique. Les acides aminés chargés positivement impliqués dans la liaison aux lipides anioniques sont en rouge. En C-ter, les cystéines 418 à 420 sont modifiées post-traductionnellement par palmitoylation.

## 2. nsP2

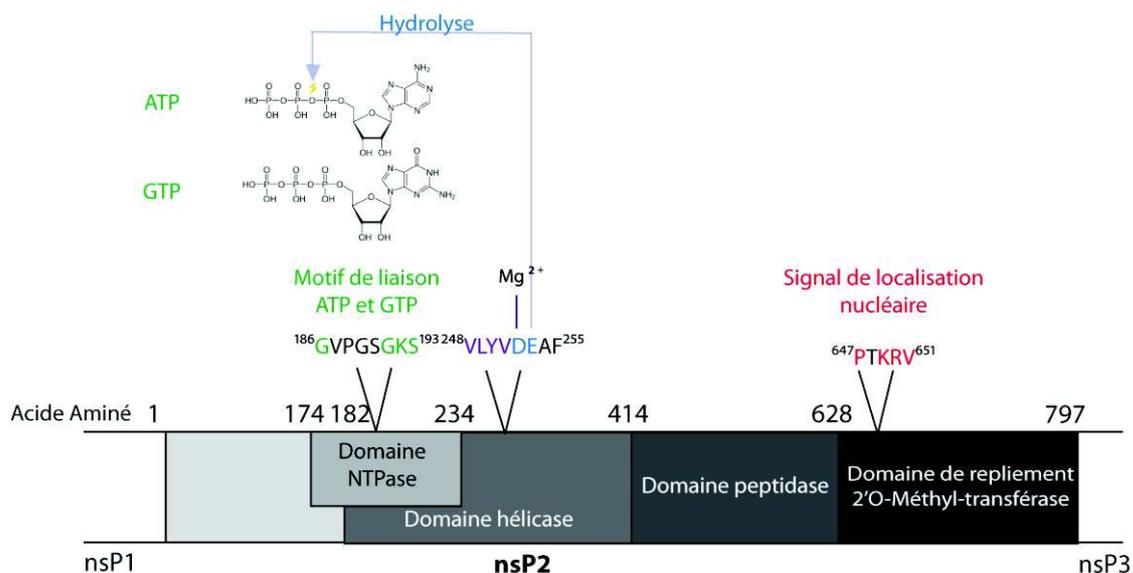
Nsp2, la plus grande des protéines nsPs possède de nombreuses fonctions. Cette protéine de 797 acides aminés possède dans sa partie N-terminale une activité nucléoside-triphosphatase (NTPase) dont les substrats préférés sont l'ATP, dATP, GTP et dGTP (Karpe et al. 2011), une partie hélicase à sept motifs spécifiques (des acides aminés 180 à 419) (Karpe et al. 2011) et une activité 5' ARN triphosphatase permettant avec la protéine nsP1 de coiffer les ARN à polarité positive néo-synthétisés (Figure 16). Dans sa partie C-terminale, il existe un domaine protéase compris entre les acides aminés 471 à 605, (Pastorino et al. 2008) induit le clivage de la polyprotéine (Hardy et Strauss 1989, Strauss et al. 1992) et un domaine méthyltransferase « like » non actif (606 à 798 aa) (Das et al. 2014c).

L'infection de cellules de mammifères par des *Alphavirus* conduit à l'apparition d'effets cytopathiques (CPE) incluant l'arrêt de la transcription de gènes par la dégradation de la sous-unité de l'ARN polymérase II cellulaire (Akhrymuk et al. 2012), l'inhibition de la traduction cellulaire (Gorchakov et al. 2004), la mise en place de conditions de stress au niveau du réticulum endoplasmique (Barry et al. 2010). L'activité NTPase de nsP2 serait responsable de certaines de ces conséquences cytopathiques dans les cellules infectées par CHIKV puisque la dégradation de la sous-unité de l'ARN polymérase II induite par nsP2 est dépendante de cette activité enzymatique selon un mécanisme encore inconnu.

Alors que la protéase de nsP2 des *Alphavirus* ressemble à une « papaïn-like » dont l'activité est liée à la paire cystéine/histidine au niveau du site actif, l'étude de la structure de nsP2 du CHIKV a montré que le couple d'acides aminés impliqué dans le clivage était une cystéine en position 478 et une sérine en position 482 (non caractéristique d'une protéase « papaïn-like »). Cette différence dans le site actif rendrait la protéase du CHIKV plus

efficace pour le clivage de la jonction nsP2/nsP3 par rapport aux autres *Alphavirus* (Saisawang et al. 2015).

NsP2 du CHIKV possède aussi une activité hélicase. Les hélicases sont des protéines motrices qui utilisent l'énergie provenant de l'hydrolyse de nucléosides triphosphates (NTP) ou de désoxynucléosides triphosphates (dNTP) pour séparer deux brins appariés d'un ARN ou d'un ADN. L'hélicase contient deux domaines « RecA-like » constitués de sept motifs. Le premier motif A/GxxxxGKT/S est localisé à l'extrémité d'un feuillet  $\beta$ , avant une hélice  $\alpha$  et est appelée « phosphate loop » ou motif Walker A. Il est responsable de la coordination du  $\gamma$ -phosphate de l'ATP pendant son hydrolyse. Le second motif (xxxxDE) est appelé Walker B. Dans la protéine nsP2 on le retrouve sous la forme  $^{248}\text{VLYVDEAF}^{255}$  dans lequel l'aspartate (D) lie un ion magnésium  $\text{Mg}^{2+}$  et le glutamate (E) est impliqué dans l'hydrolyse de l'ATP (Ye et al. 2004). Un motif  $^{308}\text{SISR}^{312}$  appelée « arginine finger » est aussi présent et permettrait à la protéine de modifier sa conformation lors de la liaison au NTP conduisant alors à l'hydrolyse du nucléoside triphosphate (Scheffzek et al. 1997). La fonction hélicase de nsP2 est ainsi dépendante de l'hydrolyse d'un NTP (préférentiellement l'ATP) et est dépendante de la présence de l'ion  $\text{Mg}^{2+}$  (Das et al. 2014c). Cette activité s'effectue de manière optimale à des températures comprises entre 22 et 27°C pour séparer les duplexes d'ARN ayant une extrémité 5' saillante d'au moins 12 bases et dans le sens 5' vers 3' (Das et al. 2014c).



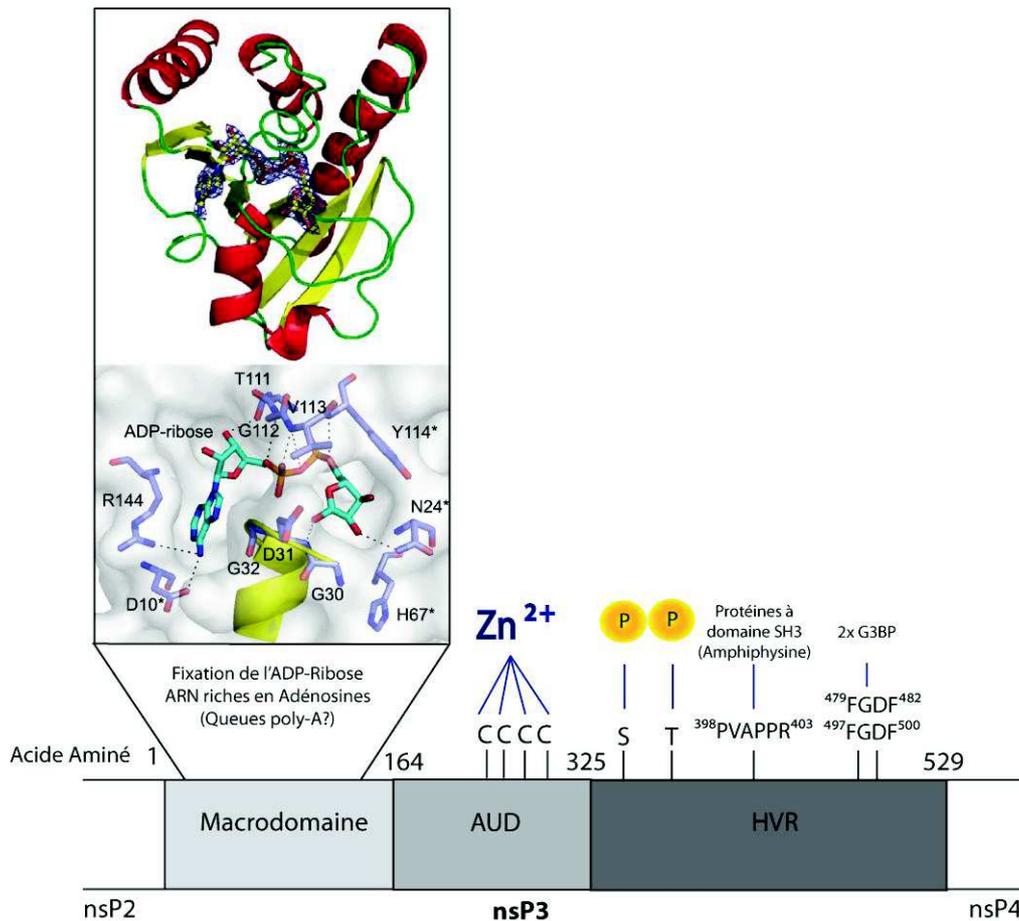
**Figure 16: Domaines et motifs de la protéine multifonctionnelle nsP2.** En vert, les résidus impliqués dans la liaison au NTP (ATP et GTP). En violet, les résidus hydrophobes suivis par le motif les acides aminés caractéristiques du motif Walker B. En rouge, le signal de localisation nucléaire de nsP2.

Hormis ses multiples fonctions intrinsèques, nsP2 est connue pour lier des facteurs cellulaires afin d'établir un contexte intracellulaire favorable à la multiplication virale. En effet, si nsP2 dérégule la transcription de gènes cellulaire grâce à son activité NTPase, elle empêche également l'activation de voies de signalisation menant à l'établissement d'un environnement antiviral (Breakwell et al. 2007) en inhibant la phosphorylation et la translocation nucléaire de Stat1 via notamment sa partie C-terminale et son signal de localisation nucléaire NLS (Fros et al. 2010, Fros et al. 2013a). Nous avons précédemment

évoqué qu'un mécanisme de stress était mis en place au niveau du réticulum endoplasmique à la suite d'une importante concentration de protéines virales traduites non matures dans la lumière de cet organelle. Cette situation conduit la cellule à mettre en place un processus de réponse appelé « unfolded protein response » (UPR) permettant de réduire le stress engendré et d'aider la cellule à survivre. Cependant, si ce processus est maintenu trop longtemps la cellule entre en apoptose (Ron et Walter 2007, Zhang et Kaufman 2008, Iwawaki et al. 2010). NsP2 est capable d'inhiber ce processus UPR et empêche donc la mise en place précoce de la mort cellulaire programmée dans la cellule infectée. Des études d'interactions protéiques, par approche de double hybride, ont permis d'identifier de très probables partenaires cellulaires (Bourai et al. 2012). Parmi eux, des protéines impliquées dans la traduction d'ARN dont la « Poly(A)-binding protein C1 », des sous unités ribosomales RPL4 et RPS6 guidant la traduction des ARN viraux (Montgomery et al. 2006); dans le métabolisme d'ARN hnRNP C, K, U et l'hélicase DDX5; des protéines de filaments intermédiaires, vimentine et protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), des protéines « chaperones » TPR (Bourai et al. 2012) et HSP90 (Das et al. 2014a) et des protéines modifiant le devenir d'autres protéines comme des ubiquitines ligases (UBQLN4) (Bourai et al. 2012).

### 3. nsP3

NsP3 est la plus énigmatique de toutes les protéines nsPs. Aucune activité enzymatique ne lui est actuellement attribuée et aucune structure de la protéine entière n'a été définie. Cette protéine de 530 acides aminés peut être divisée en 3 domaines : Un Macrodomaine, un domaine très conservé chez tous les *Alphavirus* appelé « *Alphavirus Unique Domain* » (AUD) et un domaine hypervariable (HVD) (Figure 17).



**Figure 17: Domaines et motifs identifiés dans nsP3. Le macrodomaine possède une structure en hélice  $\alpha$  et feuillets  $\beta$  (Malet et al. 2009). Le macrodomaine est capable de lier l'ADP ribose et des ARNs. L'Alphavirus Unique Domain (AUD) contient 4 cystéines conservées capables de lier un atome de Zinc. La partie C-terminale ou région hypervariable (HVR) est constituée de nombreuses sérines et thréonines phosphorylées, d'un motif de liaison aux domaines SH3, et de deux motifs capables de lier chacune une molécule de G3BP.**

Les 165 premiers acides aminés de nsP3 présentent des homologies de séquence et de structure avec un module protéique appelé « macrodomaine » retrouvé dans les protéines de procaryotes, d'eucaryotes, d'archées et de virus. Ce module est connu pour lier des composés comme l'ADP-ribose. La liaison de l'ADP-ribose sur le « macrodomaine » de ces protéines permet de réguler de nombreuses étapes cellulaires telles, que la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN, le remodelage de la chromatine (Han et al. 2011), la dégradation protéique (Ullrich et al. 1999) et de moduler les processus de mort cellulaire (Han et al. 2011). Dans le cas du CHIKV, l'obtention de la structure de ce « macrodomaine » (Malet et al. 2009) a permis de confirmer que la partie N-terminale de nsP3 pouvait lier des poly-ADP-riboses (PAR) et des acides nucléiques riches en adénines grâce à des résidus chargés positivement dans ce domaine (Malet et al. 2009). Les conséquences de la fixation de ces molécules ne sont pas encore connues. L'infection par les *Alphavirus* induit une activation de PARP1 (« Poly-ADP-ribose polymérase ») et une augmentation de la synthèse de PAR dans la cellule infectée, entraînant la déplétion d'ATP et l'induction d'apoptose (Nargi-Aizenman et al. 2002). Ainsi, nsP3 pourrait recruter PAR et prévenir la mort cellulaire (Malet et al. 2009). De plus, le macrodomaine, parce qu'il interagit avec les acides nucléiques contenant des

adénines, pourrait lier les ARNs viraux pour les délivrer dans le complexe de réplication (Malet et al. 2009).

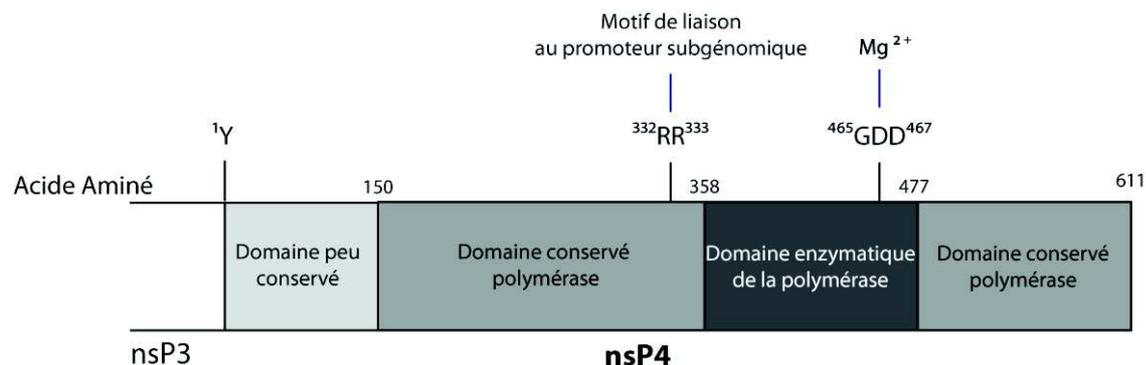
Un autre domaine retrouvé dans nsP3 est celle de l'« *Alphavirus Unique Domain* » située entre les acides aminés 166 à 321. Ce domaine très conservé chez les *Alphavirus* serait important avec le macrodomaine pour la liaison de nsP3 à la protéine nsP1 dans les CRs (Rana et al. 2014). Dans ce même domaine, quatre cystéines conservées chez tous les *Alphavirus* en position 262, 264, 287 et 305 sont impliquées dans la liaison d'un ion  $Zn^{2+}$ . Lorsque ces cystéines sont mutées en alanines l'expression des protéines non-structurales est restreinte et la réplication virale limitée (Shin et al. 2012).

La partie C-terminale de nsP3 (domaine hypervariable : HVR) possède de nombreux résidus proline représentant un frein à la définition de sa structure tri-dimensionnelle. Dans ce même, domaine, des sérines et thréonines sont retrouvées qui pourraient être potentiellement phosphorylées par des sérines/thréonines kinases cellulaires inconnues à ce jour (Li et al. 1990, Peränen et Kääriäinen, Vihinen et Saarinen). Ces phosphorylations pourraient moduler l'interaction de nsP3 avec des protéines cellulaires ce qui aurait pour conséquence la neurovirulence du virus Semliki Forest (Vihinen et Saarinen). L'interaction avec des protéines cellulaires et ce domaine « Hypervariable » de nsP3 est aujourd'hui connue. Ainsi, la protéine, nsP3 du CHIKV peut lier des protéines à motif SH3 grâce à son motif  $^{398}PVAPPR^{403}$  comme par exemple les amphiphysines 1 et 2 (Neuvonen et al. 2011) Il faut rajouter la réf récente sur nsP3 et amphiphysine NMR study. La conséquence de cette interaction au cours de la réplication n'est pas encore connue. Une autre protéine à fonction hélicase, appelée « Ras-GAP SH3 domain-binding proteins » (G3BP) est impliquée dans la formation de granules de stress et également pour lier un motif FGDF présent dans la région hypervariable de nsP3 des *Alphavirus* de l'ancien monde. Ce motif est retrouvé 2 fois dans la partie HVR du CHIKV ( $^{479}FGDF^{482}$ ,  $^{497}FGDF^{500}$  - Figure 17) et permet de lier deux molécules de G3BP (Scholte et al. 2015). Cette liaison serait impliquée dans une étape capitale du cycle de multiplication du virus puisque le recrutement de G3BP régulerait le passage de l'étape de traduction à l'étape de réplication du génome viral (Scholte et al. 2015). Ces interactions protéine-protéines sont les seules à être cartographiées sur nsP3. Toutefois, nsP3 serait aussi capable de lier un grand nombre de protéines cellulaires notamment des protéines de sous-unités ribosomales (RPS3, 8, 9, 10 RPL3, 7, 10 15 18), des protéines impliquées dans la traduction ou dans le métabolisme d'ARN : Des hnRNPs, FRMP1 (fragile X mental retardation 1), DDX5, DHX9, DDX17, EEF2, EEF1A1, Nucléoline (NCL) (Bourai et al. 2012), des protéines du cytosquelette de filaments intermédiaires (Vimentine, Desmine, Plectine) (Bourai et al. 2012). Par l'intermédiaire de ces multiples interactions, nsP3 pourrait permettre de relier le CR du virus aux cofacteurs cellulaires nécessaires à la réplication du génome viral (Frolova et al. 2010, Sreejith et al. 2012) et d'induire la mobilité intracellulaire du CR par l'activation de la voie PI3K-AKT via le domaine C-terminal de nsP3 (Thaa et al. 2015).

#### 4. nsP4

Après la traduction de la polyprotéine, l'auto-clivage de nsP2 va induire tout d'abord le clivage de nsP4 portant l'activité ARN polymérase ARN dépendante dont la fonction est de copier une matrice d'ARN viral de polarité positive en une copie complémentaire d'ARN de polarité négative.

La partie N-terminale de cette protéine de 68kDa est très peu conservée chez les *Alphavirus*, et pourrait être impliquée dans l'interaction de nsP4 avec des partenaires cellulaires. L'identification de ces facteurs cellulaires est rendue particulièrement délicate du fait de la stabilité réduite de nsP4 dans les cellules infectées. La première tyrosine en N-ter entraîne en effet une rapide dégradation de la protéine nsP4 libre dans les cellules (Shirako et Strauss 1998). Pour échapper à cette dégradation, nsP4 interagirait avec les protéines formant le CR. Parmi les partenaires identifiés de nsP4 figurent, comme pour nsP2 et nsP3, des protéines de sous-unités ribosomales : RPS3, RPL6 et RPL18, et G3BP, des protéines impliquées dans la voie des UPRs HSP90AB1 et HSP47, des protéines impliquées dans la transduction de signaux en se liant à des phosphosérines, comme nsP3, 14-3-3 ( $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha/\beta$ ) et des protéines du cytosquelette : tubuline  $\beta$ , Sad1, UNC84, « Domain Containing 2 »(SUN2) (Bourai et al. 2012). Après ce domaine peu conservé on retrouve dans la partie C-terminale le site actif de la polymérase virale où le « motif C » Glycine-Acide Aspartique-Acide Aspartique ( $^{465}\text{GDD}^{467}$  pour le CHIKV-Figure 18), conservé pour toutes les polymérases virales (Kamer et Argos 1984, Koonin 1991) permet de recruter un cation bivalent ( $\text{Mg}^{2+}$ ) nécessaire à l'activité de la polymérase. Des mutations sur ce motif modifiant la préférence pour le  $\text{Mg}^{2+}$  perturbent la capacité de polymérisation de nsP4 (Tomar et al. 2006). Ce cation permet également de coordonner l'activité adénylyltransférase portée par cette extrémité C-terminale et responsable de l'ajout d'une queue polyadénylée à l'extrémité 3' des ARN de polarité positive du CHIKV (Tomar et al. 2006) qui sera ensuite importante pour l'initiation de la synthèse d'un autre ARN de polarité négative au niveau du CSE en partie 3'UTR (Hardy et Strauss 1989). Deux autres résidus (arginine-arginine) identifiés en 2004 dans la séquence de nsP4 du virus Sindbis sont extrêmement conservés chez les *Alphavirus*. Ces deux résidus sont responsables de la liaison de nsP4 au promoteur subgénomique du génome viral (Figure 18)(Li et Stollar 2004). La conservation parmi les *Alphavirus* de la partie C-terminale de nsP4 démontre l'importance de l'activité polymérase, mais aussi potentiellement des interactions avec les différentes protéines du CR. L'utilisation de plusieurs méthodologies d'analyse des interactions (Double hybride, GST pull downs, ELISA) montrent que nsP4 lie nsP1 et nsP2 par sa partie C-terminale (Sreejith et al. 2012) conférant ainsi une proximité du domaine polymérase avec les autres protéines impliquées activement dans la réplication du génome viral. Par ailleurs, nsP4 à l'instar de nsP1 et son domaine méthyltransférase, peut s'homodimériser via son domaine C-terminal (Kaariainen et Ahola 2002).



**Figure 18: Domaines et motifs identifiés dans la protéine nsP4 de CHIKV.** Le domaine N-terminal peu conservé de nsP4 serait impliqué dans la liaison avec des partenaires cellulaires. Le domaine de polymérase (150 à 611) est très conservé parmi les *Alphavirus*. On y retrouve un doublet d'arginine impliqué dans la liaison de la polymérase au promoteur subgénomique. Le site actif de la polymérase, contient le motif GDD liant un atome de magnésium nécessaire pour la polymérisation de l'ARN viral.

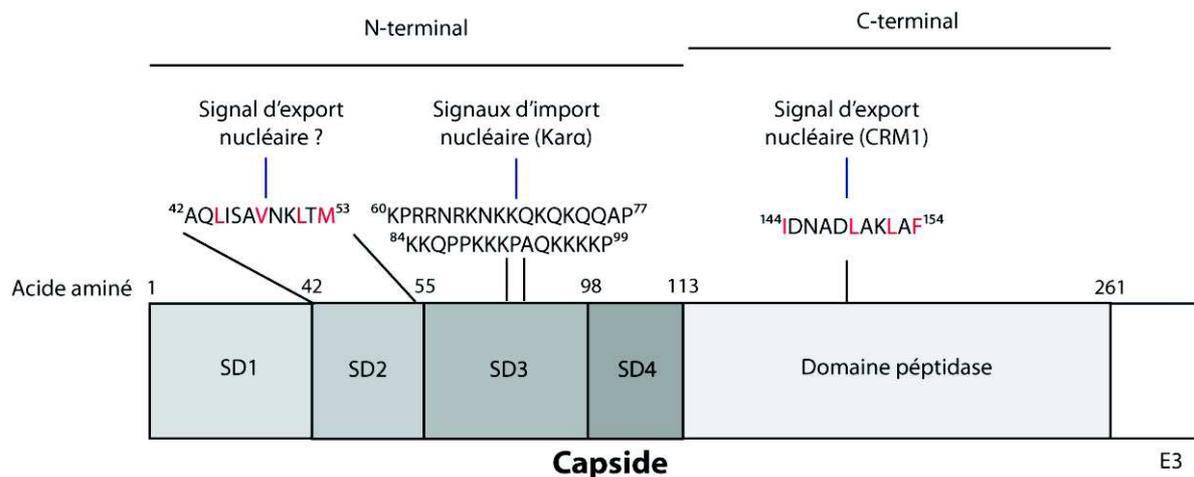
L'ensemble de ces protéines nsPs forme le CR nécessaire à la production de génomes viraux à ARN de polarité positive, mais aussi d'ARNs subgénomiques, à l'origine de la synthèse des protéines structurales. Ainsi, les génomes viraux produits *de novo* pourront être empaquetés par les protéines structurales du virus pour former de nouveaux virions.

### c) Les protéines structurales et leurs partenaires cellulaires

Les protéines structurales du CHIKV ont pour rôle majeur de former une structure protectrice de l'information génétique du virus dans le milieu extracellulaire et de reconnaître par l'intermédiaire de ses protéines d'enveloppe un récepteur spécifique à la surface de la cellule cible (tropisme cellulaire du CHIKV) permettant l'entrée du virus dans la cellule-hôte.

La polyprotéine de 1250 aa produite à partir de la traduction de l'ARN subgénomique contient plusieurs domaines protéiques: Capside-E3-E2-6K-E1. L'activité sérine protéase de la protéine de capsid est située dans sa partie C-terminale: cette activité « chemotrypsin-like » permet à la protéine de capsid de s'autocliner entre le tryptophane 261 et la sérine 262. En effet, c'est grâce à ses deux feuillets  $\beta$  à l'extrémité C-terminal que le tryptophane 261 se retrouve au cœur du site actif de la protéinase (Owen et Kuhn 1997) situé au niveau du motif parfaitement conservé <sup>211</sup>GDSG<sup>214</sup> (Bosco et al. 2010).

#### 1. La protéine de capsid

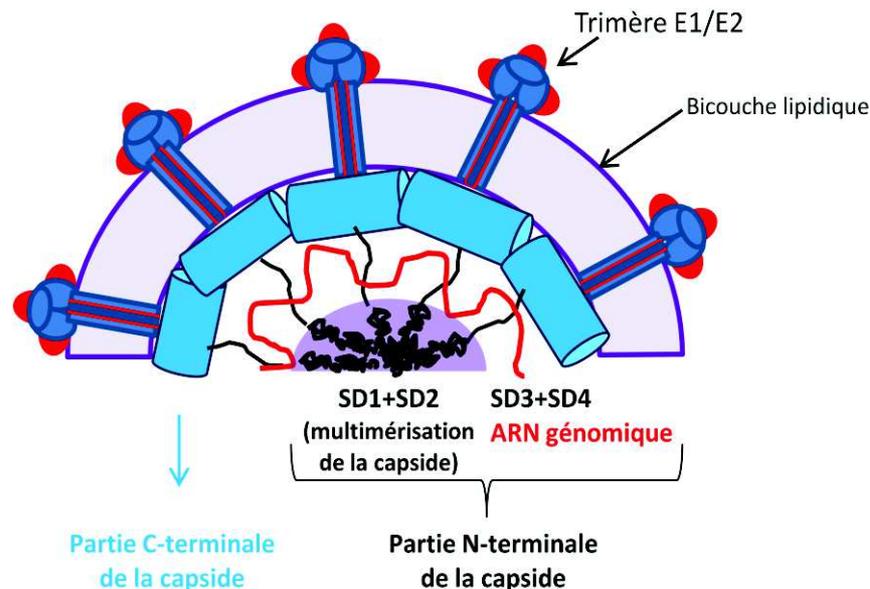


**Figure 19: Régions constituant la protéine de Capsid de CHIKV.** Le sous-domaine 3 contient les signaux de localisation nucléaire (NLS) pris en charge par la Karyophérine  $\alpha$  et permettant l'import nucléaire par l'importine  $\beta$ . Le domaine péptidase ou « chemotrypsin-like », situé en C-ter contient le signal d'export nucléaire (NES) dont les résidus en rouge constituent le motif caractéristique.

Dans sa partie N-terminale, la protéine de capsid présente 4 sous-domaines (SD1-4) impliqués dans les événements tardifs du cycle répliatif des *Alphavirus* l'assemblage et l'encapsidation du génome viral. Comme montré chez le virus Sindbis SD2 contient dans séquence une structure en hélice  $\alpha$ , qui de concert avec SD1, permet une multimérisation de la protéine de capsid (Perera et al. 2001). Les sous-domaines SD3 et SD4, à l'inverse de SD1 et SD2, contiennent des acides aminés chargés positivement qui sont impliqués dans

l'interaction avec le génome viral. Une partie de SD3 et de SD4 reconnaissent, chez SINRV l'ARN génomique et plus particulièrement le signal d'encapsidation situé dans la région 3' codante de nsP1 (Weiss et al. 1994). Ainsi, la partie N-terminale est extrêmement importante dans la prise en charge de l'ARN viral synthétisé par le complexe de réplication (Figure 20).

Si l'encapsidation et l'assemblage sont des étapes essentielles dans le cycle viral, la protéine de capsid de 30kDa joue aussi plusieurs rôles au cours de l'infection par les *Alphavirus*. Sa petite taille la rend possiblement apte à passer, par transport passif du cytoplasme vers le compartiment nucléaire (Thomas et al. 2013). Cependant, la protéine de capsid du CHIKV possède un signal de localisation nucléaire (NLS) bipartite liant l'importine  $\beta$  en sa partie N-terminale et un signal d'export nucléaire (NES) localisé dans la région C-terminale se fixant à l'exportine CRM1 (Thomas et al. 2013) (Figure 19). Il est possible que CHIKV possède un NES supplémentaire caractérisé pour le VEEV au niveau du sous-domaine SD2 (Figure 19) (Nigg 1997). Ces séquences de localisation permettent à la protéine de capsid de CHIKV de naviguer entre le cytoplasme et le noyau de la cellule infectée, mais les conséquences de ce transport ne sont pas connues (Thomas et al. 2013). En revanche, la protéine de capsid du VEEV est décrite comme étant un inhibiteur de l'import/export de protéines aux pores nucléaires en se liant aux importines et exportines bloquant ainsi la fonction des pores nucléaires (Atasheva et al. , Atasheva et al. 2010).



**Figure 20: Schéma des interactions entre les domaines de la protéine de capsid au cours de l'assemblage de la particule de CHIKV. Adapté de Reynaud et al, 2015**

En ce qui concerne les interactions médiées par la protéine de capsid libre avec les protéines cellulaires peu de données existent. Il semblerait toutefois que la protéine de capsid néo-synthétisée puisse interagir avec la sous-unité large des ribosomes 60s (Glanville et Ulmanen 1976, Soderlund et Ulmanen 1977, Wengler et Wengler 1984) et que la liaison de ce composant du ribosome à la protéine de capsid puisse permettre la libération de l'ARN génomique de la particule SFV entrante (Singh et Helenius 1992). Une surexpression de la protéine de capsid dans une cellule de mammifère conduit à la mort de cette dernière, démontrant ainsi le caractère cytotoxique de cette protéine (Judith et al. 2013). Un des mécanismes de défense de la cellule ou de maintien de la viabilité cellulaire par le virus est la

mise en place d'un système d'autophagie permettant de contrôler les niveaux de cette protéine toxique pour la cellule (Judith et al. 2013). Par ailleurs, il semble que la protéine de capsid puisse être ubiquitinylée dans la cellule infectée par le CHIKV, cette modification post-traductionnelle permettrait une prise en charge par la protéine « récepteur-cargo » p62 qui pourrait entraîner sa dégradation dans des autophagolysosomes (Judith et al. 2013).

## 2. Les glycoprotéines d'enveloppe

Après libération de la protéine de capsid par clivage protéolytique, la polyprotéine constituée de pE2-6K-E1 expose en N-terminale une séquence signal de translocation dans le réticulum endoplasmique (Garoff et al. 1990) (Figure 21) où s'effectuera la maturation de la polyprotéine. Cette séquence est constituée de résidus non chargés et hydrophobes pour la plupart (von Heijne 1985) formant une hélice  $\alpha$  (Emr et Silhavy 1983, Briggs et al. 1985) capable de s'insérer dans la membrane du réticulum endoplasmique avec un groupement carbohydrate sur une asparagine (Garoff et al. 1990). Une fois liée à cet organite, la partie N-terminale se retrouve dans la lumière du RE où la première asparagine est glycosylée par ajout d'oligosaccharides riches en mannose (Sefton 1977, Garoff et al. 1990). La partie C-terminale de pE2 des *Alphavirus*, localisée dans le cytoplasme, contient un peptide signal « signal recognition particle » qui permet la translocation de la protéine 6K et celle de E1 (Melancon et Garoff 1986). Les signaux de translocation sont clivés dans la lumière du RE par la signalase et conduit à la formation de trois protéines transmembranaires pE2, 6K et E1 (Garoff et al. 1990). Depuis le RE, les protéines d'enveloppe repliées et glycosylées (Sefton 1977, Wen et Schlesinger 1986) et formant des hétérodimères pE2-E1, vont emprunter la voie de sécrétion des protéines vers l'appareil de Golgi. Comme montré chez le virus Sindbis, avant d'atteindre l'appareil de Golgi, les cystéines de la glycoprotéine E1 seront palmitoylées (Bonatti et al. 1989). Après migration depuis la partie *Cis* à la partie *Trans* de l'appareil de Golgi, un transport polarisé (surface apicale ou basolatérale selon le type cellulaire) (Nitsch et al. 1985, Zurzolo et al. 1992) les glycoprotéines du virus sont transportées vers la membrane plasmique. Au cours de ce transport, pE2 est clivée en E2 et E3 par la protéase cellulaire furine. E2 et E1 s'associeront en hétérotrimères pour former 80 spicules du virus (Fuller 1987). Le rôle précis de la protéine E3 n'est pas connu, mais permettrait d'induire le repliement nécessaire de E2 pour l'assemblage viral (Parrott et al. 2009) et protégerait E1 des pH acides des vésicules de la voie de sécrétion (Fields et Kielian 2015).

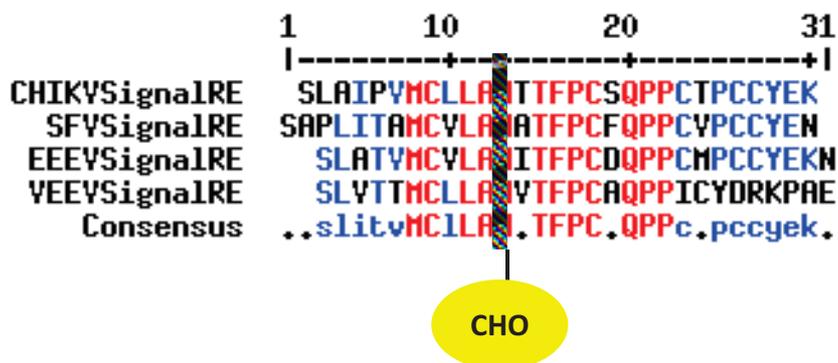


Figure 21: La séquence de l'extrémité N-terminale de la polyprotéine structurale libérée de la protéine de capsid présente une séquence conservée impliquée dans la translocation vers le réticulum endoplasmique. Encadré en jaune, l'asparagine conservée liant un carbohydrate. La séquence conservée est indiquée en rouge. Les séquences de l'extrémité N-terminale de la polyprotéine structurale de la protéine de capsid des virus de l'ancien monde Semliki Forest (GenBank: AKA67123) Chikungunya (GenBank :AID69223.1), et de deux virus du nouveau monde, VEEV (GenBank: AAU89533), EEEV (GenBank: AMT80321) ont été alignées avec le site Multalin (INRA-Toulouse).

La glycoprotéine E2 est responsable de l'attachement de la particule virale au récepteur, encore non identifié, de la cellule cible qui permettrait d'endocyter le virus par une voie clathrine dépendante (Helenius et al. 1980, Bernard et al. 2010, Kielian et al. 2010). Lorsque la particule virale se retrouve dans un endosome acidifié par la fusion avec des lysosomes, E2 et E1 se dissocient (Wahlberg et al. 1989, Wahlberg et Garoff 1992) entraînant la libération de la boucle de fusion hydrophobe de E1 qui peut alors s'insérer dans la membrane de l'endosome (Harrison 2008, Kielian 2014). La glycoprotéine E1 forme alors un homo-trimère permettant à l'enveloppe du virus et à la membrane de l'endosome de fusionner et ainsi de libérer le génome viral. Si la glycoprotéine E2 est nécessaire pour les premières étapes de l'infection d'une cellule, la glycoprotéine E1 est essentielle pour la fusion de la membrane lipidique de l'endosome avec celle du virus (Gay et al. 2012).

Peu d'études d'interactions entre les glycoprotéines d'enveloppe et les protéines cellulaires ont été publiées à ce jour. Une étude de prédiction informatique d'interactions (Rana et al. 2013) identifie certains facteurs impliqués dans le transport intracellulaire (Dudha et al. 2015).

### **3. La protéine 6k**

Du fait de sa petite masse moléculaire de 6 kDa, la protéine a été nommée 6k. Cette protéine acylée et riche en cystéines palmitoylées possède deux domaines hydrophobes dont l'un permet la translocation de E1 vers le réticulum endoplasmique (Gaedigk-Nitschko et al. 1990, Solignat et al. 2009). La protéine 6k en induisant le transport/maturation des glycoprotéines virales serait importante pour l'assemblage et bourgeonnement des *Alphavirus* (Liljestrom et al. 1991, Lusa et al. 1991, McInerney et al. 2004). Les propriétés physico-chimiques de la protéine 6k ont permis d'élaborer l'hypothèse selon laquelle cette protéine formerait un canal permettant l'échange d'ions. Appelés « viroporine » ces canaux permettraient d'augmenter la perméabilité membranaire (Sanz et al. 1994, Melton et al. 2002, Antoine et al. 2007). La fonction de ces pores formés à la membrane n'est pas encore exactement connue, mais la délétion de la protéine 6k entraîne une mauvaise dissociation du virus bourgeonnant à la cellule. Il est possible que la perméabilisation par la viroporine permette de changer localement le potentiel membranaire et de promouvoir le bourgeonnement viral (Taylor et al. 2016). De plus, une délétion partielle de la partie codante pour 6K entraîne un défaut dans la maturation des glycoprotéines et peut être complétée par la protéine Vpu du VIH (Gonzalez et Carrasco 2001), révélant soit le rôle de 6k, soit de la protéine suivante TransFrame.

### **4. La protéine « TransFrame » (TF)**

Une des stratégies utilisées par certains virus pour coder plusieurs protéines à partir d'une même séquence d'ARN est le décalage du cadre de lecture. Le CHIKV et les autres *Alphavirus* utilisent ce mécanisme pour permettre la synthèse d'une protéine d'environ 8kDa (8,7kDa pour le CHIKV) est appelée Protéine « TransFrame » (TF). Le rôle de cette protéine n'est pas encore connu. La protéine TF pourrait être palmitoylée, associée aux membranes et incorporée dans les virions à une stoechiométrie plus importante que la protéine 6K (Firth et al. 2008).

Les protéines structurales résultant du clivage de la polyprotéine structurale ou d'un décalage de cadre de lecture permettent de former de nouveaux virions infectieux.

## **2) Le cycle de multiplication du virus Chikungunya**

### **a) L'entrée du CHIKV dans sa cellule cible**

Comme l'ensemble des *Alphavirus*, l'entrée du CHIKV dans la cellule hôte et le processus de fusion membranaire sont facilités par les glycoprotéines virales E1 et E2. La glycoprotéine E2 permet l'attachement de la particule virale à un récepteur cellulaire et la glycoprotéine E1 facilite la fusion des membranes grâce à l'acidification de l'environnement de la particule virale endocytée (Solignat et al. 2009, Voss et al. 2010).

De nombreux récepteurs putatifs ont été identifiés comme facilitant l'entrée de RRV (virus Ross River), SFV, SINV, VEEV, toutefois aucun d'entre eux ne semble correspondre aux récepteurs de ces virus. La première étude publiée sur le virus Sindbis démontre que l'utilisation d'un anticorps dirigé contre une protéine de 63kDa diminue de 50% l'infection dans des fibroblastes embryonnaires de poulet et n'affecte pas l'infection de cellules de hamster BHK (Wang et al. 1991). Ces travaux suggèrent que le SINV pourrait utiliser plusieurs récepteurs selon la nature des cellules (poulet ou hamster). Dans des cellules de mammifère, le blocage des récepteurs de laminine avec un anticorps neutralisant ne permet plus au SINV de se fixer à la surface des cellules. En sur-exprimant les récepteurs de laminine, Wang et collaborateurs observent une augmentation de la fixation du virus aux BHK de 4,6 fois (Wang et al. 1992). Le virus Sindbis utilise ainsi différents récepteurs pour infecter des cellules d'origines aviaires ou de mammifères. Il semble que ce même récepteur de laminine puisse être également utilisé par VEEV (Malygin et al. 2009). Dans la famille des lectines de type-C, protéines se liant aux glycanes par un domaine de reconnaissance de carbohydrates et de manière calcium dépendante, les DC-SIGN et L-SIGN permettraient la liaison à la glycoprotéine E2 de SINV et permettraient son entrée dans ses cellules cibles (Klimstra et al. 2003). En effet, des macrophages dérivés de monocytes THP-1 ne sont pas sensibles au SINV, cependant si l'on induit l'expression de DC-SIGN ou L-SIGN par transfection, les cellules deviennent alors sensibles à l'infection (Klimstra et al. 2003). Les récepteurs de la famille TAM (TYRO3-AXL-MER), et notamment TYRO3 et AXL peuvent également agir en tant que facteur d'attachement des *Alphavirus*. En effet, ces deux récepteurs tyrosine kinases lient le facteur protéique Gas6, lui-même fixant des phosphatidyl-sérines des virus enveloppés (Linger et al. 2008, Mercer 2011, Meertens et al. 2012). Dans le cas du CHIKV plusieurs récepteurs ont été proposés il s'agit de : la prohibitine et les glycanes pour les cellules de mammifères (Wintachai et al. 2012, Silva et al. 2014) et la sous-unité  $\beta$  de l'ATP synthase pour les cellules du moustique (Fongsaran et al. 2014).

Suite à la fixation du CHIKV sur sa cellule cible, le virus pénètre dans la cellule par un mécanisme d'endocytose (Solignat et al. 2009). Les voies d'endocytoses empruntées par le CHIKV sont discutées puisque certaines études démontrent, que dans des cellules de moustiques C6/36, les cellules de Singe BS-C-1, ou les cellules humaines HeLa, le mécanisme d'endocytose utilisé est clathrine-dépendant (Lee et al. 2013, Ooi et al. 2013, Hoornweg et al. 2016) alors que pour d'autres cellules, comme les HEK293T, le processus d'endocytose est clathrine-indépendant et EPS15-dépendant (Bernard et al. 2010). Ces différences suggèrent que le CHIKV peut utiliser plusieurs mécanismes d'endocytose ce qui

est déjà largement décrit pour d'autres virus. Après cette étape, le CHIKV se retrouve dans un endosome précoce contenant le marqueur Rab5 (Solignat et al. 2009, Bernard et al. 2010). C'est dans ce compartiment acidifié des cellules de mammifères, que la fusion des membranes s'effectue sous la dépendance du cholestérol et de la tetraspanine 9 grâce aux changements conformationnels de la glycoprotéine E1 (Bernard et al. 2010, Hoornweg et al. 2016, Stiles et Kielian 2016) alors que dans les cellules de moustique, ce sont les endosomes tardifs qui sont requis pour cette étape (Lee et al. 2013). Ce processus de fusion semble très rapide puisque 50% des particules virales du CHIKV fusionnent en 102 secondes après internalisation dans les cellules de singe BS-C-1 (Hoornweg et al. 2016).

## **b) La traduction des protéines non-structurales virales**

L'ARN génomique viral libéré dans le cytoplasme est considéré par la cellule infectée comme un ARN messager cellulaire parce qu'il arbore en 3' une queue polyA et en 5' une coiffe (Strauss et Strauss). Le mécanisme de traduction de l'ARN génomique entrant des Alphavirus n'est pas décrit dans la littérature scientifique mais de par ses caractéristiques proches des ARNm cellulaires, il pourrait être apparenté à celui emprunté par les ARNm coiffés et polyadénylés. Un ARNm coiffé est reconnu par la phosphoprotéine eIF4E présente dans un complexe d'initiation de la traduction eIF4F composé de l'hélicase à fonction ATPase eIF4A, de la phosphoprotéine eIF4G et de Poly(A)-Binding Protein (PABP) (Gingras et al. 1999). Ce complexe facilite ensuite le recrutement des facteurs eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3 et eIF5 liés à la sous-unité 40S ribosomale et à un Met-tRNA<sub>i</sub> pour lire les triplets de base lors de leur entrée au site P de la sous-unité 40S et pour trouver le complémentaire de l'anticodon de Met-tRNA<sub>i</sub>, le codon d'initiation AUG. Dès que ce complexe d'initiation reconnaît le codon AUG, le GTP fixé à eIF2 permettant la liaison de ce dernier avec le Met-tRNA<sub>i</sub> est hydrolysé de manière irréversible. Eif2 lié au GDP et les protéines eIF1, 3 et 5 du complexe d'initiation sont libérées et la sous-unité large des ribosomes (60S) est recrutée avec eIF5B lié au GTP pour former le complexe d'initiation de la traduction 80S. Une fois les deux sous-unités 40S et 60S jointes en une entité 80S, eIF1A et eIF5B lié au GDP sont à leur tour libérées et la phase d'élongation peut commencer (Figure 22). Cette voie d'initiation de synthèse des protéines à partir de l'ARN messager est caractéristique d'une traduction dite « canonique ».

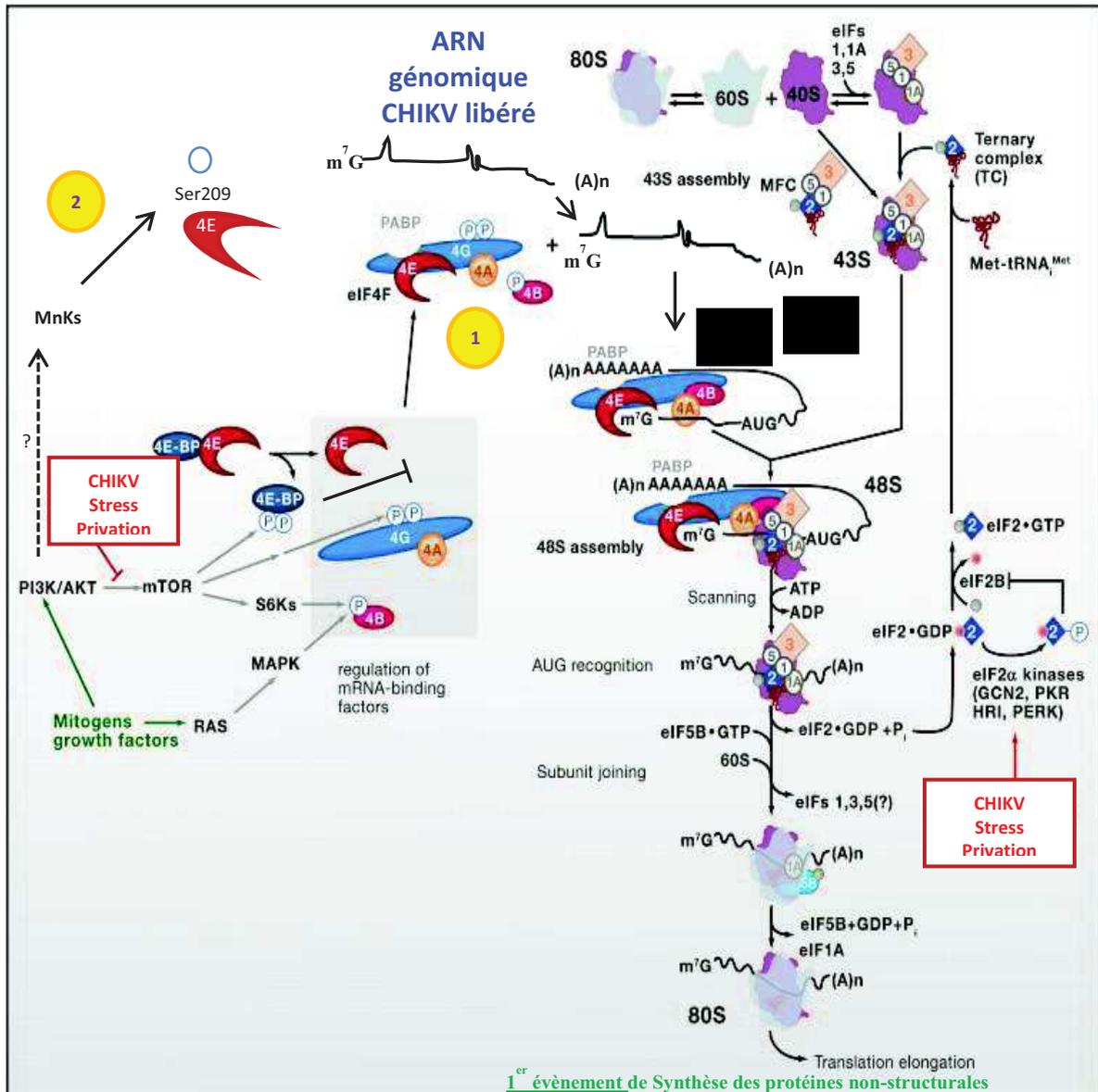


Figure 22: Schéma des différentes étapes de la traduction coiffe dépendante d'un ARN, adapté pour la traduction du génome CHIKV entrant. Le complexe d'initiation de la traduction eIF4F s'assemble autour de la coiffe de l'ARN viral libéré dans le cytoplasme de la cellule infectée. Le virus inhibe la voie mTOR et induit la phosphorylation de la sérine 209 du facteur eIF4E qui modifierait sa capacité à lier les coiffes portées par les ARN en 5'UTR (2). Les *Alphavirus* induisent la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , empêchant ainsi eIF2B de coupler eIF2 avec le GTP et donc de promouvoir l'association de l'ARNt-Met avec la sous-unité ribosomale 43S. Adapté de Sonenberg et Hinnebusch, 2009.

L'infection par le CHIKV entraîne l'inhibition de mTORC1 et l'activation de la PI3K qui conduisent à l'hyperphosphorylation d'eIF4E sur la sérine 209 de manière MAP kinase-activated protein kinase (MnKs) dépendante (Joubert et al. 2015). L'inhibition de mTORC1 et la phosphorylation d'eIF4E ont pour conséquence une diminution de la synthèse protéique de la cellule hôte, mais une augmentation de la traduction des protéines virales du CHIKV (Joubert et al. 2015) (Figure 22). La phosphorylation d'eIF4E sur la sérine pourrait diminuer la capacité de cette protéine à se lier à la coiffe en 5' des ARN (Scheper et Proud 2002, Khan et Goss 2004) et permettrait une diminution de la traduction de certains ARN messagers. Pendant l'élongation de la protéine naissante, les triplets de codons sont reconnus dans le site A du ribosome (pour Aminoacyl-ARNt) grâce à l'ARN de transfert aminoacylé apporté par le facteur eEF1A. Le peptide en synthèse situé au site P (pour peptidyl-ARNt) est transféré au

site A en formant une liaison peptidique avec l'acide aminé apporté au site A. Une translocation du ribosome, catalysée par le facteur d'élongation eEF2 permet le passage de l'ARNt déacétylé du site P vers le site E (« Exit ») et l'ARNt libre de l'acide aminé du site A vers P. l'ARN viral passe donc à travers le ribosome permettant au site A de recevoir un nouvel aminoacyl-ARNt complémentaire au nouveau triplet de codon. L'élongation continuera jusqu'à l'apparition d'un codon de stop. Le premier codon stop que retrouvera le ribosome sur l'ARN génomique se situe à la jonction nsP3/nsP4 pour certaines souches du CHIKV (Schuffenecker et al. 2006) (Figure 23).

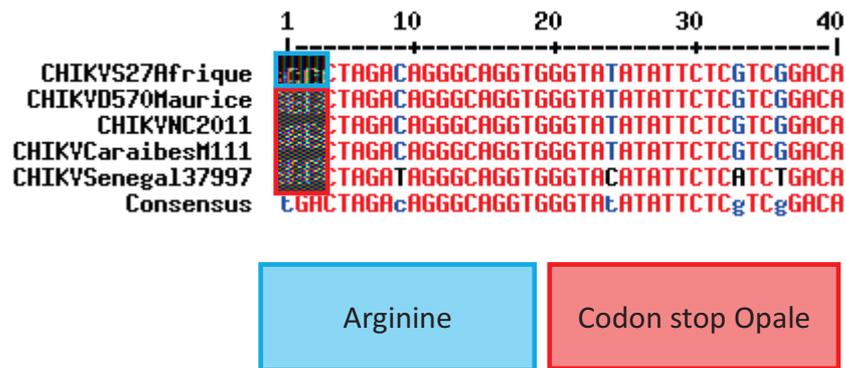
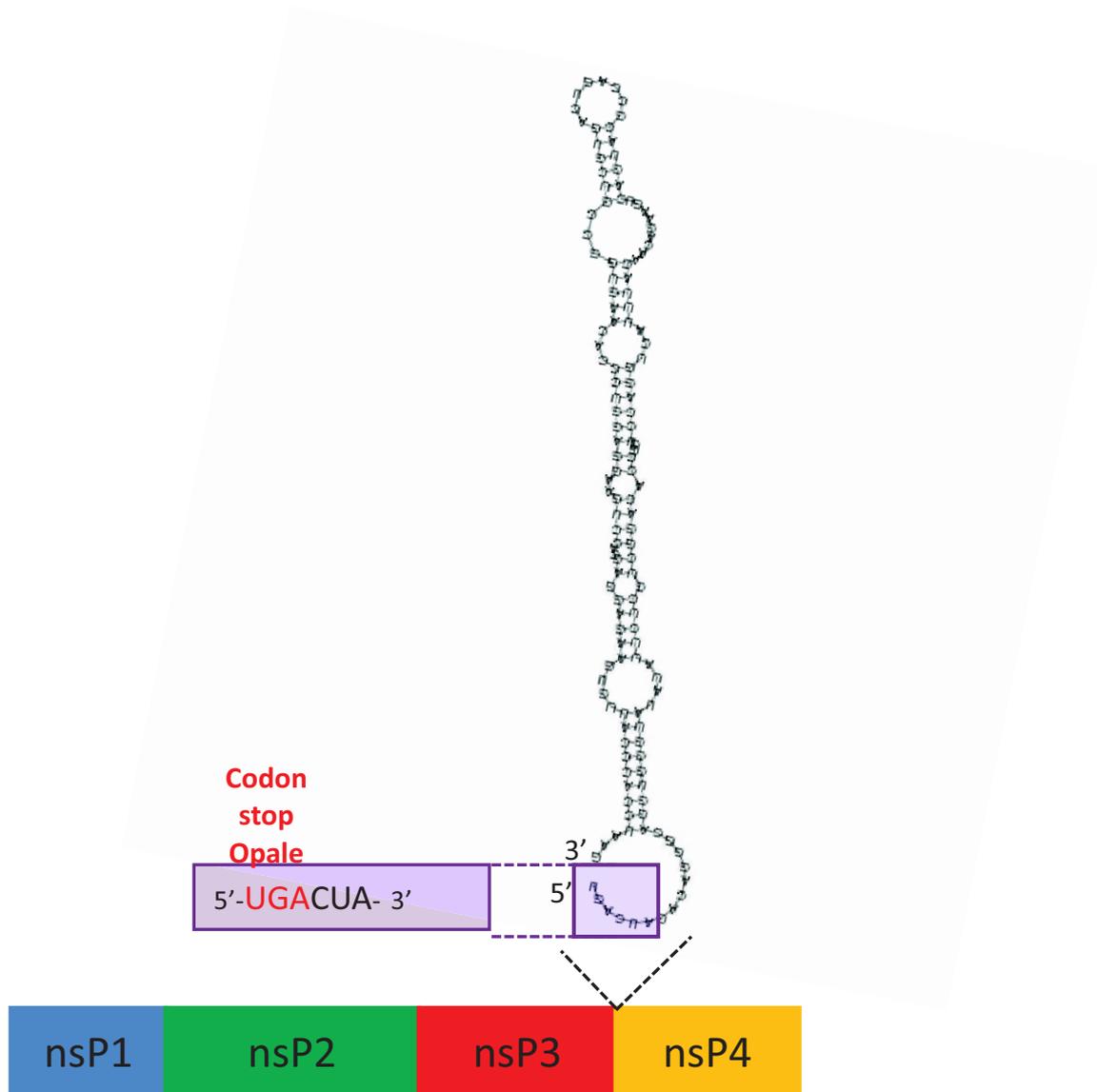


Figure 23: L'alignement des séquences de la jonction nsP3/nsP4 montre l'apparition d'un codon stop opale dans certaines souches du CHIKV. Les séquences de la jonction nsP3/nsP4 de deux souches de la lignée ECSA de CHIKV (S27 (GenBank: AF369024.2) et isolée à l'île Maurice (D570/06 : GenBank: EF012359.1)), de deux souches de lignée asiatique (isolées en Nouvelle-Calédonie (NC/2011-568 : GenBank: HE806461.1) et aux Caraïbes (GenBank: LN898112.1) et d'une souche de la lignée d'Afrique de l'Ouest (Sénégal, 37997 : GenBank: AY726732.1) ont été alignées avec l'aide du logiciel Multalin (INRA-Toulouse). Le cadre bleu surligne le triplet de nucléotides codant pour une arginine et le rouge encadre le codon correspondant et codant pour un codon stop de type opale. Dans l'ARN T=U.

Ce type de codon stop, appelé « opale » (UGA), apparaît suite à une mutation « non-sens » (Brenner et al. 1967) et conduit à la formation d'une polyprotéine plus courte nsP123. Cependant, un mécanisme d'élongation non canonique permet au virus de synthétiser son ARN polymérase essentielle à la réplication du génome viral. En effet, un mécanisme de « saut de codon » s'effectue grâce à un motif particulier présent chez le CHIKV : le codon stop UGA doit être suivi par le triplet CUA et d'une structure secondaire en 3' (Figure 24) (Firth et al. 2011, Naphthine et al. 2012). La structure secondaire présente en aval du codon stop opale permet de multiplier par 10 les chances de saut de codon permettant (Firth et al. 2011), de synthétiser de manière contrôlée la protéine nsP4. Dans le cas du virus O'nyong nyong, ce codon stop opale permettrait d'abaisser la production virale mais en revanche d'établir une infection plus persistante. La diminution de la réplication du génome viral préviendrait la reconnaissance des ARNs viraux limitant la mise en place d'une réponse antivirale (Myles et al. 2006).

Enfin, le complexe traductionnel reconnaît un codon stop en fin de séquence de nsP4 et libère la polyprotéine nsP1234 qui peut alors exercer sa fonction dans la cellule infectée.

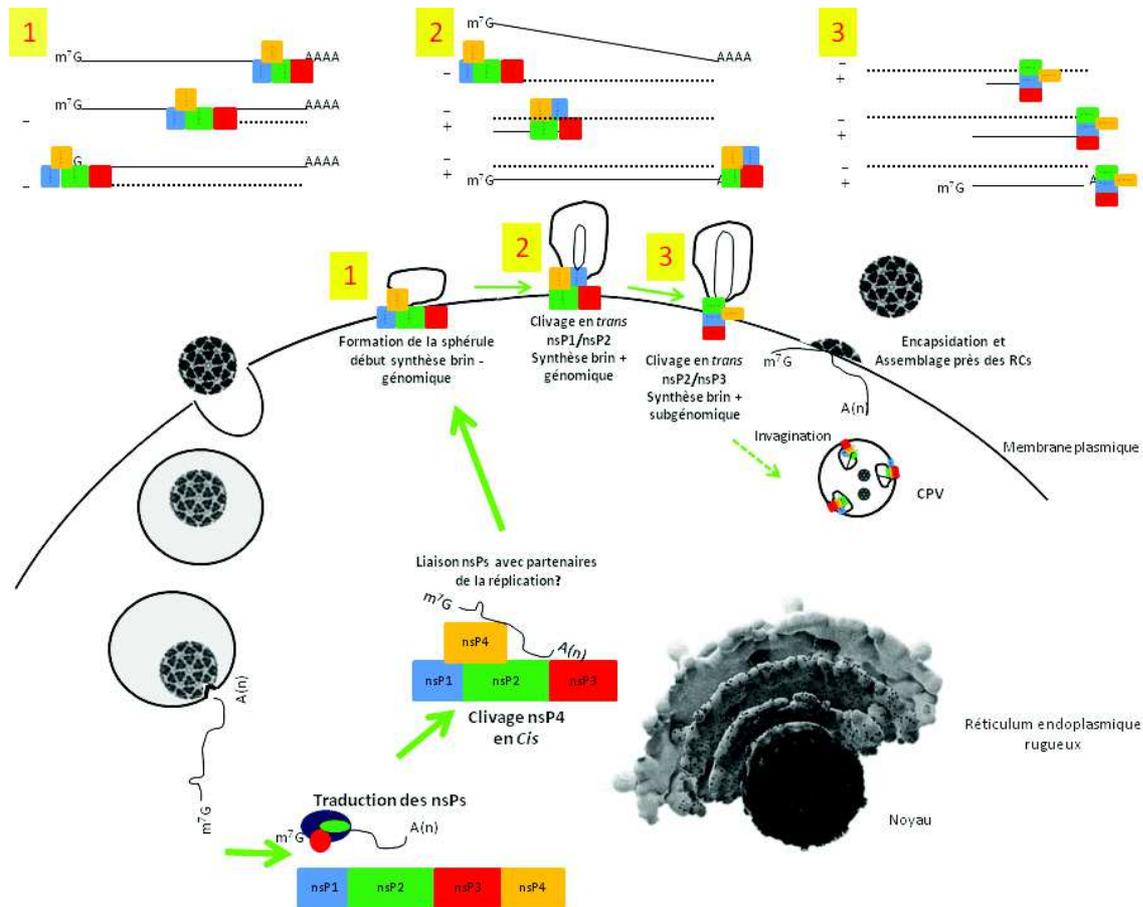


**Figure 24:** La jonction nsP3/nsP4 du CHIKV peut contenir un codon stop opale suivi d'une structure secondaire permettant le saut du codon. La structure secondaire de la jonction nsP3/nsP4 d'une souche de la lignée ECSA (île Maurice, D570/06 : GenBank: EF012359.1) a été prédite grâce au logiciel RNA-Fold

### c) La réplication du CHIKV

Une fois traduite, la polyprotéine non-structurale nsP1234 doit subir une maturation afin de permettre la formation d'un Complexe de réplication (CR) actif. Ce dernier est alors constitué de l'association des nsPs dans une conformation favorable à la fonction répliquative et au recrutement de partenaires cellulaires participant à la réplication du génome viral (Shirako et Strauss 1994). Le premier événement de maturation de cette polyprotéine est le clivage en *cis* de la jonction nsP3/nsP4 par nsP2 contenu dans la même polyprotéine (de Groot et al. 1990, Takkinen et al. 1991). L'association de nsP4 avec nsP1 et nsP2 (Rana et al. 2014) de la polyprotéine nsP123 permet de synthétiser plusieurs brins de polarité négative à partir de l'extrémité 3' de la matrice ARN à polarité positive. (Lemm et al. 1994, Shirako et

Strauss 1994, De et al. 1996). L'accumulation de la polyprotéine nsP123 conduit rapidement au clivage en *trans* de la jonction nsP1/nsP2 séparant nsP1 de nsP23 formant un complexe actif et stable pour la synthèse d'ARNs génomiques de polarité positive mais très peu d'ARNs subgénomiques (Lemm et al. 1994, Shirako et Strauss 1994). Ce n'est qu'après le clivage en *trans* de nsP23 que des ARNs subgénomiques sont synthétisés de manière efficace et en excès par rapport aux ARNs génomiques grâce au complexe de réplication formé alors des protéines individualisées nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4 (Figure 25) (Lemm et al. 1994, Shirako et Strauss 1994).



**Figure 25: Modèle des différentes étapes de la réplication du CHIKV.**

Les sphérules répliquatives formées à la membrane plasmique (Frolova et al. 2010, Spuul et al. 2010) peuvent ensuite être internalisées par endocytose dans de larges vacuoles de quelques centaines de nanomètres à 2µm appelées « vacuoles cytopathiques » (CPV) (Figure 25). L'invagination des complexes de réplication serait dépendante de l'activation de la voie « Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt » (Spuul et al. 2010, Thaa et al. 2015). Il a été proposé que nsP3 permettrait l'internalisation des complexes de réplication de SFV depuis la membrane plasmique (Salonen et al. 2003). Cette hypothèse a été vérifiée et validée par une récente étude démontrant que la partie hypervariable de nsP3 de SFV, et notamment les 50 premiers acides aminés de ce domaine hyperphosphorylé entraîne la phosphorylation de la protéine Akt et l'activation de mTOR (Thaa et al.). Il semble qu'il soit nécessaire que nsP3 soit située à la membrane plasmique pour que la phosphorylation de la sérine/thréonine kinase Akt ait lieu. Cela serait possible lors de la présence des protéines du complexe de réplication nsP1, nsP2 et nsP3, alors que nsP4 et les protéines structurales ne seraient pas nécessaires (Panas et al. 2015). Cette activation d'Akt intervient également mais de manière plus limitée pour le CHIKV, en effet, la protéine nsP3 de CHIKV induit 3 fois plus de phosphorylation

d'Akt (Panas et al. 2015). Le transport de ces vacuoles fusionnant avec des lysosomes est dépendant des éléments du cytosquelette, notamment de l'actine en zone péri-corticale et des microtubules dans le cytoplasme de la cellule. Il est admis que nsP3 lie des protéines du cytosquelette, notamment la vimentine, ou des myosines (Frolova et al. 2006). Ces dernières sont connues pour faciliter la translocation de vésicules d'endocytose depuis la périphérie des cellules (Aschenbrenner et al. 2003, Hasson 2003). Il est ainsi possible que nsP3 joue un rôle majeur dans la formation et le transport des vacuoles cytopathiques chez les *Alphavirus*. Ce mécanisme de transport des CRs n'aurait pas d'effets sur la synthèse d'ARNs viraux (Frolova et al. 2010, Spuul et al. 2010), mais pourrait conduire à un rapprochement de l'ARN viral protégé dans ces sphérules aux protéines impliquées dans la traduction (Panas et al. 2015) ou aux protéines virales structurales en maturation dans le réticulum endoplasmique rugueux pour permettre l'encapsidation de l'ARN viral et la formation de nouveaux virus.

#### **d) La traduction des protéines structurales**

L'ARN subgénomique synthétisé dans les étapes tardives du cycle de multiplication viral est seulement porteur du deuxième cadre de lecture codant les protéines structurales du virus. Ilya Frolov et Sondra Schlesinger ont montré que les ARN subgénomiques de SINV, SFV arboraient une structure en tige-boucle dans la séquence codante pour la capsid, en aval du codon initiateur AUG et permettant d'augmenter la synthèse de la polyprotéine structurale (Frolov et Schlesinger 1996). Comme montré dans la figure 22 (Page 39), les infections par les *Alphavirus* et CHIKV notamment, induisent une phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  par la voie PERK (PKR-like ER resident Kinase). En effet, un des mécanismes de défense en réponse à la réplication intensive d'un pathogène cellulaire et surtout à la traduction intensive dans le compartiment du réticulum endoplasmique rugueux des protéines structurales des *Alphavirus* par exemple est la mise en place d'un état de stress au niveau de cet organite appelé « UPR » « Unfolded Protein Response ». Cette voie permet de maintenir l'homéostasie des protéines cellulaires et d'empêcher l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du réticulum endoplasmique, entravant les fonctions de cet organite (Tardif et al. 2005). Une protéine centrale dans cette voie est GRP78 (aussi appelée BIP ou HSC70) qui, en conditions de stress, est retenue par des protéines non ou mal repliées dans la lumière du réticulum où elle entraîne l'activation de PERK, ATF-6 et IRE-1 (Bertolotti et al. 2000). Comme la Protéine Kinase R activée, PERK activée, s'homodimérise, s'autophosphoryle et phosphoryle la sérine 51 du facteur d'initiation eIF2 $\alpha$  conduisant à l'inhibition de la synthèse protéique dans la cellule. Ainsi, cet état de stress est néfaste pour la traduction des protéines virales et, dans le contexte d'infection par les *Alphavirus*, ce mécanisme serait dû à la synthèse des protéines structurales (McInerney et al. 2005, Ventoso et al. 2006). Pour promouvoir la traduction des protéines structurales, en partant du fait qu'eIF2 $\alpha$  phosphorylée bloque la traduction de messagers au codon d'initiation AUG en empêchant la formation du pré-complexe d'initiation de traduction constitué notamment de la sous-unité 40s ribosomale avec la méthionine-ARNt et donc son recrutement au complexe eIF4F, les virus SFV et SINV utilisent la structure en tige-boucle riche en G:C pour initier la traduction de la polyprotéine structurale selon un mécanisme encore obscur (Ventoso et al. 2006). Le virus du Chikungunya ne contient pas cette structure et serait donc *a priori* sensible à cette inhibition. Cependant, ce virus a développé un autre moyen pour promouvoir cette traduction : la protéine nsP4 produite peut empêcher la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  par un mécanisme encore inconnu

(Rathore et al. 2013). Si la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  est un évènement inhibiteur de la traduction des protéines non-structurales virales (Ventoso et al. 2006) et que les *Alphavirus* ont évolué pour faire face à cet obstacle pour la traduction de la polyprotéine structurale, cela suggère que l'organisation de la machinerie traductionnelle n'est pas la même pour la traduction de l'ARN génomique permettant l'expression des NsPs par rapport à celle qui permettrait d'exprimer les protéines de structures à partir de l'ARN subgénomique. Effectivement, l'ARN subgénomique du virus Sindbis peut être traduit en l'absence de certains facteurs d'initiations tels eIF4G, eIF2, PABP1 et même indépendamment de codons différents de l'AUG aux abords du complexe de réplication du virus (Sanz et al. 2009). Tous ces éléments, encore très peu étudiés permettent de penser que les *Alphavirus* ont élaboré des stratégies pour modifier le système de traduction de la cellule afin de concentrer l'initiation de la traduction des protéines structurales par une voie non canonique.

Une autre facette de la traduction non canonique présent dans ce cadre de lecture est la traduction de la protéine TransFrame grâce à un décalage du cadre de lecture. Ce mécanisme permet, grâce à une séquence particulière et une structure secondaire généralement en 3', de synthétiser de nombreuses protéines à partir d'une même séquence et a d'abord été mis en évidence chez le rétrovirus du sarcome de Rous pour la production de la polyprotéine Gag-Pol à partir des cadres de Gag et de Pol (Jacks et Varmus 1985, Jacks et al. 1988). Le décalage de cadre chez CHIKV est lié à la présence d'une séquence U\_UUU\_UUA et à des éléments en 3' à identifier puisqu'aucune structure secondaire d'ARN n'est prédite dans cette partie du génome. En tout état de cause, les ribosomes en traduction de la partie N-terminale de la protéine 6K, reconnaissent durant 10% des évènements de lecture-traduction ce motif et reculent d'un nucléotide. L'élongation reprend avec des lectures de codons modifiés et la protéine TransFrame est synthétisée par décalage du cadre initial en -1.

La traduction de l'ARN subgénomique semble donc induire un stress dans la cellule submergée par la production de polyprotéines structurales virales engorgeant le réticulum endoplasmique rugueux. Ce phénomène accentue une dérégulation du métabolisme cellulaire déjà amorcée par le recrutement de facteurs par le complexe de réplication et la liaison de protéines non-structurales libres avec d'autres effecteurs cellulaires garants de l'intégrité et de la survie de la cellule. Les macromolécules virales sont ainsi la cause de modifications profondes et néfastes dans la cellule, et ces conséquences sont appelées « effets cytopathiques ».

### **e) Assemblage et bourgeonnement des virions CHIKV**

Les étapes d'assemblage et de bourgeonnement sont cruciales dans le cycle de multiplication du CHIKV puisqu'elles consistent en l'encapsidation de l'ARN génomique et la formation de nouveaux virions. Malgré leur importance, les mécanismes conduisant à la formation des particules CHIKV sont inconnus et aucune publication ne démontre le processus d'assemblage et de bourgeonnement de CHIKV. Solignat et collaborateurs ont présenté pour la première fois des images de BHK21 et HEK293T infectées par CHIKV prises par microscopie électronique et présentant des bourgeonnements de particules virales près des complexes de réplication viraux à la membrane plasmique ou dans des vacuoles cytopathiques (Solignat et al. 2009). Cette caractéristique suggérerait que l'ARN génomique synthétisé pourrait rester protégé jusqu'aux dernières étapes de multiplication virale, et qu'il existerait peut-être un rôle des protéines du complexe de réplication dans la formation de nouveaux virions CHIK. En effet, un mécanisme de restriction du bourgeonnement de

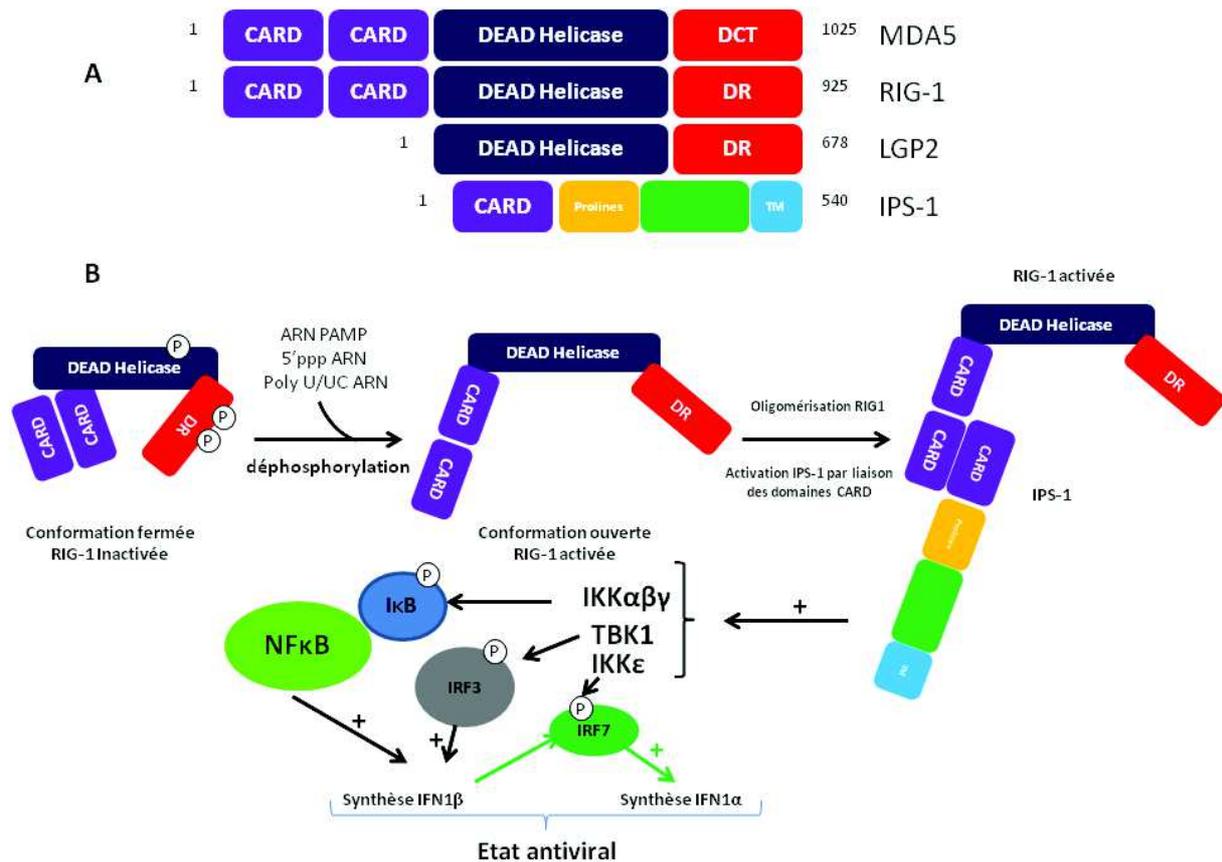
CHIKV par BST-2 (*Bone Marrow Stromal antigen 2*), commun avec les rétrovirus VIH-1 et 2, MLV et le *Filoviridae* Ebola, a été identifié par Jones et collaborateurs (Neil et al. 2007, Kaletsky et al. 2009, Goffinet et al. 2010, Jones et al. 2013). La protéine nsP1 inhiberait l'expression de BST-2 à la membrane plasmique de la cellule infectée selon un mécanisme à déterminer (Jones et al. 2013).

## f) Les réponses cellulaires à la réplication et les effets cytopathiques

### 1. Les réponses cellulaires liées à la réplication

Au cours de l'infection et de la réplication, les acides nucléiques viraux sont reconnus par des molécules du système immunitaire inné comme des motifs étrangers nommés « Pathogens Associated Molecular Patterns » (PAMPs) (Goubau et al. 2013). La reconnaissance de ces PAMPs par des senseurs cellulaires entraînent la production d'effecteurs capables de limiter la réplication du virus. Ainsi, la réplication du virus du Chikungunya produit des duplexes d'ARNs pouvant être potentiellement reconnus par différents récepteurs de type Toll like (TLR3), et par différentes hélicases spécialisées dans les voies de signalisation induisant la synthèse d'interféron comme MDA5 « melanoma differentiation factor 5 », LGP2 « laboratory of genetics and physiology-2 ou DHX58 », et RIG-1 « retinoic acid-inducible gene 1 » (Figure 26) (Takeuchi et Akira 2010, Wilkins et Gale 2010, Kumar et al. 2011, Loo et Gale 2011). Cependant, les *Alphavirus* limitent la reconnaissance des structures formées par l'intermédiaire de réplication (le brin -) apparié avec sa matrice (le brin +) grâce à la séquestration de ces duplexes au sein de la sphérule refermée au niveau d'un pore refermé par les protéines nsP1-4 (Frolova et al. 2010). La détection des ARNdb est donc un phénomène contrôlé chez les *Alphavirus* mais existant (Bernard et al. 2015). Un rôle du Toll like receptor 3 (TLR3) dans la détection de duplexes d'ARNs de CHIKV dans les compartiments endosomaux a été décrit. En effet, le récepteur TLR3 serait important dans la mise en place de défenses innées en activant également la synthèse d'interféron via l'activation d'IRF3 (Priya et al. 2014) et sa déplétion entraînerait une augmentation de la réplication virale et à l'aggravation des effets pathologiques qui en découlent (Her et al. 2014). De plus, des études démontrent que MDA5 est le détecteur préférentiel de PAMPs d'*Alphavirus* (Burke et al. 2009, Akhrymuk et al. 2016) alors que d'autres avancent que RIG-1 peut également reconnaître les acides nucléiques du virus CHIKV (Schilte et al. 2010). Akhrymuk et collaborateurs ont montré très récemment que les deux « Pattern recognition receptors » (PRRs) MDA5 et RIG-1 pouvaient induire de façon concomitante une signalisation induite par la présence des acides nucléiques et que seule leur co-inhibition empêche la mise en place d'un état antiviral (Akhrymuk et al. 2016). Il est possible que les deux hélicases agissent de manière synergique puisque leurs cibles exactes diffèrent : RIG-1 reconnaît habituellement les extrémités 5' triphosphorylés de duplexes d'ARN génomique ou des structures secondaires d'ARN riches en A-U à cette extrémité 5'ppp (Hornung et al. 2006, Myong et al. 2009) alors que MDA5 se lie à de longs dsRNA (>1000bp ; mimés par des Poly I:C synthétiques) sans aucune spécificité structurale aux extrémités de l'acide nucléique (Hornung et al. 2006, Kato et al. 2006, Pichlmair et al. 2006). Dans le cas du virus Chikungunya, Sanchez David et ses collaborateurs viennent de démontrer que RIG-1 peut effectivement reconnaître les séquences riches en A-U (formant des structures secondaires) dans l'ARN CHIKV mais en partie 3' (Sanchez David et al. 2016). La reconnaissance par le domaine C-terminal de RIG-1 entraîne une déphosphorylation de l'hélicase et son changement de sa conformation fermée à ouverte. La structure « ouverte » de RIG-1 lui permet de s'oligomériser et d'interagir avec IPS-1, grâce à leurs domaines CARD, située aux membranes mitochondriales et péroxysomales. Cette liaison permet ensuite

l'activation des kinases IKK et TBK1 qui activeront respectivement à leur tour NF- $\kappa$ B et IRF3 (Yoneyama et al. 2004). La protéine NF- $\kappa$ B activée et IRF3 phosphorylée sur la sérine 398 sont transloquées dans le noyau où elles vont permettre l'expression d'interféron 1- $\beta$ . Cette molécule synthétisée et sécrétée va, par un système autocrine, se lier à son récepteur IFNAR activant ainsi la voie JAK/STAT conduisant à la phosphorylation de STAT1 capable alors de promouvoir la synthèse d'autres ISGs comme notamment la protéine IRF7. Cette dernière, une fois activée par phosphorylation par IKK $\epsilon$ , permettra à la cellule de synthétiser l'interféron 1- $\alpha$  (Figure 26).



**Figure 26:** Schéma de la structure de 4 RLRs et de la cascade d'activation de synthèse d'interféron médiée par RIG-1. Les RLRs sont composés de domaines CARD (caspase activation and recruitment domain) en N-terminal (sauf LGP2), d'un domaine DEAD box hélicase (DEAD helicase) avec activité ATPase et d'un domaine C-terminal (DCT) chez MDA5 et dans lequel se situe un domaine répresseur (DR) chez RIG-1 et LGP2 impliqué dans leur autorégulation. IPS-1, ne contient pas de domaine hélicase mais une région riche en prolines et d'un domaine transmembranaire en C-terminal impliqué dans sa liaison avec les membranes mitochondriales et péroxisomales.

Les hélicases MDA5 et RIG-1 ne sont pas les seules molécules à reconnaître les acides nucléiques viraux répliquatifs. La réplication du virus Chikungunya a montré une activation de la Protéine Kinase R (PKR), reconnaissant elle aussi les duplexes d'ARN grâce à sa partie N-terminale. L'activation grâce à la dimérisation de PKR conduit à la phosphorylation de la sous-unité  $\alpha$  d'eIF2, tout comme PERK, mais aussi à l'induction de GADD34. GADD34 est une phosphatase qui permet une déphosphorylation d'une population d'eIF2 $\alpha$  afin d'autoriser la traduction de cytokines, d'interféron suite à la reconnaissance de duplexes d'ARN (Clavarino et al. 2012). Cette phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  par la PKR interviendrait également dans les granules de stress dont les conditions de formation suite à l'infection CHIKV sont encore méconnues. Cependant, IPS-1 activée par RIG-1 et MDA5, peut à son tour activer PKR (Zhang et al. 2014) et induire la formation de granule de stress où eIF2 $\alpha$  peut être

phosphorylée et les facteurs d'initiation de la traduction sont séquestrés. Une autre possibilité décrite par Reineke et Lloyd est l'activation de la PKR par l'hélicase G3BP1 dans les granules de stress puisqu'ils trouvent une interaction directe entre G3BP1 et la PKR essentielle pour la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (Reineke et Lloyd 2015).

Pour résumer, l'infection et la réplication par CHIKV produits des acides nucléiques pouvant être reconnus par des récepteurs de Type « Toll Like » ou des hélicases cellulaires. Ceux-ci peuvent alors entraîner leur signalisation, pour mettre en place un état antiviral capable d'inhiber la traduction des protéines virales et la réplication virale. Ces mécanismes sont liés à l'apparition de granules de stress, à la synthèse de cytokines et d'interférons. Cependant, le virus du Chikungunya a su développer des mécanismes moléculaires afin de contrecarrer l'installation de cet environnement néfaste à sa réplication aux dépens même de la cellule hôte.

## 2. Les effets cytopathiques liés à l'infection

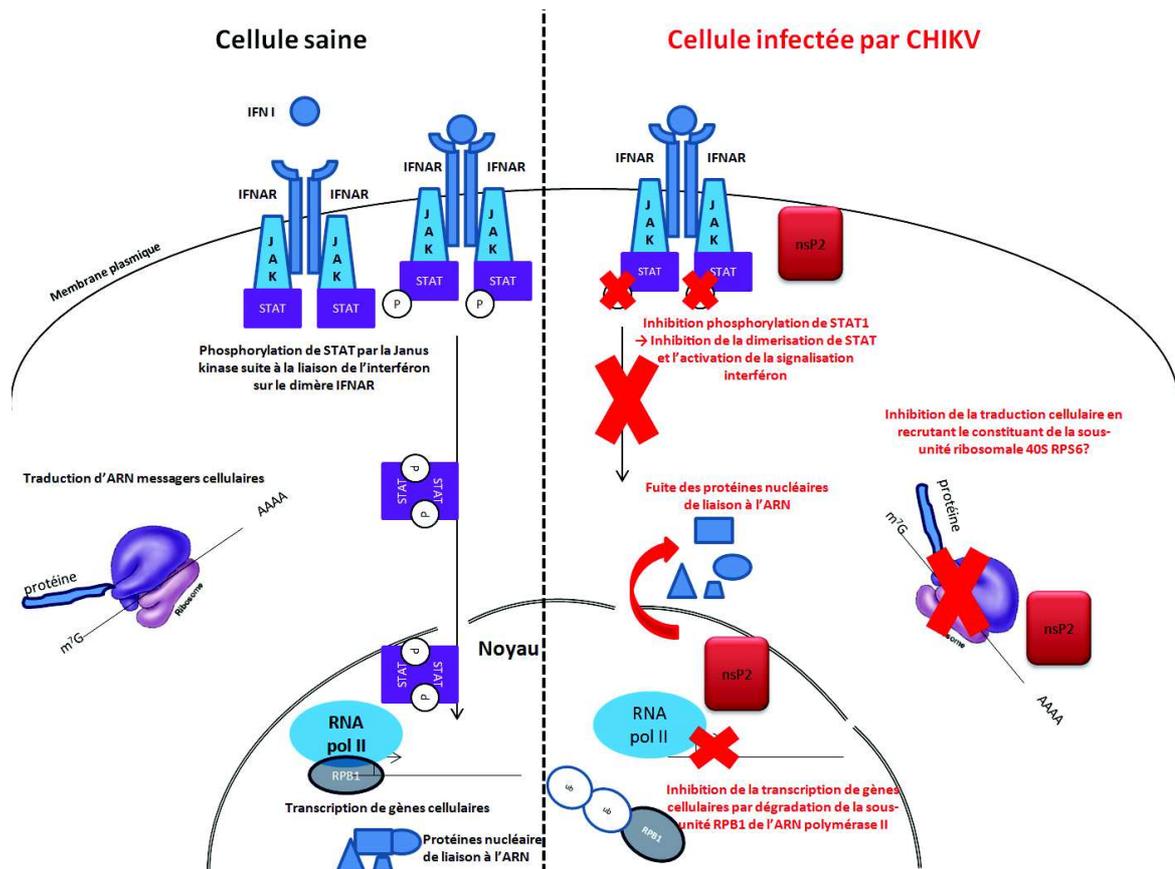
La traduction de la polyprotéine non-structurale et sa maturation conduit *in fine* à la libération des protéines nsP1, nsP2, nsP3, nsP4 dans le cytoplasme de la cellule. Chacune d'elles peut alors cibler d'autres protéines et voies de signalisation cellulaires pour empêcher la cellule d'interférer avec la réplication du génome viral, et créer un environnement favorable à la multiplication du virus en détournant les outils moléculaires cellulaires dont il a besoin.

La protéine virale reconnue pour entraîner tous ces effets est nsP2. L'hélicase virale synthétisée est retrouvée dans le compartiment cytoplasmique et dans le compartiment nucléaire grâce à son NLS identifié en position 647-651 (Figure 16- Page 28). Ce NLS présent chez tous les *Alphavirus* à l'exception du VEEV (Rikkonen et al. 1992) et permet à la protéine nsP2 d'être transloquée dans le noyau de manière efficace puisque les mutations des résidus KR649-650 retiennent la protéine virale dans le cytoplasme (Tamm et al. 2008, Fros et al. 2013b). L'effet cytopathique de nsP2 est grandement lié à sa localisation nucléaire puisqu'une mutation du NLS réduit la cytopathogénicité (Tamm et al. 2008). C'est en effet dans le noyau que nsP2 va induire une inhibition très importante de l'expression des gènes cellulaires. En plus de l'arrêt de la traduction d'ARNm cellulaires et la liaison de nsP2 à RPS6 formant la sous-unité 40S du ribosome (Montgomery et al. 2006), nsP2 va empêcher la transcription des gènes en provoquant la dégradation de la sous-unité de l'ARN polymérase II, Rpb1 (Akhrymuk et al. 2012). Ceci entraîne un arrêt d'expression de gènes au niveau transcriptionnel et traductionnel. De plus, nsP2 serait responsable de la fuite nucléaire de protéines liant les ARNs et, parmi elles, se trouvent des protéines importantes dans l'épissage d'ARN pré-messagers (Pinol-Roma et Dreyfuss 1992, Akhrymuk et al. 2012). Leur fuite pourrait donc empêcher l'épissage d'ARNm cellulaires et donc ensuite leur traduction cytoplasmique. Ainsi, trois étapes de l'expression de gènes cellulaires pourraient être régulées par nsP2 dans la cellule : La transcription, l'épissage, et la traduction).

L'infection et la réplication du virus Chikungunya entraîne la sécrétion d'interféron de type 1 dans le milieu extracellulaire. L'IFN1 signale par un effet paracrine d'autres cellules de la présence du pathogène afin de mettre en place des mécanismes bloquant différentes étapes de multiplication virale (traduction, réplication par exemple) ou de manière autocrine pour amplifier cette réponse dans la cellule infectée. En effet, l'interféron de type 1 se fixe sur le récepteur à l'interféron  $\alpha/\beta$  (IFNAR) oligomérisé permettant l'activation des Janus Kinases (JAK). S'en suit aussitôt le recrutement des protéines *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT 1-3) qui vont être phosphorylées sur un résidu tyrosine leur accordant la possibilité de se dimériser et migrer dans le noyau pour activer la transcription d'autres

*Interferon-Stimulated Genes* (ISGs). L'hélicase des *Alphavirus* peut empêcher cette voie en bloquant la phosphorylation de STAT1 par un mécanisme encore méconnu et donc limiter les réponses innées qui empêcheraient la multiplication virale (Figure 27) (Frolova et al. 2002, Breakwell et al. 2007, Simmons et al. 2009, Fros et al. 2010).

Suite à l'arrêt de l'expression de gènes, la cellule infectée par le CHIKV voit son ADN fragmenté et son noyau se condenser, ses protéines Poly-ADPribose polymérase clivées entraînant une perte majeure de NTPs, ses mitochondries perdent leur potentiel membranaire (Abraham et al. 2013). Tous ces événements conduisent la cellule infectée à entrer dans un processus irréversible de mort cellulaire, en apoptose.



**Figure 27: Schéma des effets cytopathiques causés par l'infection du virus Chikungunya.** A gauche, une cellule non infectée sensibilisée à l'interféron de type 1 montre la voie de signalisation JAK/STAT, le maintien de la transcription de gènes et la traduction de protéines cellulaires. A droite, une cellule infectée par CHIKV dans laquelle nsP2 bloque la phosphorylation de STAT1 et la translocation de du dimère de STAT vers le noyau, la transcription de gènes en induisant la dégradation de la sous-unité de l'ARN polymérase II RPB1. NsP2 prévient la traduction de protéines cellulaires en liant des protéines de la sous-unité 40S du ribosome et nsP2 entraîne également la fuite de RNPs du noyau vers le cytoplasme.

Le virus du Chikungunya ne produit que des ARNs à partir de son génome à ARN. Pour assurer sa réplication, le virus doit alors recruter, et utiliser des protéines cellulaires se fixant spécifiquement à ce type d'acide nucléique. De plus, l'initiation de la synthèse de l'ARN négatif est initiée à partir de la dernière cytosine précédant la queue poly-adénylée de l'ARN génomique, et sa synthèse se termine en 3' avec une guanosine supplémentaire non appariée (Wengler et al. 1979, Hardy 2006a). Les extrémités des duplexes d'ARN réplcatifs présentent alors des extrémités 3' saillantes qui font que nsP2, une hélicase à extrémité 5' dépendante, est dans l'incapacité d'initier la séparation des brins d'ARN (Das et al. 2014c). Il faudrait donc que des cofacteurs cellulaires impliqués dans la séparation des doubles brins d'ARN

soient recrutés au complexe de réplication du génome viral pour assister nsP2 dans l'initiation de ce mécanisme.

## **D. Réplication virale et formation des complexes de réplication**

Les virus à ARN de polarité positive constituent plus d'un tiers des genres viraux et sont la cause de différentes pathologies chez l'Homme, les animaux et les plantes (Knipe et Howley 2007). Suite à l'entrée de ces virus, l'ARN génomique viral libéré dans le cytoplasme est considéré comme un ARN messager cellulaire, en conséquence la première étape du cycle de multiplication de ces virus correspond à un événement de traduction permettant la synthèse sous forme de polyprotéines qui seront par la suite clivées pour donner soit à la fois les protéines non structurales et structurales (*Picornaviridae*, *Flaviviridae*); soit uniquement les protéines non structurales (*Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Togaviridae*, *Coronaviridae*, *Arteriviridae*). Après avoir synthétisé les protéines non-structurales, dans le cas des *Togaviridae*, le génome viral sert de matrice pour permettre la formation d'une molécule d'ARN (-). Cet ARN(-) est alors utilisé pour synthétiser de nouveaux génomes viraux de polarité (+), mais également pour donner naissance, grâce à une étape de transcription, un ARN subgénomique à l'origine de la synthèse d'un précurseur polyprotéique qui permettra l'obtention des protéines structurales après clivage. Cette étape de réplication s'effectue intégralement dans le cytoplasme de la cellule infectée. Cependant, comme il a été vu précédemment, pour échapper aux molécules responsables de la reconnaissance de PAMP et plus spécifiquement ici, la détection d'ARN double brins intermédiaires de réplication, (Romero-Brey et Bartenschlager 2014), ces virus ont évolué pour protéger les étapes de réplication dans des compartiments spécifiques, dérivés de diverses membranes cellulaires.

### **1) Utilisation des membranes cellulaires pour la formation des complexes de réplication**

La plupart des étapes de la réplication de ces virus ARNs (+) (*Picornaviridae*, *Flaviviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Togaviridae*, *Coronaviridae*, *Arteriviridae*) s'effectuent en étroite collaboration avec des membranes d'organites cytoplasmiques ou de la membrane plasmique. Ces réarrangements correspondent soit à des invaginations, soit à des protrusions membranaires créant une « niche » répliquative à la surface des constituants cellulaires. Les modifications de la topologie membranaire et leur localisation cytoplasmique dépendent de la famille virale.

#### **a) Localisation intra-cytoplasmique des complexes de réplication**

##### **1. Diversité de localisation des complexes de réplication intra-cytoplasmiques**

Dans le cytoplasme cellulaire, certains organites comme le réticulum endoplasmique, la mitochondrie et les lysosomes sont la source de membranes extensibles et ré-arrangeables. Ces assemblages lipidiques sont ainsi préférentiellement utilisés par les virus pour abriter leurs complexes de réplication. A la fois les *Flaviviridae*, (HCV et les Arbovirus Dengue et

Zika), mais aussi les Coronaviridae effectuent la réplication de leur génome dans des compartiments membranaires issus du réticulum endoplasmique (Grief et al. 1997, Snijder et al. 2006, Knoops et al. 2008, Romero-Brey et al. 2012, Hamel et al. 2015). A ce niveau-là, des déformations membranaires conduisant à la production d'un réseau de vésicules à double-membranes de 150 nm de diamètre pour HCV ou de vésicules invaginées de 80 à 120 nm chez les *Flavivirus*, sont retrouvés dans le RE. Pour ce qui est du Poliovirus (*Picornaviridae*), cette étape s'effectue dans des vésicules à double-membranes de 100 à 300 nm issues de déformations des membranes de l'appareil de Golgi (Bienz et al. 1983, Schlegel et al. 1996). Enfin, dans le cas du virus d'insecte Flock House, le plus étudié des *Nodaviridae*, celui-ci réplique son génome dans des invaginations provenant de la membrane externe mitochondriale, et formant des sphérules de 50 nm de diamètre connectées au cytoplasme par un canal de 10 nm de diamètre permettant le passage des ribonucléotides et l'export des ARNs synthétisés (Kopek et al. 2007, Lanman et al. 2008) (Figure 28).

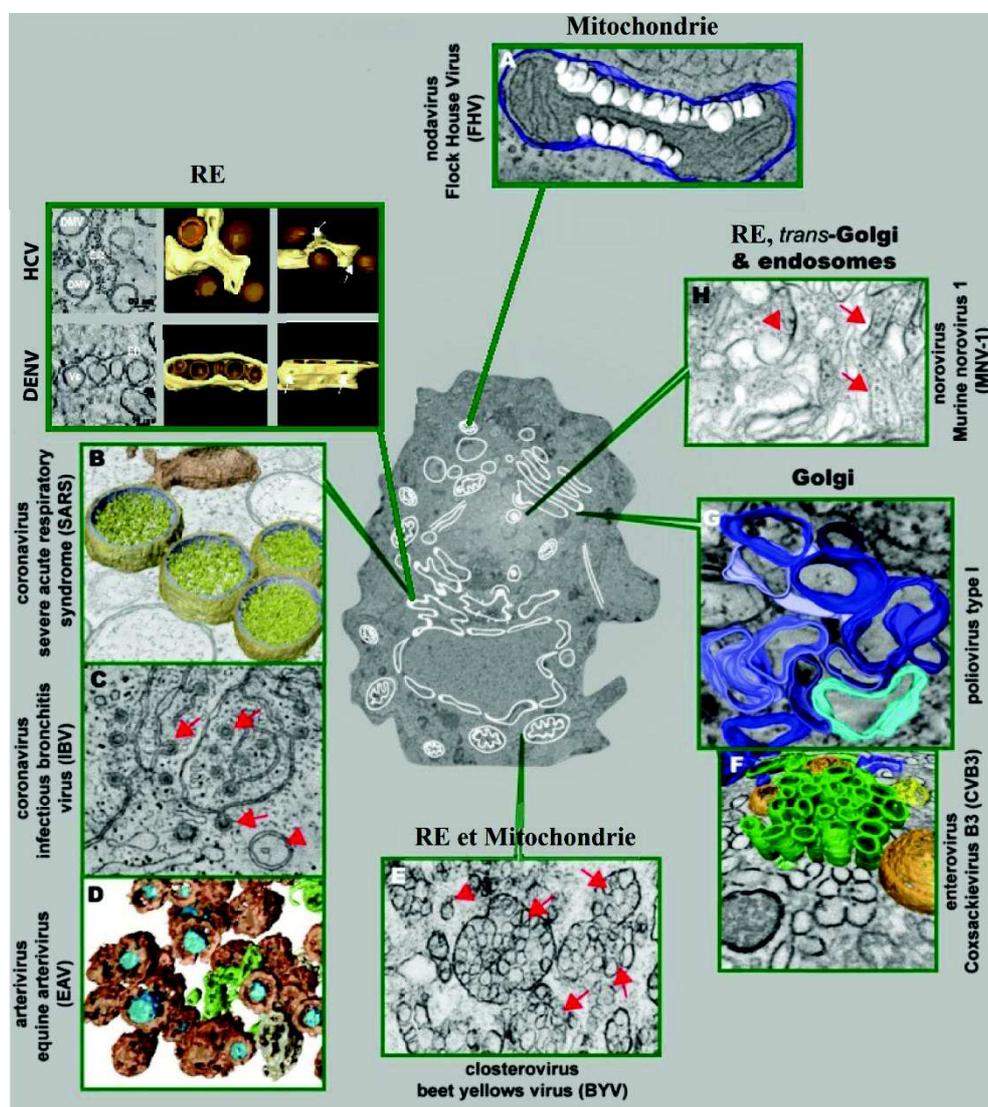
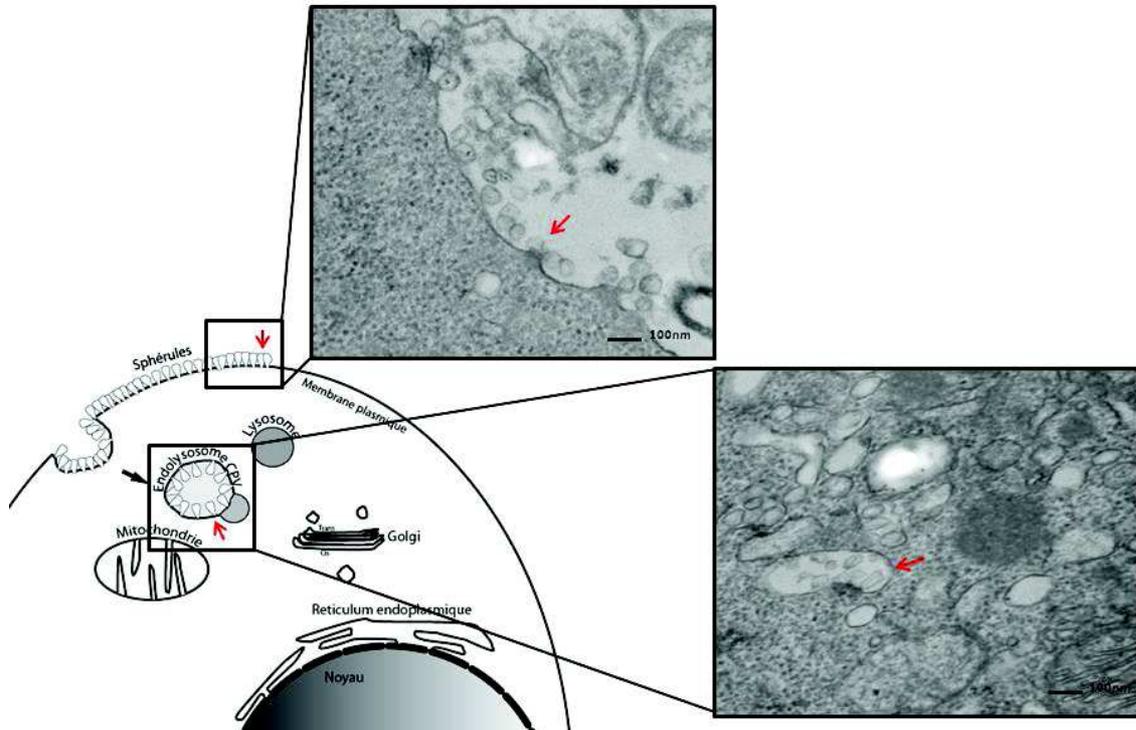


Figure 28: Complexes de réplication dans des compartiments membranaires issus d'organites cytoplasmiques. RE= Réticulum endoplasmique. Adapté de Romero-Brey et Bartenschlager, 2014.

La littérature scientifique ne présente que peu d'informations quant à la structure et l'organisation des complexes de réplication du virus Chikungunya, mais des études

concernant des *Alphavirus* proches de CHIKV peuvent permettre de donner des informations potentiellement transposables. Friedman et ses collaborateurs démontrent que l'ARN du virus Semliki Forest incorpore l'adénosine et l'uridine tritiés au niveau de membranes lisses cytoplasmiques (Friedman et al. 1972). Les travaux de Gomatos confirment 8 ans plus tard en effet que le complexe de réplication de SFV est retrouvé à ces membranes (Gomatos et al. 1980). D'une manière générale, les complexes de réplication du virus Semliki Forest, du virus Sindbis et du virus Chikungunya sont initialement formés à la membrane plasmique de la cellule infectée sous la forme de déformations membranaires extracellulaires appelées « sphérules » (Kopek et al. 2007, Welsch et al. 2009, Gillespie et al. 2010) de 50 à 70 nm de diamètre, et reliés au cytoplasme par un étroit canal de 5 à 10 nm (Grimley et al. 1968, Kujala et al. 2001, Frolova et al. 2010). Cette structure apparaît très ressemblante aux invaginations des membranes du réticulum endoplasmique produites par le complexe protéique de réplication du virus de la Dengue et aux sphérules abritant la réplication du génome du virus Flock House à la membrane externe mitochondriale. Si la réplication du génome des *Alphavirus* est initiée à des temps précoces à la membrane plasmique, ces sphérules peuvent ensuite être retrouvées, à des temps plus tardifs, dans des compartiments membranaires internalisés dans de larges vacuoles appelées « vacuoles cytopathiques ». Ces compartiments de 600 à 2000 nm, possédant des marqueurs d'endolysosomes, sont retrouvés de manière systématique chez les *Togaviridae* (Froshauer et al. 1988, Kujala et al. 2001) (Figure 29).



**Figure 29: Localisation des complexes de réplication du virus Chikungunya.** Les cellules HeLa ont été infectées avec CHIKV à une MOI de 5 pendant 16h. Ces cellules ont été ensuite observées en microscopie électronique à transmission. La flèche rouge indique la localisation des sites de réplication du CHIKV (Aymeric Neyret - Roy Matkovic CPBS/CNRS).

## b) Agencement des courbures de membranes

Les courbures membranaires peuvent être engendrées par deux mécanismes principaux : L'altération locale de la composition lipidique de la membrane et/ou l'interaction de complexes protéiques avec la membrane cible. Ceci implique que ces virus et notamment le CHIKV possèdent la capacité de générer leurs compartiments de réplication en modulant les propriétés physicochimiques de la bicouche lipidique et/ou en recrutant des facteurs responsables de déformations positives ou négatives de la membrane.

### 1. Courbure membranaire et lipides

L'altération de la composition lipidique de membranes ou la néo-synthèse de lipides ont couramment été reportées pour les virus susceptibles de former des complexes de réplication. En effet, Perera et coll. ont observé que le virus de la Dengue perturbe l'homéostasie lipidique afin d'enrichir la cellule en certains lipides (phospholipides et sphingolipides) nécessaires à sa réplication (Perera et al. 2012). Dans ce cas la protéine NS3 du virus de la Dengue recrute la « fatty acid synthase » (FASN) au site de réplication virale pour générer des lipides pouvant induire une modification topologique de la membrane du réticulum endoplasmique et ainsi permettre la réplication du génome du virus de la Dengue (Heaton et al. 2010). Cette caractéristique est également partagée par le virus West Nile suggérant un mécanisme de modification des compositions des membranes commun (Martin-Acebes et al. 2011). De la même manière, HCV induit une lipogenèse via la voie SREBP, grâce à NS4B et la voie PI3K-AKT, conduisant à la transcription de gènes impliqués dans la production de lipides comme ceux codant pour la FASN (Park et al. 2009) (Figure 30).

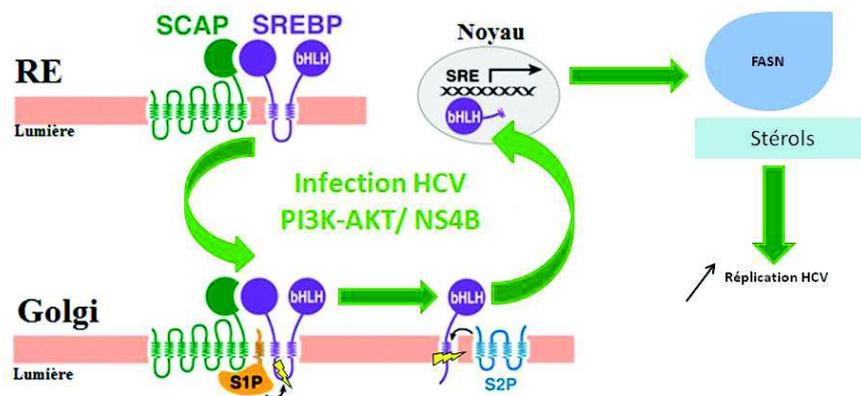


Figure 30: La protéine NS4B du HCV et l'activation de la voie AKT permettent d'activer la transcription de gènes impliqués dans la synthèse lipidique. SREBP stimulée est transportée du Réticulum endoplasmique (RE) vers l'appareil de Golgi où la protéine est clivée par les protéases S1P et S2P. Le clivage protéolytique de SREBP produit un peptide bHLH capable d'activer la transcription de gènes du

**métabolisme lipidique sous la dépendance de la séquence régulatrice « *Sterol Regulatory Element* » (SRE). (Brown et Goldstein 2009).**

Par ailleurs, HCV va aussi recruter la Phosphatidylinositol 4-kinase *alpha* (*PI4KIII  $\alpha$* ) grâce à l'interaction avec NS5A et NS5B pour permettre la production de PI4P à la membrane du réticulum endoplasmique permettant de générer de larges vésicules à double-membrane nécessaires pour abriter les complexes de réplication. En l'absence de cette kinase, NS3 et NS5B peuvent induire la formation de vésicules à double-membranes, toutefois ces dernières sont de très petites et ne peuvent pas permettre la réplication du génome de HCV (Reiss et al. 2013).

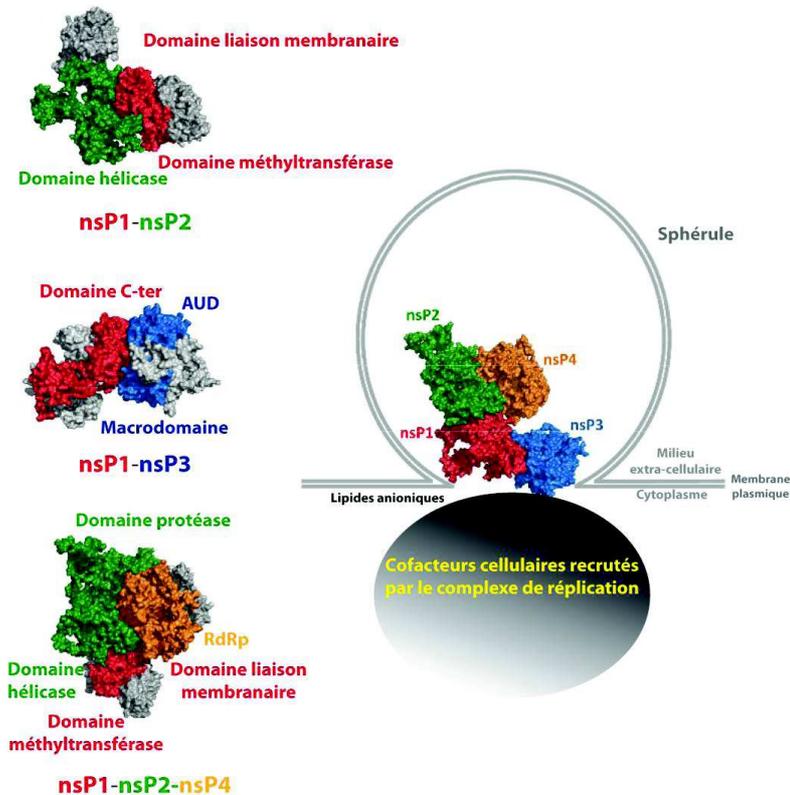
Le virus Flock House, qui produit des complexes de réplication similaires à ceux des *Alphavirus*, stimule le métabolisme de glycérophospholipides. L'inhibition de la synthèse de phospholipides dans ce cas conduit à l'absence de la réplication de son génome (Castorena et al. 2010, Sharma et al. 2011). La protéine A du virus Flock House se lie à des phospholipides anioniques enrichis aux membranes mitochondriales, comme l'acide phosphatidique, phosphatidylglycérol et la cardiolipine, permettant d'ancrer le complexe de réplication du à la membrane externe de la mitochondrie (Miller et Ahlquist 2002, Stapleford et al. 2009). L'oligomérisation de la protéine A nécessaire à la réplication du génome viral n'est cependant pas suffisante car elle n'induit pas la formation de sphérule à la membrane externe de la mitochondrie. Pour ceci il faut obligatoirement une matrice ARN et une activation de la fonction polymérase de la protéine A (Dye et al. 2005, Kopek et al. 2010). Pour les *Flavivirus* la protéine NS4A permet de générer à elle seule des réarrangements des membranes du réticulum endoplasmique grâce à ses deux hélices amphiphatiques présentes dans sa partie N-terminale de NS4A et son oligomérisation. (Roosendaal et al. 2006, Miller et al. 2007, Hung et al. 2015, Lee et al. 2015). La formation des complexes de réplication pour HCV est médiée par l'action coordonnée de trois protéines virales. En effet, elle nécessite la protéine hydrophobe NS4B qui contient 4 domaines transmembranaires et d'une partie C-terminale palmitoylée contenant une hélice amphiphatique. En s'oligomérisant et en recrutant, de manière coopérative avec NS5A, la protéine à domaine BAR PSTPIP2, elle permet la déformation à relief positif de la membrane du RE. NS3 et NS5A permettent, elles, de former les vésicules à double-membranes morphologiquement similaires à celles produites lors de l'infection par HCV (Romero-Brey et al. 2012). Ainsi, dans le contexte de la réplication du HCV, les protéines NS4B, NS3 et NS5A orchestrent la formation de structures membranaires abritant la réplication de HCV.

## **2. La formation de la sphérule répliquative du CHIKV et l'organisation des protéines non-structurales**

Chez les *Alphavirus*, la protéine nsP1 interagit avec la membrane plasmique *via* son hélice amphiphatique et s'y lie fortement grâce à des résidus d'acide palmitique ajoutés dans sa partie C-terminale comme pour NS4B de HCV (Laakkonen et al. 1996, Ahola et al. 1999). Cependant, cette protéine seule n'induit pas de déformation membranaire. Celle-ci nécessite l'interaction avec les protéines nsP2 et nsP3, dans la forme précurseur nsP123, et à l'ARN viral, comme le virus Flock house, pour induire la formation des sphérules à la membrane plasmique (Salonen et al. 2003). La présence de l'acide nucléique viral est importante dans la biogenèse des sphérules puisque la taille de l'ARN conditionne la taille de la sphérule de réplication (Kallio et al. 2013). De plus, l'activité polymérase de nsP4 est requise puisque la synthèse d'intermédiaires répliquatifs est nécessaire pour la mise en place de cette déformation membranaire (Spuul et al. 2011, Kallio et al. 2016). Comme les mécanismes viraux vus précédemment, les protéines virales formant le complexe de réplication du virus Chikungunya

recrutent des cofacteurs cellulaires capables de moduler la composition lipidique des domaines de réplication. Ainsi, l'ATP citrate lyase permettant la synthèse d'acétyl CoA et la Fatty acid synthase (FASN) responsable de la transformation d'acétyl CoA en Palmitate sont retrouvées importantes dans la réplication du génome du CHIKV et FASN semblerait être associée aux complexes de réplication du CHIKV (Karlak et al. 2016). Ces données sont en accord avec celles publiées par Perez et coll. qui démontrent qu'en inhibant la synthèse d'acides gras avec la Cerulénine, la réplication du virus Semliki Forest est ralentie suggérant que la synthèse d'ARN viraux nécessite une synthèse continue de lipides pour la formation de membranes (Perez et al. 1991). Les lipides impliqués dans la genèse des complexes de réplication sont des glycérophospholipides chargés négativement comme les phosphatidylsérines. Ces dernières, constituants du feuillet interne de la membrane plasmique, sont en effet des partenaires de liaison de nsP1 et permettent, *in vitro*, le maintien de ses activités méthyltransferases et guanylyltransferases (Ahola et al. 1999, Li et al. 2015). La formation de la sphérule répliquative nécessite donc la protéine virale de liaison aux lipides anionique nsP1 associée à nsP2 et nsP3 et la synthèse d'un ARN à partir d'une matrice grâce à la polymérase nsP4. L'organisation de ces quatre protéines formant le complexe de réplication du virus Chikungunya au sein de la sphérule n'est aujourd'hui pas connue. Cependant, l'étude d'interactions entre les domaines des protéines non-structurales, publiée par Rana, Sreejith et coll., propose que la protéine nsP1 pourrait interagir avec les autres protéines non-structurales virales alors que nsP3 n'interagirait dans le complexe qu'avec nsP1 (Sreejith et al. 2012, Rana et al. 2014) (Figure 31). Dans ce modèle, nsP1 et nsP4 sembleraient avoir la possibilité de s'oligomériser,

	nsP1			nsP2		nsP3			nsP4
	Mt	Mb	C-ter	Hélicase	Protéase	Macrodomaine	AUD	HVR	RdRp
nsP1	x			x		x	x		x
nsP2	x	x							x
nsP3			x						
nsP4	x	x		x	x				x



**Figure 31: Représentation du complexe de réplication du CHIKV et des interactions entre les protéines non-structurales qui le compose. Les croix en fond vert signifient qu'il y a interaction entre domaines d'une protéine non-structurale et une autre protéine non-structurale. Les traits en fond rouge indiquent l'absence d'interaction. La protéine nsP3 est proposée comme recrutant des partenaires cellulaires afin d'assurer la réplication. Mt=Domaine méthyltransférase ; Mb=Domaine de liaison membranaire ; C-ter= Domaine C-terminal ; AUD= *Alphavirus Unique Domain* ; HVR= Région Hyper Variable; RdRp= domaine ARN polymérase ARN dépendante. Adapté de Rana, Sreejith et al, 2014.**

La phosphoprotéine nsP3 n'interagissant qu'avec la seule protéine virale nsP1, il est proposé à l'heure actuelle que nsP3 pourrait interagir avec des protéines cellulaires, via notamment sa partie C-terminale (Frolova et al. 2010, Neuvonen et al. 2011, Panas et al. 2014, Thaa et al. 2015). Ainsi, nsP3 recrute entre autres l'Amphiphysine *via* son motif de liaison au domaine SH3 situé dans sa partie C-terminale riche en prolines. L'amphiphysine est une protéine à domaine N-BAR capables d'induire des déformations à relief positif de membranes riches en phospholipides anioniques (Rao et Haucke 2011). L'inhibition de son expression diminue de plus de 35% la réplication virale (Neuvonen et al. 2011). Toutefois, son rôle dans la formation de la sphérule à relief négatif n'est pas confirmé.

## 2) Protéines cellulaires relocalisées dans les compartiments de réplifications du CHIKV

L'identification des partenaires cellulaires associés aux sphérules du CHIKV permet d'évaluer leur possible importance dans le fonctionnement du complexe de réplication du

CHIKV. L'identification de cofacteurs cellulaires participant à la réplication du CHIKV est un enjeu majeur pour la compréhension de la mécanistique de cette étape. En 2006, l'équipe de Frolova et coll. (Frolova et al. 2006) décrit, dans des cellules infectées avec du virus Sindbis la présence de complexes protéiques associés à nsP3 composés de : G3BP, hnRNPs, des composants du cytosquelette et des protéines ribosomales. Panas et ses collaborateurs ont montré en 2014 que la partie C-terminale de nsP3 des virus de l'ancien monde pouvait interagir avec la protéine G3BP via le motif FGDF (Panas et al. 2014, Panas et al. 2015). L'utilisation d'ARN interférant de G3BP a permis d'observer une augmentation de la synthèse de polyprotéines non-structurales sans affecter la réplication du génome viral (Cristea et al. 2010). Il apparaît que la protéine G3BP joue un rôle pro-viral dans la multiplication du CHIKV en permettant le passage de l'étape de la traduction de la polyprotéine non-structurale vers l'étape de réplication du génome (Scholte et al. 2015). Ainsi, la plus grande production de protéines non-structurales (Cristea et al. 2010) serait dû à un défaut de passage vers la réplication du génome et donc à une traduction qui durerait plus longtemps.

En isolant les sphérules membranaires formées lors de l'infection par le Semliki Forest et en analysant leurs compositions en protéines cellulaires, Merits et collaborateurs ont identifié plus de 80 protéines cellulaires associées aux complexes de réplication (Varjak et al. 2013). Parmi les protéines référencées, certains facteurs décrits précédemment dans l'étude de Frolova ont été retrouvés: G3BP, des protéines du cytosquelette (actine et microtubule), mais également, des facteurs régulant la traduction, des hélicases à domaine DExD/H (DHX9, DDX3), des protéines impliquées dans les modifications post-traductionnelles (kinases, phosphatases) et des protéines nucléaires impliquées dans le métabolisme d'ARN « heterogeneous nuclear RiboNucleoProteins » (hnRNPs). Curieusement, beaucoup de RNPs, sortent du noyau de la cellule infectée lorsque la réplication virale s'effectue (Akhrymuk et al. 2012). C'est notamment le cas de hnRNP A1, qui jouerait un rôle dans la synthèse de l'ARN du virus Sindbis en se liant aux promoteurs génomiques et subgénomique de l'ARN viral (Aggarwal et al. 2009, Gui et al. 2010). C'est aussi le cas pour hnRNP K qui serait également retrouvée aux complexes de réplication du virus Sindbis, liée aux protéines non-structurale et à l'ARN subgénomique (Burnham et al. 2007). Varjak et ses collaborateurs démontrent également que les RNPs PCBP 1, hnRNP C, hnRNP M, et hnRNP K, modulent la réplication du SFV (Varjak et al. 2013).

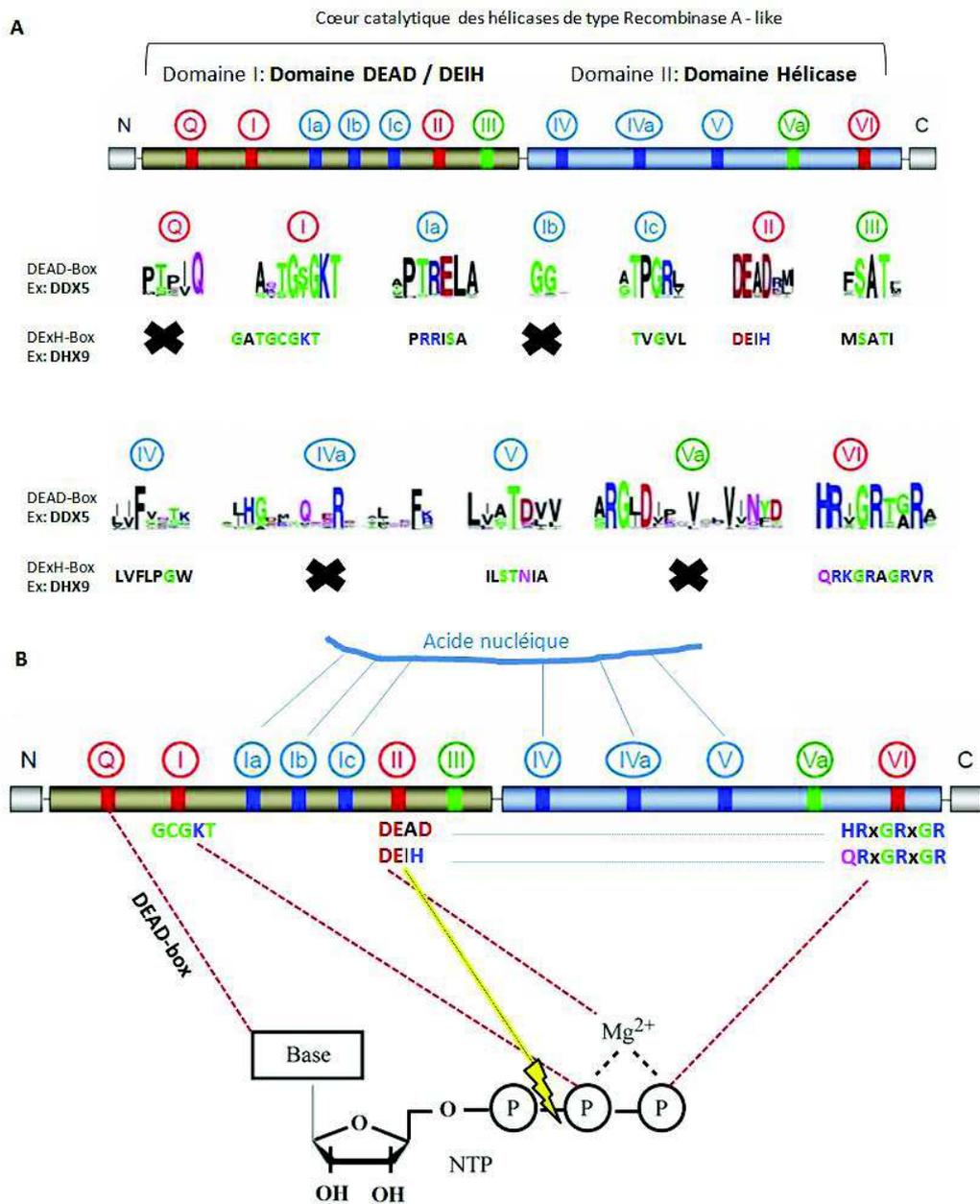
A l'heure actuelle, hormis la description de la fonction de G3BP, il n'existe aucune étude ayant conduit à la caractérisation des partenaires cellulaires des complexes de réplication du CHIKV. En revanche, par une approche en double hybride, certaines protéines cellulaires interagissant avec nsP2, nsP3 ou nsP4 ont pu être caractérisées (Bourai et al. 2012). Dans cette analyse, de manière très intéressante la protéine DHX9 ainsi que d'autres hélicases à domaine DExD/H ont été identifiées permettant, au regard des résultats obtenus précédemment avec les virus Sindbis et Semliki (Frolova et al. 2006, Varjak et al. 2013), de questionner la présence de ces hélicases dans les sphérules formées lors de l'infection par CHIKV, mais aussi de déterminer leurs fonctions dans la réplication du CHIKV.

#### **IV. Les hélicases à domaine DExD/H, des cofacteurs cellulaires régulant les cycles réplcatifs viraux.**

La découverte des hélicases date de l'étude d'Abdel-Monem et de ses collaborateurs publiée en 1976 dans laquelle les auteurs démontrent une activité enzymatique séparant des doubles brins d'ADN chez *E.coli* (Abdel-Monem et Hoffmann-Berling 1976). Depuis, de nombreuses hélicases ont été identifiées dans tous les règnes du vivant et d'autant plus chez les organismes complexes parce que les acides nucléiques sont capables d'établir des structures d'appariement entre les bases qui les constituent. Les acides nucléiques contiennent l'information nécessaire pour la formation des molécules indispensables à la vie, il faut donc savoir lire cette information afin de la traduire en molécule fonctionnelle. L'appariement des bases d'un brin d'acide nucléique grâce à des ponts hydrogènes, et les structures secondaires, peuvent empêcher la lecture de l'information, c'est donc à cette étape qu'interviennent les hélicases en cassant les ponts d'hydrogène et en séparant les deux brins précédemment liés. Parmi ces hélicases nous retrouveront des hélicases à ARN appelées DEAD (DDX), DEAH ou DExH (DHX) qui sont des protéines ubiquitaires retrouvées chez les procaryotes et eucaryotes. Chez l'Homme, 42 DDX et 16 DHX ont été identifiées (Umate et al. 2011). Ces hélicases ont divergé les unes des autres depuis des phénomènes de duplications géniques apparus chez les procaryotes jusqu'à évolution par diverses mutations allant de la délétion/insertion de séquences codantes aux mutations ponctuelles (Lopez-Ramirez et al. 2011)

## A. Structure des hélicases à domaine DExD/H

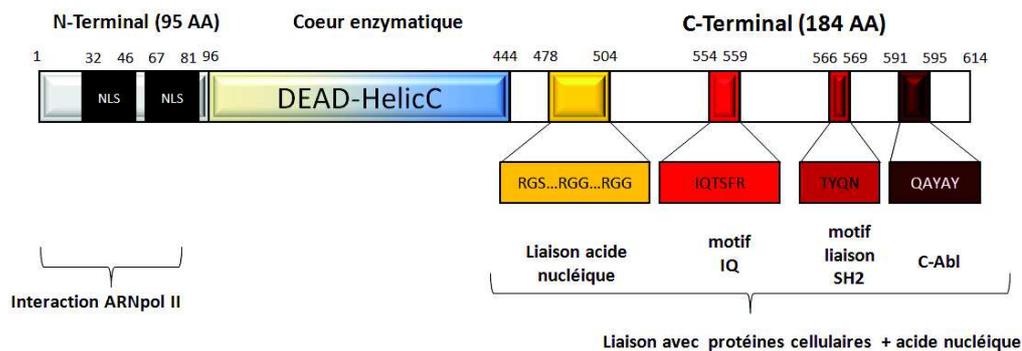
Ces protéines contiennent deux domaines globulaires liés de manière covalente formant le site actif de l'enzyme hélicase et constitués de motifs nécessaires pour l'orchestration de leur activité hélicase en liant un NTP et l'acide nucléique (Figure 32). L'organisation tridimensionnelle des domaines DEAD/DEIH et Hélicase (HelicC) fait apparaître entre eux une poche où est logé un nucléotide triphosphate. Les motifs Q, I, II et VI sont impliqués dans la liaison et l'hydrolyse du NTP pour produire l'énergie nécessaire à l'activité de la protéine: Pour les hélicases à domaine DEAD ce NTP sera l'ATP tandis que pour les DExH tous les NTPs sont hydrolysés car le motif Q spécifique à la reconnaissance de l'adénine est absent chez les DExH (Tanner 2003, Tanaka et Schwer 2005). Le motif I (GCGKT), appelé Walker A, forme une boucle et permet de lier le phosphate  $\alpha$  et  $\beta$  du NTP. La thréonine lie le magnésium fixé aux groupements phosphates  $\beta$ ,  $\gamma$  du NTP. Le motif VI coordonne la liaison du NTP au domaine 2 et est toujours associé à un motif DExD/H particulier : Les hélicases à motif DEAD contiennent toujours le motif HRxGRxGR alors que les hélicases à motif DExH auront le motif QRxGRxGR dans le domaine HelicC. Le motif II, ou Walker B, est le motif qui a nommé la famille de ces hélicases. Ils contiennent au moins deux acides aminés chargés négativement l'acide aspartique (D) impliqué dans la liaison covalente avec un  $Mg^{2+}$ , l'acide glutamique (E) important dans l'hydrolyse du NTP et sont précédés par des acides aminés hydrophobes (ex : valine et isoleucine pour DHX9) (Koonin 1993). Le motif III est responsable de la coordination entre l'hydrolyse du NTP et l'activité hélicase de la protéine et les motifs Ia, Ib Ic, IV, IVa et V lient l'acide nucléique (Figure 32).



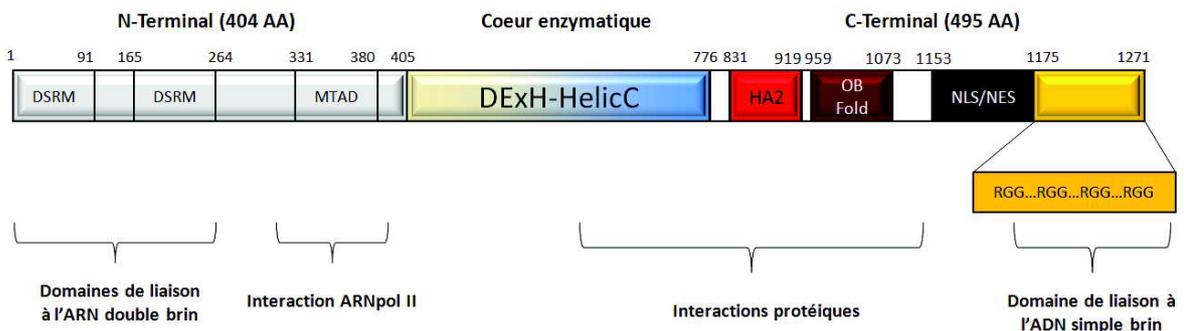
**Figure 32: Motifs des cœurs enzymatiques des hélicases à domaine DEAD et DExH. (A)** Le domaine I (DExD/H) et le domaine C-terminal hélicase (HelicC) constituant du cœur enzymatique de la protéine à domaine DEAD (DDX5) ou DExH (DHX9) sont représentés en structure primaire avec les différents motifs qui les constituent. Les couleurs indiquent les propriétés chimiques des acides aminés : rouge : acide, bleu : basique, noire : hydrophobe, vert et rose : polaire. **(B)** Schéma des fonctions des différents motifs dans la fixation du NTP (ATP seulement chez DEAD-box grâce au motif Q présent) et dans la liaison à l'Acide nucléique. Adapté de Putnam et Jankowsky, 2013 et de Lee et Pelletier, 2016.

Si toutes les hélicases à domaine DExD/H possèdent un site actif très conservé, les parties N-terminales et C-terminales sont très différentes. Ces régions sont impliquées dans la localisation cellulaire, la reconnaissance d'acides nucléiques, et dans la liaison avec des partenaires protéiques (Figure 33) (Andersen et al. 2006, Marintchev et al. 2009, Montpetit et al. 2011).

## DEAD-Box (DDX5):



## DExH-Box (DHX9):

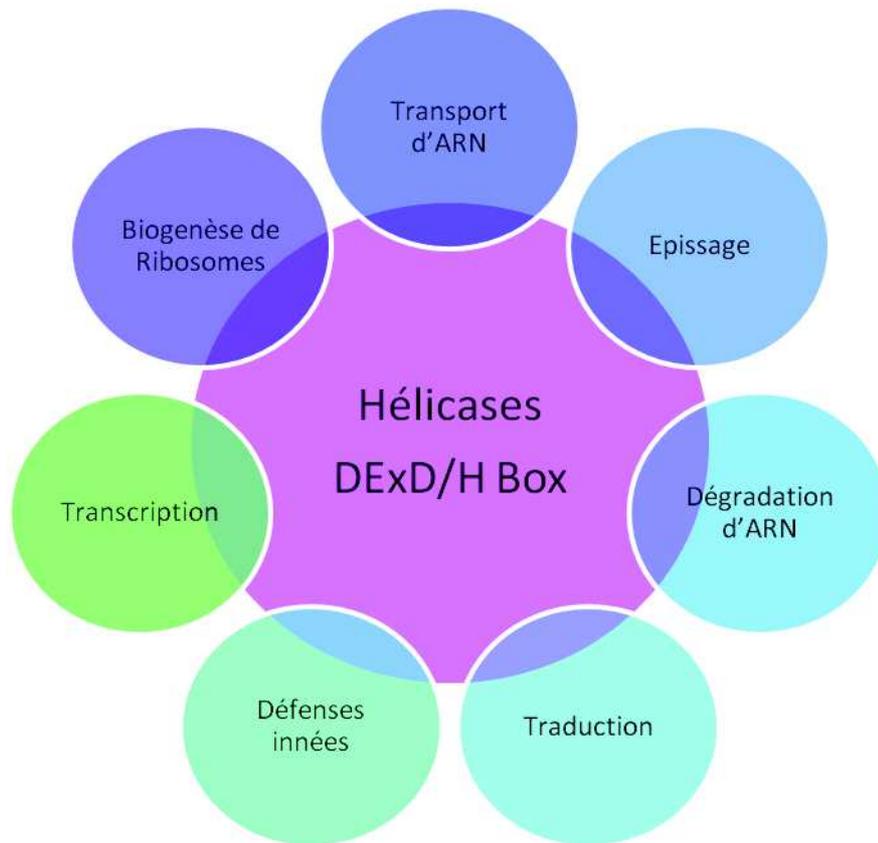


**Figure 33: Répartition de domaines fonctionnels dans la DEAD-box (DDX5) et DExH-Box (DHX9).** Représentation schématique des domaines dans lequel les nombres indiquent les positions des acides aminés. DSRM= Domaine de liaison à l'ARN double brin, MTAD= « minimal transactivation domain », HA2= domaine 2 associé à l'hélicase ; OB Fold = Oligonucléotide/Oligosaccharide binding Fold, NLS= Signal de localisation nucléaire, NES= Signal d'export nucléaire.

L'association de protéines cellulaires avec les hélicases DExD/H est reconnue comme étant déterminante de la fonction de ces enzymes (Banroques et al. 2010, Linder et Jankowsky 2011).

## B. Fonction des hélicases DExD/H dans les cellules eucaryotes

Les hélicases à domaines DExD/H ont un rôle majeur dans les processus impliquant les acides nucléiques et plus particulièrement dans toutes les étapes du métabolisme de l'ARN, de sa synthèse par transcription à sa dégradation, en passant par son transport, ses modulations pour la formation de ribonucléoprotéines (RNPs) et sa traduction en protéines (Figure 34).



**Figure 34: Principaux processus utilisant des hélicases à domaine DExD/H**

## 1) Transcription de gènes

La première grande étape de la voie d'expression de gènes est la transcription de l'information génétique portée par l'ADN. La transcription est un mécanisme très régulé faisant appel à un ensemble de protéines permettant la reconnaissance de promoteur, la modification de structure bicaténaire de l'ADN, et la polymérisation d'un ARN. Les hélicases à domaine DExD/H permettent de moduler la transcription de gènes en agissant comme co-activateurs ou co-represseurs en fonction des interactions protéiques qu'elles établissent au site de transcription (Nakajima et al. 1997, Gillian et Svaren 2004, Wilson et al. 2004). Les protéines DDX5 et DHX9 sont les protéines les plus caractérisées pour la régulation de la transcription. En effet, ces deux hélicases sont toutes les deux capables de lier à la fois l'ARN polymérase II, responsable de la synthèse d'ARNm grâce à ses 12 sous-unités RPB1-12, et le complexe activateur de transcription CREB binding protein (CBP)/p300 impliqué dans la reconnaissance du promoteur de transcription (Nakajima et al. 1997, Rossow et Janknecht 2003). D'un point de vue mécanistique, DHX9 interagirait avec l'ARN polymérase II grâce à trois tryptophanes dans son domaine MTAD (Figure 31) et la liaison des sites de liaison à l'ARN double brin de DHX9 avec CBP/p300 alors lié au promoteur conduirait au recrutement de DHX9 au site d'initiation de la transcription CRE (CREB responsive element) (Aratani et al. 2001, Aratani et al. 2003). En s'associant également avec la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B, DHX9/CBP/P300/ARNpolII peut alors transcrire des gènes dépendant de la transcription par NF- $\kappa$ B comme l'Interféron 1  $\beta$  (Tetsuka et al. 2004). La partie N-terminale (230-325) de DHX9 peut également faire le pont entre ARN polymérase II et la partie C-terminale de la

protéine « Breast Cancer 1 » (BRCA1) ce qui permet le rapprochement de BRCA1 avec la machinerie transcriptionnelle et des complexes protéiques impliqués dans le remodelage de la chromatine par acétylation d'histones afin de faciliter la transcription de gènes (Mullan et al. 2006). En plus de sa capacité à organiser la machinerie transcriptionnelle, DHX9 se fixe également sur des séquences d'ADN spécifiques comme la séquence 5'CGG ACC GCG TGC GC 3' du promoteur du suppresseur de tumeur p16<sup>INK4A</sup>. Myöhänen et Baylin démontrent que dans les cellules cancéreuses dans lesquelles l'expression de p16<sup>INK4A</sup> est altérée, DHX9 se fixe moins bien sur la séquence promotrice du suppresseur de tumeur et les histones sont moins acétylées (Myohanen et Baylin 2001). De même, l'équipe chinoise de Huo et collaborateurs a montré que le récepteur EGFR « Epidermal Growth Factor Receptor » ne peut lui-même activer la transcription de gènes cibles suite à sa stimulation par le facteur de croissance épidermique « EGF ». En se liant à DHX9, il dirige alors l'hélicase sur son promoteur ATRS (AT-rich sequence) et l'EGFR peut alors conduire à la transcription de gènes de réponses à sa stimulation (Huo et al. 2010). Ainsi l'hélicase DHX9 serait importante dans la reconnaissance de séquences impliquées dans la transcription de gènes.

L'hélicase à DEAD-Box DDX5 (p68) et la très proche DDX17 (p72) agiraient comme la DEIH-Box DHX9 dans le pontage de l'ARN polymérase II avec le complexe CBP/p300. En effet, DDX5 agit également en coactivateurs de transcription en interagissant avec le promoteur cible, pS2, du récepteur à l'œstrogène ER $\alpha$  où sont retrouvés l'ARN polymérase II, CBP, p300 (Metivier et al. 2003). Il a été décrit que L'ARN polymérase II se lie sur les 80 premiers acides aminés de DDX5 et le complexe CBP/p300 s'attache aussi sur la partie N-ter de DDX5 (176-388). Ainsi, DDX5 en transactivant le domaine C-terminal de CBP conduit à la transcription de gènes (Rossow et Janknecht 2003, Iyer et al. 2014). En réponse à différents stress comme des dommages de l'ADN, le supresseur de tumeur p53 est activé et participe à la transcription de gènes de réparation d'ADN, d'arrêt de croissance ou d'apoptose (Vogelstein et al. 2000, Balint et Vousden 2001). L'équipe de Bates en 2001 a démontré que l'utilisation de siRNA supprimant l'expression de DDX5 entraîne une réduction de la synthèse d'ARN de gènes cibles de p53 impliquant alors l'hélicase dans l'activation de la transcription de ces gènes suite à ces conditions de stress (Bates et al. 2005).

Les activités NTPases et Hélicases de DHX9/DDX5/DDX17 semblent être importantes dans l'activation de la transcription de certains gènes cellulaires (Aratani et al. 2001). En revanche, l'activité hélicase de DDX5 et DDX17 ne semblent pas être nécessaire dans la répression de transcription de gènes (Wilson et al. 2004). En effet, elles peuvent également inhiber la production d'ARNm en s'associant à l'histone déacétylase HDAC, connue pour être un répresseur transcriptionnel (Wilson et al. 2004). DDX54 se fixe sur le récepteur ER $\alpha$  mais à l'inverse de DDX5, cette liaison résulterait en une répression de la transcription des gènes cibles d'ER $\alpha$  (Rajendran et al. 2003)

D'autres protéines à domaines DEAD ont un rôle confirmé dans la transcription d'ARNm : DDX21 se fixe à l'extrémité N-terminal du facteur de transcription c-Jun et permet de coactiver la transcription grâce aussi à son activité ATPase et hélicase (Westermarck et al. 2002)

## 2) Epissage d'ARN pré-messagers

La transcription des gènes permet la synthèse d'un ARN, qualifié d'abord de pré-messagers, contenant des introns, non codants, et des exons. La suppression des introns non codants est une étape importante dans la maturation d'un ARN afin de produire un ARN mature porteur de la séquence d'une future protéine. La suppression des introns se fait par le mécanisme d'épissage. La réaction d'épissage nécessite 5 espèces d'ARN appelés « small nuclear RNAs » (snRNAs), U1, U2, U4, U5 et U6 et de nombreuses protéines formant alors un complexe de RNPs appelé « spliceosome » (Frendewey et Keller 1985, Grabowski et al. 1985). L'épissage peut être divisé en 4 étapes (Figure 35) (Brow 2002, Wahl et al. 2009, Chen et Cheng 2012) :

-l'assemblage du spliceosome : il s'effectue lors de la liaison des 5 snRNAs et des facteurs protéiques à l'ARN pré-messager. U1 reconnaît le site 5' d'épissage par appariements des bases. U2 se fixe aussi par appariements de base sur la branche d'ARN. U4, U5, et U6 sont recrutés et le spliceosome est formé (Figure 35)

-l'activation intervient ensuite par réarrangement de la structure du spliceosome en libérant U1 et U4. U6 se fixera à son tour au site 5' de la jonction d'épissage et à U2. La structure est maintenue par le complexe protéique « NineteenComplex » (NTC) (Tarn et al. 1994)

-la réaction catalytique supprimant l'intron comprend deux étapes de transestérification. Cette étape nécessite de l'énergie par hydrolyse de l'ATP de la part des hélicases.

-le désassemblage du spliceosome est effectué après que les deux réactions catalytiques aient changé la conformation du spliceosome et que l'ARNm et les composants de la machinerie d'épissage aient été libérés. Ces deux derniers événements dépendent des hélicases qui séparent les duplexes d'ARN formés entre les snRNAs et l'ARN pré-messager.

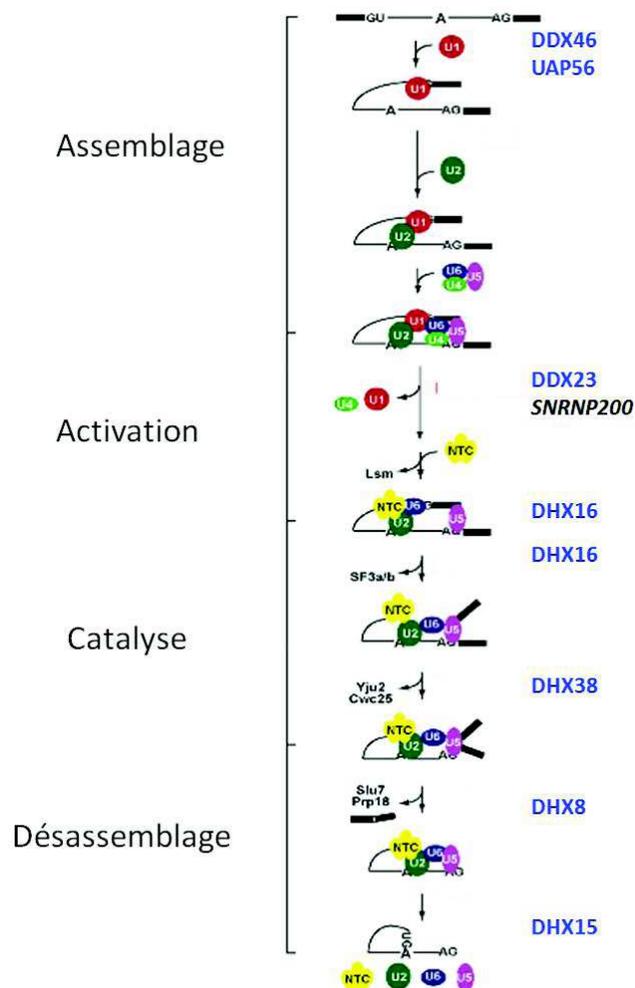


Figure 35: Représentation schématique de la suppression d'un intron par épissage d'un ARN pré-messager et l'implication d'hélicase à DEAD-Box dans ce processus. Les exons sont représentés par des traits noirs épais. NTC : Nineteen complex. En bleu, quelques hélicases mises en jeu dans chacun des processus. Adapté de Liu et Cheng, 2015

L'hélicase DDX17 est également décrite comme impliquée dans l'épissage notamment lorsque des exons sont riches en A-C comme chez la protéine CD44 (Honig et al. 2002, Lee 2002) et de même DDX5 serait également importante pour les étapes précédant la première réaction catalytique puisque son inhibition entraîne l'arrêt de l'assemblage du spliceosome (Liu 2002).

### 3) Biogenèse des ribosomes

La traduction d'ARN messagers matures nécessite des Ribonucléoprotéines appelées ribosomes. Les ribosomes sont constitués de deux sous-unités :

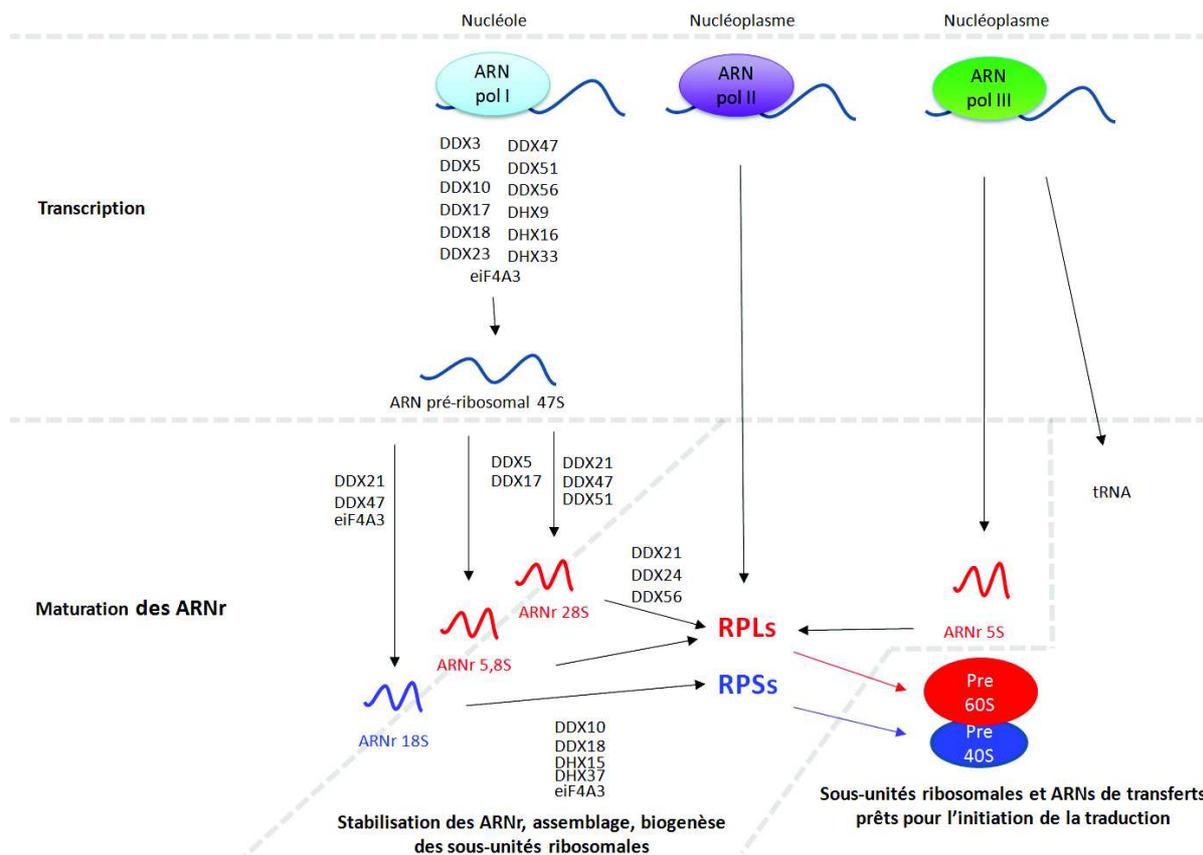
- Une grosse sous-unité faite de 47 protéines ribosomales (RPL) et d'ARNs ribosomiaux (ARNr) 5S, 5,8S et 28S.

- Une petite sous-unité faite de 33 protéines ribosomales (RPS) et d'un ARNr 18S.

Afin de former des ribosomes, il faut alors synthétiser des ARNs ribosomiaux et les maturer pour qu'ils puissent s'assembler avec les protéines des petites ou grandes sous-unités.

La synthèse est initiée par la transcription de l'ARN pré-ribosomal 47S par l'ARN polymérase I au nucléole et par la transcription du précurseur d'ARNr 5S par l'ARN polymérase III. L'ARN pré-ribosomal 47S contient des séquences aux extrémités 5' et 3' appelées « External Transcribed Spacers » (ETS) ainsi que deux séquences « Internal Transcribed Spacers » (ITS1 et ITS2) au sein de cet 47S. La maturation ribosomale passe par le clivage progressif de ces séquences afin de produire les ARNr 18S, 5,8S, 28S (Mullineux et Lafontaine 2012) et par l'assemblage de ces ARNs avec les protéines RPL et RPS.

Toutes les étapes de la biogenèse d'un ribosome nécessitent la présence d'hélicases à domaines DExD/H. En effet, plus de 30 hélicases sont retrouvées associées au nucléole où est transcrit l'ARN pré-ribosomal 47S par l'ARN pol I (Scherl et al. 2002, Andersen et al. 2005). L'équipe de Zhang a mené une brillante étude en utilisant un système de délivrance d'ARNs interférant (ARNi) par des lentivirus pour diminuer l'expression de la plupart de ces 30 hélicases et évaluer leur implication dans la transcription de l'ARNr 47S. La réduction de 10 fois de l'expression de DHX9 et de moitié de DHX33 ont entraîné dans chacune des conditions la diminution de 10 fois la synthèse du précurseur d'ARNr. L'utilisation de d'ARNi contre les ARNm des hélicases DDX3, DDX10, DHX16, DDX17, DDX18, DDX23, DDX27, DDX46, DDX47, DDX48 (eIF4A3), DDX50, DDX51 et DDX56 réduisent également de près de la moitié la synthèse de l'ARNr 47S (Zhang et al. 2011a). Bien que les mécanismes exacts de leurs rôles dans la transcription du précurseur 47S ne soient pas connus, Zhang et ses collaborateurs proposent un modèle pour DHX33. La transcription de l'ARNr nécessite « Upstream Binding Factor » (UBF) pour remodeler la chromatine au niveau des ADNr et le recrutement de l'ARN polymérase I. Parce que la diminution de l'expression de DHX33 n'entraîne ni l'accumulation d'ARNr 47S, ni des autres ARNr maturés, l'hélicase serait alors impliquée dans le mécanisme de transcription. Ses activités NTPase et de liaison à l'ADN semblent être importantes dans la synthèse du 47S, il est donc proposé que DHX33, en hydrolysant l'ATP pourrait permettre d'assister au dépliement de la chromatine au niveau des sites d'ADNr (Zhang et al. 2011a). Après transcription du précurseur ARNr 47S, l'étape de maturation par clivage est primordiale pour la production des 18S, 5,8S, 28S. Là encore, les hélicases ont un rôle important dans ce processus : l'utilisation d'ARNi contre DDX51 a pour conséquence une accumulation de l'ARNr 47S, mais une diminution des intermédiaires 32S et 12S conduisant *in fine* au 28S (Srivastava et al. 2010). Enfin, après maturation, les ARNr doivent s'assembler avec les protéines RPL et RPS pour former les pré-sous-unités 60S et 40S des ribosomes. Encore une fois, les hélicases ont un rôle majeur dans cette fonction. La protéine DDX56 (appelée aussi NOH61) est présente dans le nucléole, dans le nucléoplasme, associée aux particules pré-ribosomales 65S mais est absente des ribosomes matures du cytoplasme (Zirves et al. 2000). En diminuant la présence de DDX56 par ARNi, Wild et ses collaborateurs montrent une accumulation de RPL29 dans le noyau de la cellule transfectée, indiquant alors que DDX56 est importante dans la formation de la sous-unité large du ribosome. De même, ils montrent également que l'inhibition de l'expression de DHX15, absente du nucléole, a pour conséquence l'accumulation de RPS2 nucléaire. L'assemblage de la petite sous-unité ribosomale est ainsi dépendant de DHX15 (Wild et al. 2010). L'implication des hélicases dans la biogenèse des ribosomes n'est pas totalement résolue. Elle nécessite de plus amples études et est résumée schématiquement dans la figure 36.



**Figure 36: Implication des hélicases à domaine DExD/H dans les étapes de la biogenèse des ribosomes. Les constituants de la sous-unité large des ribosomes sont indiqués en rouge tandis que ceux de la petite sous-unité sont en bleu.**

Si les hélicases à domaine DExD/H sont impliquées dans la biogenèse des structures essentielle à la traduction des messages codés par l'ARNm en protéines, elles sont également importantes dans ce dernier processus.

#### 4) Les DExD/H et la traduction protéique

Pour qu'un ARN messager puisse être traduit, il faut d'abord que la grosse sous-unité 60S et la petite sous-unité 40S soient assemblées en un ribosome 80S fonctionnel. Ce processus requiert également des hélicases à domaine DExD/H. Ensuite, lorsque le complexe 80S est assemblé, le ribosome peut être bloqué au cours de la phase d'élongation à des structures secondaires formées par l'appariement de bases au sein de l'ARNm. Ici encore, le recrutement de ces hélicases peut permettre de passer cet obstacle et l'avancée du ribosome en synthèse de la protéine.

##### 1. Rôle dans l'assemblage de ribosomes

La traduction des ARNm épissés, matures avec une coiffe en 5' est un processus hautement régulé par des complexes protéiques très organisés. Tout d'abord, un pré-complexe d'initiation 43S (PIC) formé de la sous-unité 40S du ribosome et des facteurs d'initiation de la traduction eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5 avec le complexe ternaire eIF2-GTP-Met-tRNAi s'associe en région 5' de l'ARNm à eIF4F. Eif4F est composé, comme nous l'avons déjà vu de la protéine se liant à la coiffe, eIF4E, de la protéine d'échafaudage eIF4G fixant eIF4E, PABP,

eiF4A et donc eiF3 de PIC. Une fois lié à l'ARN, PIC va scanner la séquence d'ARN à la recherche du codon complémentaire au MET-tRNA<sup>i</sup>, le codon d'initiation AUG (Aitken et Lorsch 2012). Dès qu'il est trouvé, PIC va modifier sa conformation et la translocation d'eiF1 va permettre à eiF2 d'hydrolyser en collaboration avec eiF5 le GTP du complexe ternaire. Les facteurs d'initiations de la traduction de PIC et eiF2 alors lié au GDP sont libérés pendant qu'eiF5B permet l'attachement de la sous-unité large du ribosome sur la petite sous-unité formant alors le ribosome 80S, prêt pour l'élongation. Cependant, certains ARNm peuvent contenir une structure IRES ou « Internal ribosome entry site », l'ARNm de « X-chromosome linked Inhibitor of Apoptosis » (XIAP) par exemple, ou comme dans l'ARN de certains virus. En effet, le complexe PIC s'attache directement à la séquence IRES de l'hépatite C et sans avoir besoin de eiF1, eiF1A, eiF4B et eiF4F (Pestova et al. 1998, Kieft et al. 2001, Thakor et Holcik 2012). Geissler et ses collaborateurs ont démontré que DDX3 pouvait se lier à eiF3 et à PIC et permettre le recrutement de la grande sous-unité ribosomale en modifiant la conformation du complexe précédemment établi. Dès que le ribosome 80S est formé, le facteur eiF3 est libéré mais DDX3 reste en place jusqu'à ce que l'élongation démarre (Geissler et al. 2012). Ce type de traduction est particulièrement bien adapté lorsqu'eiF2 $\alpha$  est phosphorylée en conditions de stress permettant ainsi de traduire certains ARNm modulant l'apoptose par exemple (Thakor et Holcik 2012).

## 2. Rôle dans le dépliement des structures secondaires de l'ARNm

La liaison de PIC et la lecture de la séquence d'ARN nécessitent le dépliement d'éventuelles structures secondaires de l'ARNm. Au moins 4 hélicases sont aujourd'hui connues pour effectuer cette tâche : eiF4A, Ded1 ou DDX3, DHX9 et DHX29.

EiF4A est un composant du complexe eiF4F. Grâce à son domaine DEAD-Box cette protéine appelée aussi DDX2 est capable de déplier des structures pour permettre la liaison de PIC sur l'ARN à l'extrémité 5' (Svitkin et al. 2001). Cette fonction hélicase est possible lorsque la liaison d'eiF4G ou d'eiF4H à eiF4A modifie l'orientation de son cœur enzymatique et permet une stimulation de l'activité ATPase initialement faible (Rogers et al. 2001, Schutz et al. 2008, Hilbert et al. 2011). EiF4A et eiF4B ont été caractérisés comme interagissant avec l'ARNm jusqu'à 52 nucléotides en aval de la coiffe (Lindqvist et al. 2008). Ceci signifie qu'après le recrutement de PIC, eiF4A peut parcourir l'ARNm pour défaire les structures secondaires et faciliter le scan de l'AUG.

EiF4A n'est pas la seule hélicase à effectuer cette fonction de dé-appariement de bases pour que le ribosome puisse trouver le codon initiateur de la traduction. En effet, les hélicases Ded1 et DHX29 ont été proposées pour permettre la destructuration de l'ARN en 5' mais de manière complémentaire à eiF4A : eiF4A pourrait permettre de supprimer les structures près de la coiffe, tandis que Ded1 et DHX29 pourrait permettre d'étendre cette action sur structures plus fortes pour l'accrochage d'eiF4F ou pendant la lecture de l'AUG (Berthelot et al. 2004, Pisareva et al. 2008). De point de vue mécanistique, Hilliker et ses collaborateurs ont brillamment montré que DDX3 se liait directement à eiF4G par sa partie C-terminale pour former un complexe DDX3-eiF4F-ARNm qui s'accumule dans les granules de stress. Puis en hydrolysant l'ATP, DDX3 quitte les granules de stress avec eiF4F et l'ARNm pour initier la traduction (Hilliker et al. 2011). Cette liaison permettrait à eiF4G de se stabiliser à l'extrémité 5' de l'ARN grâce à la destructuration de l'ARN médiée par DDX3 (Soto-Rifo et al. 2012). L'hélicase DHX29, en interagissant avec la sous-unité 40S du ribosome près du canal d'entrée au sein de PIC, sépare les deux brins d'une tige-boucle d'ARN permettant à ces séquences d'entrer dans le ribosome et ce sur de long 5'UTR, jusqu'au codon initiateur (Abaeva et al. 2011).

Enfin, l'hélicase DHX9 ou RNA Helicase A (RHA), en plus de son rôle dans la transcription, joue un rôle majeur dans la traduction d'ARNs très structurés en 5'. La première structure reconnue par DHX9 est appelée PCE pour « 5'Post-transcription Control Element ». Cette structure a d'abord été identifiée dans l'extrémité 5'UTR de l'ARN du virus de la nécrose de la rate aviaire (Butsch et al. 1999) et a ensuite été retrouvé chez les rétrovirus VIH-1 et HTLV-1 et dans l'ARNm de JunD. Le PCE est une structure secondaire complexe de 150 nucléotides contenant 2 tige-boucles (Roberts et Boris-Lawrie 2003, Hartman et al. 2006) que DHX9 peut lier, grâce aux lysines conservées de ses deux domaines de liaison à l'ARN double brin. En utilisant ses activités NTPase/Hélicase, DHX9 permet l'incorporation de polyribosomes et une traduction efficace des protéines (Hartman et al. 2006, Ranji et al. 2011). La deuxième structure reconnue par DHX9 est présente dans le 5'UTR de l'ARNm du collagène. Il s'agit d'une tige-boucle reconnue par « La ribonucleoprotein domain family member 6 » (LARP6). Cette dernière fixe cette tige-boucle (Cai et al. 2010a, Stefanovic et al. 2014) en complexe avec DHX9 ce qui permet le recrutement de polysomes et de traduire efficacement le collagène (Manojlovic et Stefanovic 2012). De la même manière, DHX9 peut se lier à la protéine Lin28 par ses parties N- et C-terminales et permet de promouvoir la traduction en dépliant les structures secondaires et associant les ribosomes sur les ARNm liés par Lin28 (Jin et al. 2011). L'ensemble de ces événements est schématisé dans la figure 37.

Très récemment, un rôle de DHX9 dans la traduction IRES dépendante a été révélé. Suite à des dommages de l'ADN provoqués par des radiations ionisantes ou par des rayons ultraviolets, Halaby et ses collaborateurs montrent que DHX9 peut s'associer à la protéine Translation Control Protein 80 (TCP80) et augmenter la traduction IRES dépendante de p53, vraisemblablement en dépliant les structures secondaires de l'ARN formant l'IRES (Halaby et al. 2015).

Ainsi, alors qu'eIF4A, DDX3 et DHX29 ne présente pas de cible spécifique, DHX9 exerce ses fonctions d'amplification de traduction d'ARN messagers de manière spécifique grâce à des structures secondaires particulières (Hartman et al. 2006).

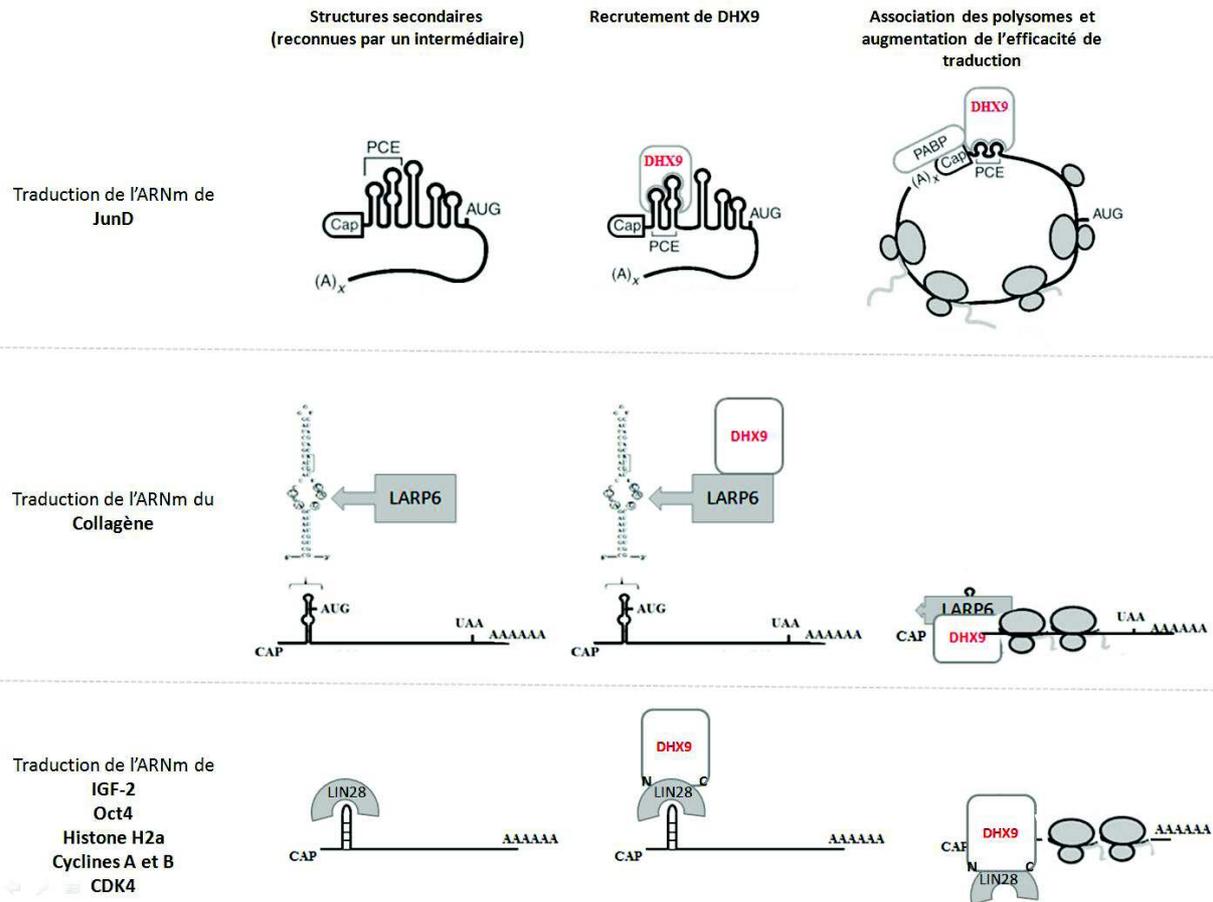
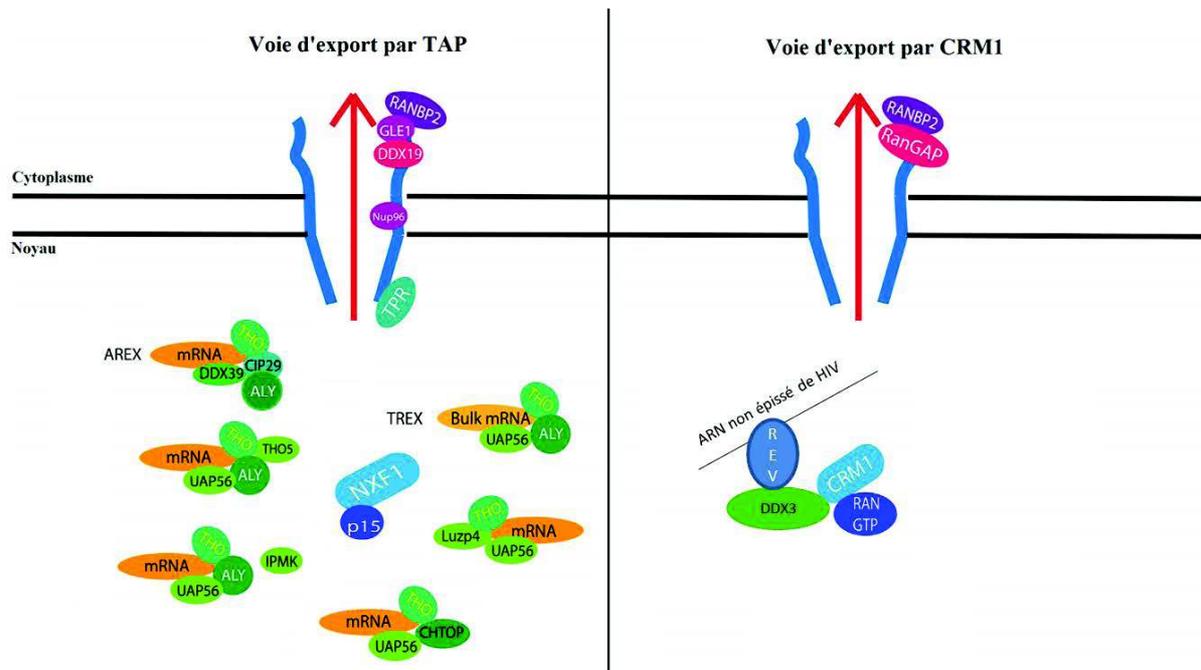


Figure 37: Le recrutement de DHX9 sur des structures secondaires d'ARNm permet d'augmenter la synthèse de la protéine codée

## 5) Rôle dans le transport d'ARNs

Les cellules eucaryotes étant compartimentalisées, le transport d'ARNs du noyau vers le cytoplasme et vice versa est contrôlé à l'interface noyau/cytoplasme. L'export nucléaire de molécules d'ARN ou de protéines est effectué par deux voies d'exports : la voie TAP et la voie CRM1. TAP interagit avec différents adaptateurs ou avec des ARN messagers contenant des « constitutive transport élément » (CTE) ou des régions codantes pour des séquences signal. L'ensemble forme un complexe de ribonucléoprotéines qui va se fixer au complexe du pore nucléaire (NPC) *via* la protéine « Translocated promoter region » (TPR) permettant le passage du noyau jusqu'à la queue cytoplasmique du pore nucléaire. Dans cette voie de transport, certaines hélicases sont nécessaires pour l'export d'ARNm. DDX39 est capable de lier à sa partie C-terminale la protéine de liaison à l'ARNm CIP29 et le facteur d'export ALY, comme l'hélicase UAP56 (Sugiura et al. 2007). Ce complexe est alors apporté au pore nucléaire grâce à TAP. Dans la queue cytoplasmique du NPC, l'hélicase DDX19 lie la protéine Gle1 et l'inositol hexakisphosphate  $IP_6$  entraînant la fixation de l'ATP par DDX19. En liant la molécule d'ATP, DDX19 peut alors prendre en charge l'ARN du complexe de ribonucléoprotéines provoquant alors sa dissociation avec Gle1- $IP_6$  et l'activation de l'hydrolyse de l'ATP. Cette activité change la conformation tridimensionnelle de DDX19, modifiant alors l'organisation du complexe de RNPs et la libération de l'ARNm transporté dans le cytoplasme de la cellule (Figure 38)(Hodge et al. 2011, Noble et al. 2011).

CRM1 interagit également avec différents adaptateurs en présence de la protéine RAN liée au GTP pour permettre l'export de protéines à séquences d'export riches en leucines (NES), d'ARN messagers, des ARN ribosomaux et des snRNAs jusqu'à la queue cytoplasmique du NPC (Fornerod et al. 1997). Là, RANGAP associée à RANBP2 va hydrolyser le GTP lié à RAN, et libérant alors l'ARN transporté, par exemple, dans le cytoplasme (Hutten et Kehlenbach 2007). Très peu d'hélicases à domaine DExD/H sont connues à ce jour pour utiliser ce transport. Cependant, DDX3 semblerait lier directement CRM1 et permettre l'export des ARNs non épissés du VIH (Figure 38)(Mahboobi et al. 2015).



**Figure 38: Implication des hélicases à domaines DExD/H dans l'export nucléaire d'ARNs.** Adapté de Delaleau et Borden, 2015

## 6) Rôle dans les défenses innées

Pendant l'infection microbienne, diverses molécules de la cellule hôte reconnaissent des structures de pathogènes appelées PAMPs (Medzhitov et Janeway 2000). Ces structures incluent l'ADN ou l'ARN génomique, des intermédiaires de réplication et des ARNs double-brins. Les récepteurs qui les reconnaissent activent une cascade de signalisation afin de produire de l'interféron et d'autres molécules à fonction antimicrobiennes. Parmi ces senseurs d'acides nucléiques dérivés de pathogènes, figurent les hélicases à domaine DExD/H groupées sous le nom de « RIG-1-like receptors » (RLRs) et les hélicases à domaine DExD/H non-RLR.

Parmi les RLRs, nous retrouverons la protéine DDX58 aussi appelée RIG-1, l'hélicase MDA5 et DHX58 ou LGP2 déjà mentionnées précédemment. Elles contiennent toutes un cœur hélicase entre deux domaines RecA-like et un domaine de régulation en C-terminal qui permet la reconnaissance des PAMPs (Cui et al. 2008, Takahasi et al. 2009). La liaison du RLR à l'acide nucléique conduit à l'hydrolyse de l'ATP, l'oligomérisation du récepteur et sa translocation vers la mitochondrie où il interagit avec IPS-1 (protéine aussi appelée MAVS ou

CARDIF ou VISA) (Jensen et Thomsen 2012, Fullam et Schröder 2013, Vabret et Blander 2013). Cette interaction avec IPS-1 n'est possible qu'entre RIG-1 et MDA5 grâce à leur domaine CARD. LGP2 ne l'ayant pas, elle ne peut pas activer IPS-1 et donc initier l'expression de gènes antiviraux seule mais aurait un rôle dans la modulation de la réponse innée. En effet, étant donné que le domaine CTD de MDA5 a une affinité faible pour l'ARN double-brin, LGP2 pourrait servir de corécepteur pour augmenter l'habilité de MDA5 à reconnaître les longues structures d'ARN double-brin (Pippig et al. 2009). RIG-1 peut également reconnaître l'ARN double-brin mais aussi des ARNs simple-brins notamment ceux à l'extrémité 5' triphosphate non coiffé et les extrémités des ARNs double-brins à bases non appariées (Barbalat et al. 2011, Loo et Gale 2011). En reconnaissant ces structures, RIG-1 peut, en plus d'activer IPS-1, s'associer avec la protéine ASC conduisant à l'activation de la caspase 1 et la mise en place de la pyroptose (Poeck et al. 2010) et interagir avec STING (pour « Stimulator of IFN Genes ») au réticulum endoplasmique activant à son tour TBK1 et la production d'interféron de type I (Figure 26 – Page 46) (Ishikawa et Barber 2008, Zhong et al. 2008).

Parmi les hélicases non-RLRs pouvant reconnaître des PAMPs et permettre d'induire une réponse consistant à la mise en place de défenses innées figurent les hélicases DDX1, DDX3, DDX21, DDX41, DDX60, DHX9, DHX33, DHX36. Parce que leurs régions N et C-terminales diffèrent entre chacune d'elle, elles vont établir des liaisons avec différents acteurs de la cascade de signalisation conduisant à la mise en place d'un état antimicrobien.

DDX1 peut reconnaître le poly(I :C) dans les cellules dendritiques myéloïdes et former un complexe avec DDX21 et DHX36. Les deux dernières hélicases peuvent alors se lier au domaine TIR de TRIF et conduire à l'activation de NF- $\kappa$ B (Figure 39)(Zhang et al. 2011b).

DDX41 se lie plus spécifiquement à l'ADN grâce à son domaine DEAD. En reconnaissant l'ADN du pathogène, DDX41 peut alors interagir avec TBK1 et STING dans des cellules dendritiques myéloïdes. La diminution de l'expression de DDX41 dans ces cellules diminue en effet la production d'interférons et de cytokines en réponse à l'apport d'ADN (Figure 39)(Zhang et al. 2011c).

DDX60 serait un cofacteur de RIG-1, de MDA5, et de LGP2 dans la reconnaissance d'ARNs et d'ADNs étrangers car l'hélicase lie les RLRs et augmenterait la production d'interféron sans s'associer à IPS-1 (Figure 39)(Miyashita et al. 2011).

DHX9 est capable de lier des ARN double-brins grâce à son domaine N-terminal et lier les domaines CARDS de IPS-1 via sa partie C-terminale dans les cellules dendritiques myéloïdes. Cette liaison permet d'activer IRF3 et NF- $\kappa$ B pouvant ainsi transcrire des gènes d'interféron de type I. DHX9 agirait ainsi comme les RLRs RIG-1 et MDA5 pour mettre en place un état néfaste à la multiplication microbienne (Figure 39)(Zhang et al. 2011d). Dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes, DHX9 est connue pour lier les CpG non méthylés (très fréquents dans les génomes de microbes et rares chez les vertébrés) tout comme DHX36. DHX9 et DHX36 vont pouvoir activer la protéine MyD88 (pour « myeloid differentiation primary response gene 88 ») pour produire in fine le tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukine 6, interféron  $\beta$  grâce à DHX9 et interféron  $\alpha$  grâce à DHX36 (Kim et al. 2010).

DHX33 est connue pour reconnaître des ARNs cytosoliques et d'activer NLRP3 (pour « NLR Pyrin-domain containing 3 ») dans les macrophages. S'ensuit alors l'activation de la caspase 1 par clivage de la pro-caspase 1 et sécrétion d'interleukine 1- $\beta$  et d'interleukine pro-inflammatoire 18 (Figure 39) (Mitoma et al. 2013).

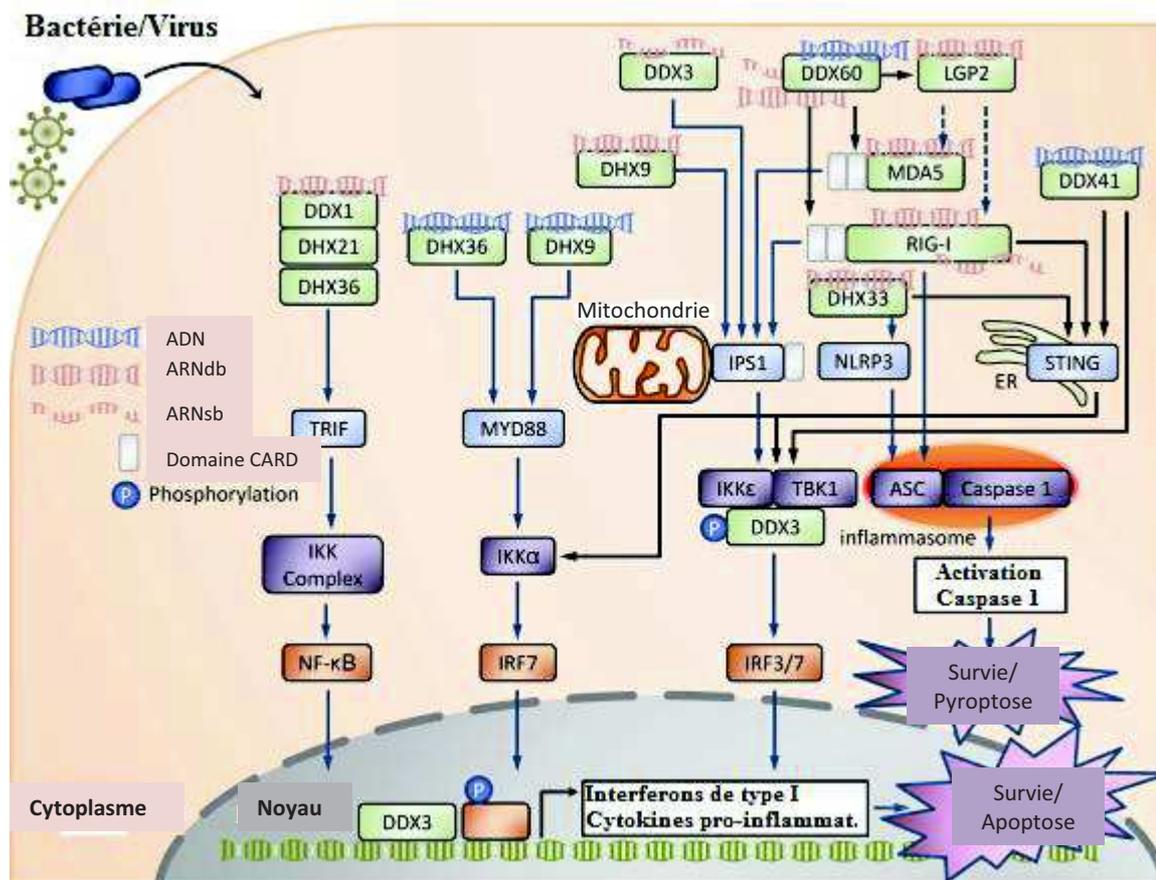


Figure 39: Reconnaissance d'acides nucléiques dérivés de pathogènes par les Hélicases à domaine DExD/H et réponses pour l'établissement de défenses innées. Adapté de Shih et Lee, 2014

Les hélicases à domaine DExD/H sont donc des molécules clés dans la biologie d'une cellule puisqu'elles permettent de réguler l'ensemble des mécanismes impliqués dans le métabolisme de l'ARN cellulaire depuis la transcription à la production d'une protéine et en agissant comme gardien de l'intégrité cellulaire contre les infections microbiennes. Parce que ces protéines ont un rôle central dans l'expression de gènes, l'assemblage et le modelage de Ribonucléoprotéines et dans la détection de pathogènes, de nombreux virus ont évolué pour recruter ces hélicases afin de les utiliser en tant que cofacteurs pro-viraux tout en échappant à l'établissement d'un état antiviral.

## C. Les hélicases à domaine DExD/H à l'interface de la réplication virale

### 1) Des facteurs antiviraux

La réplication des génomes viraux nécessite la présence de facteurs protéiques viraux, mais aussi cellulaires pour copier l'information génétique à partir d'une matrice, former des intermédiaires de la réplication et les séparer pour recommencer à répliquer le génome. Si le complexe de réplication du virus n'est pas abrité dans des structures closes ou si les

macromolécules cellulaires ne sont pas apportées de manière « contrôlée » par les protéines virales, des hélicases à domaine DExD/H peuvent alors reconnaître ces PAMPs et les signaler pour stopper la réplication virale.

### **a) Implication dans la reconnaissance de PAMPs**

Les plus connues des hélicases impliquées dans la reconnaissance des acides nucléiques étrangers sont DDX58 ou RIG-1 et MDA5. RIG-1 a une affinité particulière pour les ARNs et est donc un détecteur majeur d'acides nucléiques de la plupart des virus à ARN et de quelques virus à ADN. Le substrat préférentiel de RIG-1 est une extrémité 5' triphosphate non appariée de 10 à 300 paires de bases (Hornung et al. 2006, Kato et al. 2006, Pichlmair et al. 2006, Kato et al. 2008, Schmidt et al. 2009) mais l'hélicase peut également se lier une extrémité 5' diphosphate (Lu et al. 2010, Goubau et al. 2014) et des motifs de séquences poly-U/UC présents dans des génomes viraux (Saito et al. 2008, Lee et al. 2011, Schnell et al. 2012, Runge et al. 2014).

Ainsi, RIG-1 peut reconnaître l'extrémité 5' triphosphate du génome du virus de la rougeole (Plumet et al. 2007). De même, l'autre paramyxovirus Sendai, contient un génome à extrémités complémentaires résultant en une circularisation du génome avec un brin 5' saillant contenant cette même structure (Kolakofsky 1976). RIG-1 a ainsi la possibilité de l'identifier et de permettre de répondre à la présence du PAMP. Dans la continuité des virus à ARN négatif, le virus Influenza A active RIG-1 par l'extrémité 5' triphosphate de son ARN génomique simple brin (Pichlmair et al. 2006). Davis et ses collaborateurs démontrent ensuite que RIG-1 peut également se fixer en partie 3'UTR de cet ARN grâce à une région d'environ 40 nucléotides riche en A/U et formant une tige boucle. La présence d'adénines dans la boucle permet la synthèse d'Interféron  $\beta$  de manière RIG-1 dépendante et indépendamment de l'extrémité 5' triphosphate (Davis et al. 2012). Ce type de séquence est également présent chez le virus de l'hépatite C (HCV) et CHIKV. En effet, dans la partie 3' UTR de ces virus à ARN simple brin positif, des régions riches en uraciles chez HCV et en A/U chez CHIKV sont retrouvées comme ligand RIG-1 (Saito et al. 2008, Sanchez David et al. 2016). Les régions riches en dA/dT de génomes à virus à ADN double brin peut également entraîner l'activation de RIG-1. Tout comme le poly-(dA:dT), le génome des *Herpesviridae* (ex : Virus Epstein Barr) peut servir de matrice à l'ARN polymérase III qui produira des ARN double brins à extrémité 5' triphosphates reconnus par RIG-1. L'inhibition de la polymérase III par l'inhibiteur ML-60218 conduit à une perte de la synthèse de l'interféron suite à l'infection (Ablasser et al. 2009).

MDA5, comme nous l'avons déjà mentionné, reconnaît spécifiquement les longs ARNs double-brins et des structures branchées d'ARN. Si RIG-1 et MDA5 peuvent tous les deux fixer le poly(I :C) (imitant les ARNs double-brins viraux), la synthèse d'interféron de type I par son utilisation est majoritairement liée à l'hélicase MDA5 (Gitlin et al. 2006). En utilisant ce composé synthétique et en produisant des souris MDA5<sup>-/-</sup>, Gitlin et collaborateurs ont publié une étude prouvant que les coronavirus induisent une production d'interféron de type I grâce à la reconnaissance de duplexes d'ARN viraux par MDA5 (Gitlin et al. 2006). Les *Norovirus* se répliquent plus facilement dans les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse n'exprimant plus MDA5 qui en effet ne reconnaît plus l'ARN double brin produit lors de la réplication de ce virus à ARN simple brin à polarité positive (McCartney et al. 2008). Pichlmair et ses collaborateurs démontrent que les *Reovirus*, le virus de la vaccine et les *Alphavirus* sont capables d'activer MDA5, non pas grâce aux duplexes d'ARN mais par des ARN branchés au cours de leur réplication (Pichlmair et al. 2009).

Les implications individuelles de RIG-1 et MDA5 dans la reconnaissance des PAMPs ne sont à ce jour pas totalement bien comprises. Cependant, elles pourraient agir de manière synergique en reconnaissant différentes structures d'acides nucléiques à différentes étapes du cycle réplcatif viral (Fredericksen et al. 2008, Errett et al. 2013).

L'hélicase DDX3 a été décrite comme étant un acteur de la signalisation conduisant à la mise en place de l'état antiviral. Dans un premier temps, Soulat et collaborateurs ont démontré en 2008 que DDX3 interagit avec TBK1. En phosphorylant DDX3, TBK1 conduit l'hélicase à fixer le promoteur de l'interféron- $\beta$  et transcrire son gène (Soulat et al. 2008). Lors de l'infection par le virus de la vaccine, la protéine K7 inhibe la transcription du gène de l'interféron  $\beta$  au niveau des kinases IKK $\epsilon$  et TBK1 responsables de la phosphorylation d'IRF3/7. Cette inhibition est due à l'interaction de K7 avec DDX3 qui est alors incapable de lier le complexe IKK $\epsilon$ /TBK1 (Schroder et al. 2008) cet effet est similaire à l'action de la polymérase du virus de l'hépatite B (Yu et al. 2010). Après la publication de ces travaux, DDX3 est proposé comme liant directement IKK $\epsilon$ . La phosphorylation sur sa sérine 102 par IKK $\epsilon$  permet à DDX3 de recruter IRF3 et de l'activer pour aller transcrire le gène de l'interféron  $\beta$  (Gu et al. 2013) (Figure 39 - Page 71). Ainsi, le premier rôle antiviral de DDX3 est situé au niveau de la cascade de signalisation vers la transcription d'ARNm d'interféron  $\beta$ . Un second rôle lui est attribué en 2010 : en reconnaissant l'ARN viral, DDX3 peut se lier par sa partie C-terminale au domaine CARD de IPS-1 et activer la voie de signalisation aboutissant à la production d'IFN $\beta$  (Oshiumi et al. 2010) (Figure 39 – Page 71). DDX3 peut donc également être un « senseur » de PAMP.

La capacité de DDX3 à lier IPS-1 serait également partagée par DHX9 comme nous l'avons déjà décrit (Point IV.B.6 « Rôle dans les defenses innées » - Page 69). Les petits et longs poly(I :C) sont capables d'être reconnus par DHX9 qui s'associerait ensuite avec IPS-1 dans les cellules dendritiques myéloïdes (Zhang et al. 2011d). Cependant, il n'existe pour l'instant pas de preuves expérimentales que DHX9 interagirait avec IPS-1 en liant directement des ARN viraux.

L'hélicase DDX1 a été décrite comme impliquant DDX21 et DDX36 dans la reconnaissance des acides nucléiques du virus Influenza A et des *Réovirus*. En effet, Zhang et ses collaborateurs démontrent dans une autre publication en 2011, que la réduction d'environ 80% de l'expression de ces trois hélicases par shRNA entraînait une diminution de 60 à 70% de la production d'interféron  $\beta$  et de 40 à 50% de production de TNF- $\alpha$  lors de l'infection par le virus Influenza A. En infectant ces mêmes cellules dendritiques myéloïdes avec un Réovirus, ils obtiennent une diminution de 70 à 80% de la production d'interféron  $\beta$  et de 60 à 70% de celle du TNF- $\alpha$ . DDX1 serait en fait la seule impliquée dans la reconnaissance du PAMP. En formant un complexe ternaire avec DDX21 et DDX36, elle conduit à l'activation de TRIF (l'adaptateur de TLR3 et TLR4) et stimule ainsi la production d'interféron  $\beta$  et de TNF- $\alpha$  (Zhang et al. 2011b) (Figure 39 - Page 71).

DDX60 interagit avec les RLRs pour augmenter leur signalisation suite à la reconnaissance des acides nucléiques du pathogène. L'infection par le virus Sendai ou par le Poliovirus entraîne la production d'interféron  $\beta$  grâce au récepteur de PAMPs RIG-1 pour le virus Sendai (Kato et al. 2006) et à MDA5 pour Poliovirus (Barral et al. 2007). Miyashita et collaborateurs ont démontré que ces deux RLRs interagissent avec DDX60 et qu'en diminuant son expression, par shRNA dans des HEK293 et HeLa infectées par ces virus, les productions d'interféron  $\beta$  et des ISGs IP10, et IFIT1 sont réduites. Par ailleurs, DDX60 ne se fixe pas sur IPS-1 et IKK $\epsilon$  indiquant donc que l'effet de DDX60 est situé uniquement au niveau de la reconnaissance des ARNs viraux (Miyashita et al. 2011). Cette hélicase démontre

également un effet antiviral sur le virus de l'hépatite C. En effet, la surexpression de DDX60 dans des cellules d'hépatocarcinome Huh7 réduit d'environ de moitié la réplication de HCV (Schoggins et al. 2011). Ce mécanisme a été décrit l'étude d'Oshiumi et coll en 2015, démontrant que DDX60, ayant une homologie de séquence avec le cofacteur d'exosome SKIV2L, pouvait prendre en charge l'ARN d'HCV reconnu et entraîner sa dégradation par l'exosome en plus de son rôle dans son couplage avec MDA5 pour permettre la synthèse d'interféron de type 1 (Oshiumi et al. 2015).

Toutes ces hélicases seraient donc capables de reconnaître des PAMPs de virus à ARN. Les virus à ADN sont aussi susceptibles de voir leurs acides nucléiques détectés par les protéines à domaine DExD/H. En effet, les mêmes auteurs ont montré que DDX41 liait les ADNs via son domaine DEADc dans le cytoplasme de la cellule dendritique myeloïde. En réduisant son expression par shRNA, Zhang et ses collaborateurs observent une diminution significative de la production d'interféron de type I, d'interleukine 6 ou de TNF suite à l'infection par le virus Herpès Simplex 1 (HSV-1) et sans effet par celle du virus Influenza 1. DDX41 permettrait alors de reconnaître des ADNs et interagirait avec la protéine Sting et pour conduire à l'activation de la voie TBK1 (Figure 39- Page 71).

Si l'effet antiviral des hélicases à domaine DExD/H est d'abord causé par la reconnaissance d'acides nucléiques viraux dans la cellule infectée, ces protéines peuvent également former des structures de séquestration de molécules dont le virus aurait besoin pour se répliquer appelées « granules de stress »

## **b) Implication dans la formation de granules de stress**

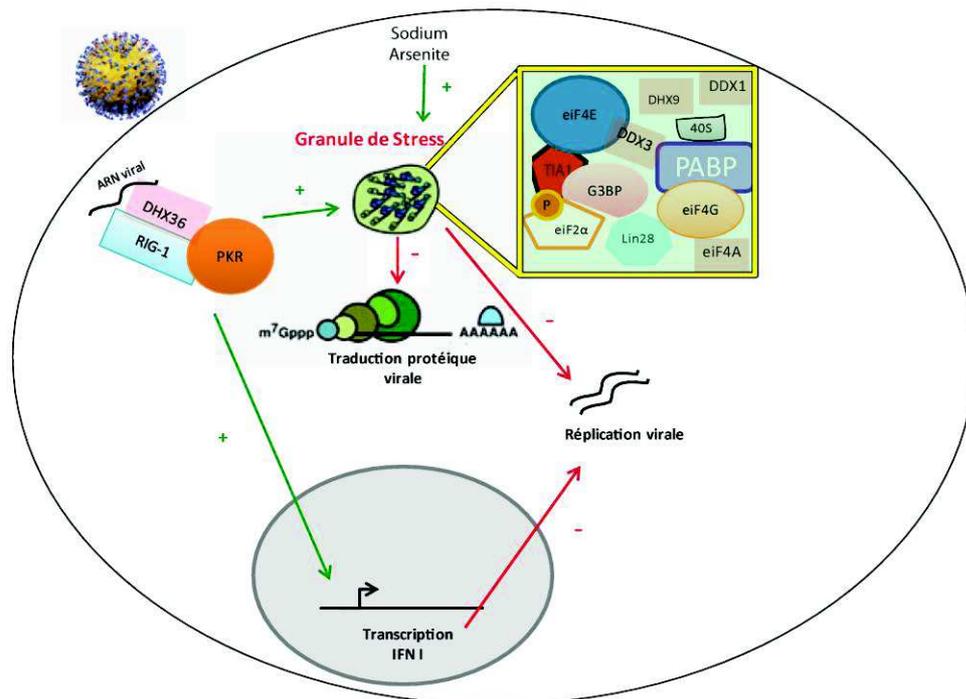
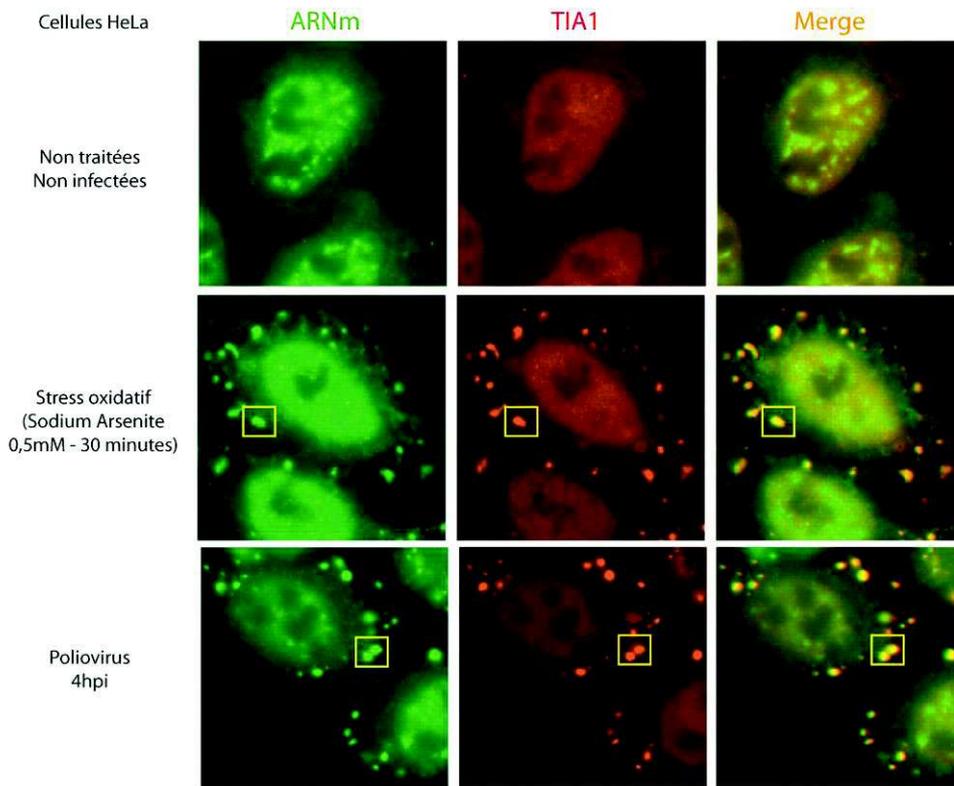
Les granules de stress apparaissent notamment lors de l'infection par des virus (Onomoto et al. 2014). Ce sont des structures cytoplasmiques dynamiques séquestrant des ribonucléoprotéines, des ARN messagers, des protéines impliquées dans le remodelage de ces acides nucléiques et dans l'initiation de leur traduction (Protter et Parker, 2016). L'infection d'une cellule par un pathogène viral peut conduire à la phosphorylation de la sérine 51 d'eIF2 $\alpha$  par une des quatre sérine/thréonine kinases : « double-stranded RNA-dependent Protein Kinase R » (PKR), « Heme-Regulated translation Inhibitor kinase » (HRI), « PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase » (Bien et al. 2004) et « General Control Nonderepressible 2 » (GCN2) (Anderson et Kedersha 2002). GCN2 se lie à des ARNs simple-brins viraux (Berlanga et al. 2006) ; La PERK est activée par l'accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique. Alors que les mécanismes d'activation de la kinase HRI sont aujourd'hui mal connus, PKR serait activée par la reconnaissance cytoplasmique d'ARNs double-brins et grâce à son interaction avec IPS-1 (Zhang et al. 2014). Les granules de stress sont visibles dans une cellule lorsqu' eIF2 $\alpha$  est phosphorylée. La phosphorylation va entraîner une inhibition de la traduction des ARNs présents dans le cytoplasme en les sequestrant avec des complexes d'initiation de traduction parce qu'eIF2 $\alpha$  phosphorylée ne peut apporter l'ARNt-Méthionine à l'AUG. En plus de ces protéines, d'autres impliquées dans la liaison à l'ARN comme T-cell-restricted intracellular antigen-1 (TIA1), Ras GAP SH3-domain-binding protein (G3BP) ou d'autres protéines cellulaires comme la p90 ribosomal S6 kinase 2 (RSK2), Ras homolog gene family member A (RhoA) et la sérine/thréonine kinase Rho-associated coiled-coil forming kinase 1 (ROCK1), IPS-1, MDA5 et RIG-1 y sont également retrouvées (Anderson et Kedersha 2002, Tsai et Wei 2010, Onomoto et al. 2012).

DDX3 est une hélicase présente dans les granules de stress. En plus d'être impliquée dans la transcription d'ARNm, l'épissage, transport d'ARN, elle est aussi associée à des

complexes traductionnels (Lee et al. 2008, Shih et al. 2008). Grâce à son motif <sup>38</sup>YIPPHLR<sup>44</sup> de son domaine N-terminal, DDX3 est capable de lier eIF4E et PAB1 par son cœur enzymatique au cours d'un stress cellulaire. Ces liaisons semblent nécessaires pour la formation de granules de stress lors de l'utilisation de sorbitol pour induire un stress osmotique (Shih et al. 2012). Bien que le mécanisme exact de formation de granules de stress par DDX3 ne soit pas exactement connu, il est possible qu'en liant des protéines de complexes traductionnels, DDX3 agirait comme une protéine de pontage. L'infection de cellules par le virus Influenza A induit la formation de granules de stress contenant DDX3 et la diminution de son expression par siRNA semble interférer avec la formation de granules de stress. L'utilisation de ces ARNs interférant avec l'expression de DDX3 montre également une augmentation de la réplication du virus Influenza A démontrant que la mise en place de granules de stress par DDX3 est néfaste à la réplication de ce virus (Thulasi Raman et al. 2016).

DHX36 a également été retrouvée dans les granules de stress induits par l'infection du virus Influenza A. En aidant RIG-1 à la reconnaissance du génome du virus de la grippe A, l'hélicase active ensuite la PKR qui peut alors former les granules de stress (Yoo et al. 2014). Les cellules MEF déficientes en DHX36 et infectées par le virus Influenza A produisent alors moins d'interféron de type I, moins de granules de stress et la réplication virale est augmentée (Yoo et al. 2014) (Figure 40).

Le rôle de ces hélicases dans la formation de granules de stress est encore mal connu. DDX1, DDX5, DDX17 et DHX9 ont été retrouvées associées à ces granules mais leurs fonctions dans ces granules sont encore inconnues (Onishi et al. 2008, Jain et al. 2016).



**Figure 40:** Schéma de l'implication des hélicases DHX36, DDX3 dans la mise en place de granules de stress et d'un état réfractaire à la réplication virale. L'infection virale de cellules HeLa ou le traitement par l'Arsenite de Sodium conduit à la formation de granules de stress cytoplasmique séquestrant ARN messagers, et la protéine de liaison à l'ARN TIA1 (Cytotoxic Granule-Associated RNA Binding Protein). Images de microscopie à fluorescence provenant de (Piotrowska et al. 2010). Les rectangles jaunes encadrent les granules de stress. La reconnaissance des ARNs viraux (ici du virus Influenza A) par DHX36 et RIG-1 active PKR et induit la phosphorylation d'eIF2α et la cascade de signalisation vers la synthèse d'interféron de type I. Les granules de stress se forment avec au sein de ceux-ci un pontage de DDX3 avec des facteurs d'initiation de la traduction bloquant ainsi le cycle réplcatif viral.

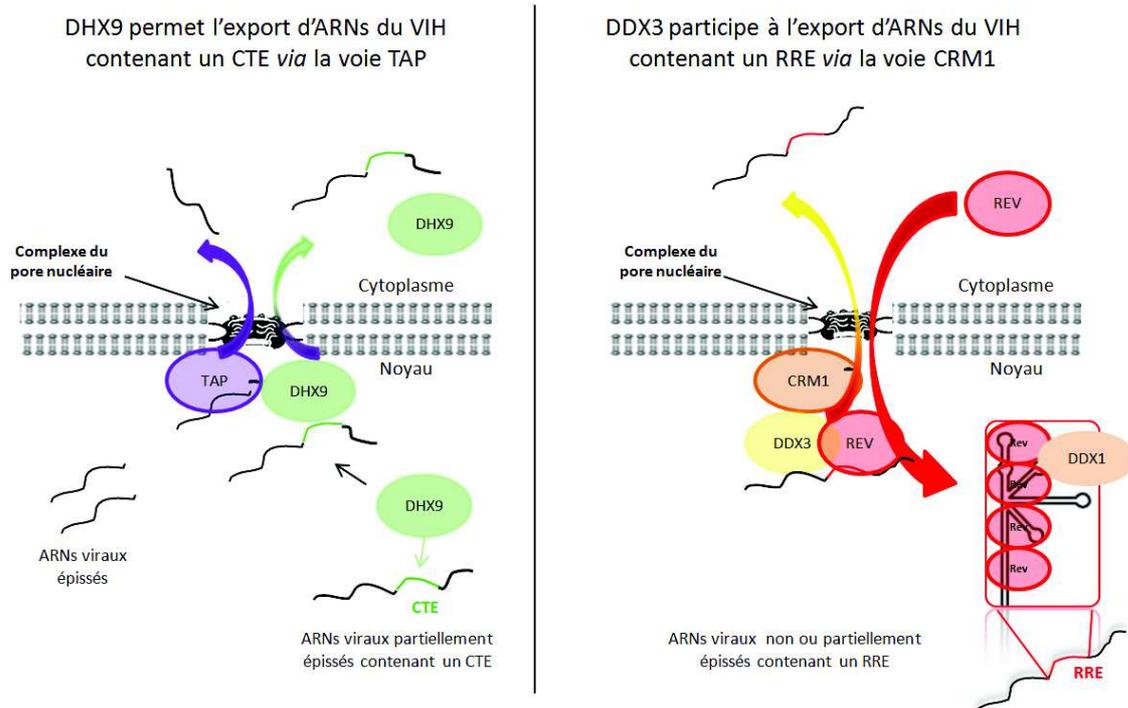
Les hélicases à domaines DExD/H sont donc des facteurs antiviraux reconnaissant les PAMPs du pathogène ou en participant à l'activation de voies de signalisation de production de molécules antivirales comme les interférons  $\alpha$  et  $\beta$ . De plus, certaines d'entre elles, et notamment DDX3, sont impliquées dans la structuration de granules de stress qui vont empêcher les virus d'utiliser des molécules nécessaires pour la réplication de leur génome et la traduction de leurs protéines. Ces conditions néfastes à toute multiplication doivent être évitées et donc, les virus ont évolué en détournant ces mécanismes tout en profitant de leurs fonctions dans le remodelage d'ARN, et de ribonucléoprotéines. Ces facteurs antiviraux peuvent en effet devenir des cofacteurs pro-viraux.

## **2) Des cofacteurs pro-viraux**

Parmi les effets pro-viraux que peuvent avoir les hélicases à domaine DExD/H on retrouve le transport d'ARN, la régulation de la traduction et de la réplication du génome viral.

### **a) Le transport des ARNs viraux**

Les rétrovirus ont un cycle de réplication complexe puisque leur génome en ARN sert de matrice pour l'étape de transcription inverse permettant la synthèse d'une molécule d'ADN dans le cytoplasme. Cet ADN s'intègre ensuite dans l'ADN de la cellule hôte grâce à l'intégrase virale et est transcrit en plusieurs types d'ARNs viraux qui doivent être exportés du noyau afin d'être traduits par exemple. Le type d'export nucléaire emprunté par les ARNs rétroviraux est dépendant de l'état d'épissage des transcrits et leur prise en charge est effectué par des hélicases à domaine DExD/H. En effet, les ARNs non épissés ou partiellement épissés du VIH contiennent une séquence de 350 nucléotides appelée RRE pour « Rev-Responsive Element ». Comme indiqué par son nom, la protéine Rev du VIH, importée dans le noyau, se fixe sur ces séquences grâce à son oligomérisation par DDX1, et grâce à son NES riche en leucines, Rev permet l'export de ces ARNs via CRM1 (Daelemans et al. 2002, Robertson-Anderson et al. 2011). Cet export nucléaire par Rev nécessiterait également DDX3 qui en se liant à Rev et CRM1 faciliterait la sortie des ARNs contenant la séquence RRE (Yedavalli et al. 2004). Les ARNs épissés de VIH, n'ayant pas de RRE, utilisent la voie TAP. Cette voie d'export est aussi empruntée par des ARNs viraux contenant une séquence possédant une structure en tige-boucles CTE pour « Constitutive Transport Element » ancrée par DHX9 et TAP (Gruter et al. 1998, Reddy et al. 2000, Westberg et al. 2000). DHX9 en se liant à cette séquence permet l'export des ARNs grâce à son domaine de translocation nucléaire bidirectionnel en C-terminal et à la liaison du domaine N-terminal de TAP (Figure 41) (Tang et Wong-Staal 2000).



**Figure 41: Les hélicases DHX9 et DDX3 permettent l'export nucléaire d'ARNs du VIH. DHX9 reconnaît les ARNs partiellement épissés contenant un CTE et promeut leur export nucléaire par la voie TAP. DDX1 permet l'oligomérisation de Rev sur la séquence RRE des ARNs du VIH partiellement ou non épissés. L'hélicase DDX3 forme ensuite un complexe avec la protéine Rev et conduit à leur export nucléaire par la voie CRM1.**

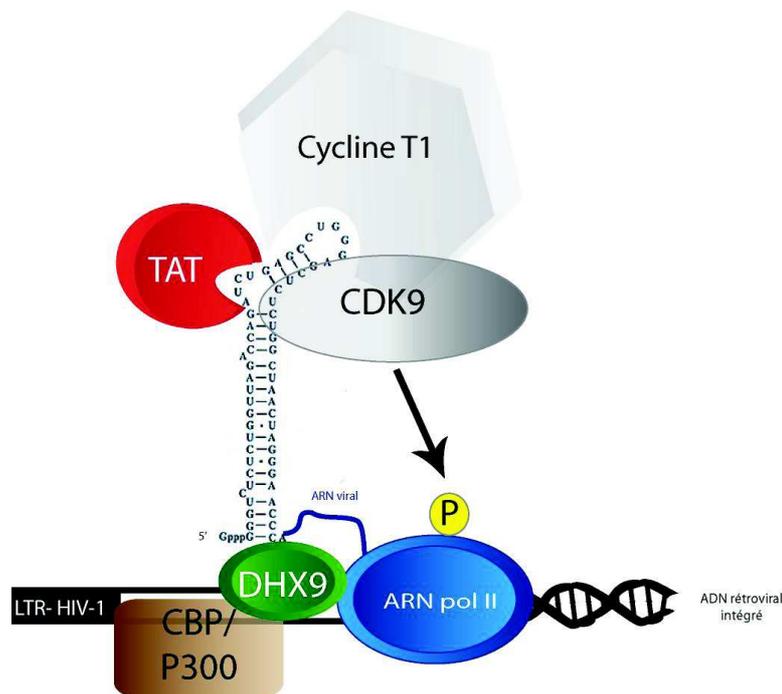
## b) Implication dans la transcription et réplication de génomes viraux

Les hélicases à domaine DExD/H ont un rôle central dans la synthèse d'ARNs viraux en facilitant la transcription de gènes ou en assistant les complexes de réplication des pathogènes à répliquer leur génome pour palier l'absence d'hélicase virale ou à leur manque d'efficacité dans la séparation des intermédiaires de réplication de leur matrice.

Le polyomavirus John Cunningham à génome en double-brin d'ADN circulaire se réplique dans le noyau d'oligodendrocytes. Pour exprimer ses protéines, le virus doit transcrire ses gènes à partir du promoteur « Transcription control region ». L'hélicase nucléaire DDX1 a été retrouvée associée à ce promoteur et la surexpression de cette protéine augmente l'efficacité de la transcription virale en transactivant le promoteur TCR (Sunden et al. 2007). Il semblerait que DDX1 n'affecte pas la réplication du génome viral, mais que l'activation du promoteur du virus John Cunningham permette à une cellule d'être permissive au virus et ce de manière DDX1 dépendante. En effet, Sunden et ses collaborateurs ont trouvé que DDX1 est beaucoup plus exprimée dans les cellules IMR-32, permissives au virus, que dans les cellules HeLa, HEK293, A549, et SW480 dans lesquelles le virus ne peut se multiplier (Sunden et al. 2007).

Après intégration du génome du VIH-1 dans le génome de la cellule hôte, le facteur NF- $\kappa$ B se lie au LTR « Long Terminal Repeat » et stimule l'expression du génome viral (Nabel et Baltimore 1987, Griffin et al. 1989). Cette expression est divisée en deux phases : dans la phase précoce, les ARNm viraux, codant pour les protéines de régulations notamment Tat et

Rev, sont épissés et sont exportés par TAP. Dans la phase tardive, des ARNm viraux partiellement ou non épissés sont produits et codent pour les protéines structurales du virus, en plus de l'ARN génomique (Muesing et al. 1985, Kim et al. 1989). Comme déjà évoqué, Rev permet l'export de ces ARNs par CRM1. Tat par contre va se fixer sur une tige-boucle du « trans-activating response element » TAR en 5' des transcrits de VIH-1. En se fixant dessus, Tat modifie le complexe transcriptionnel en recrutant d'autres partenaires, notamment la kinase cycline dépendante CDK9 et permet alors la transcription d'ARN du rétrovirus par phosphorylation de la sous-unité large de l'ARN polymérase II (Herrmann et Rice 1995, Gold et al. 1998). Fujii et collaborateurs, en 2001 ont démontré que DHX9 pouvait se fixer sur TAR et permettre la synthèse de transcrit par l'ARN polymérase II, soit en dépliant les structures secondaires de l'ARN, soit en médiant l'association de CBP/p300 avec l'ARN polymérase II (Figure 42)(Fujii et al. 2001).



**Figure 42: DHX9 promeut la transcription d'ARN du VIH en s'associant à la structure secondaire TAR du transcrit naissant.**

Plusieurs hélicases à domaines DExD/H participent à la réplication de différents virus. En effet, dans le cas du virus de l'hépatite C, DDX3 semblerait diminuer de plus de 10 fois la quantité d'ARN lorsqu'elle est inhibée par shRNA dans des Huh7 (Ariumi et al. 2007). Ce résultat a été confirmé par une étude d'ARN interférence à grande échelle afin de trouver des cofacteurs de la réplication du virus de l'hépatite C (Randall et al. 2007). L'hélicase DDX5 semblerait également jouer un rôle dans la réplication de ce virus. D'après Goh et coll., elle permettrait de synthétiser de l'ARN à polarité négative à partir du brin positif en association avec la polymérase NS5B. En effet, cette dernière entraîne la relocalisation cytoplasmique de l'hélicase nucléaire DDX5 dans des foyers où les deux colocalisent. Une réduction de l'expression de l'hélicase par siRNA entraîne une nette diminution de la synthèse du brin négatif sans modifier les niveaux de synthèse du brin positif (Goh et al. 2004). En plus de DDX3 et DDX5, DHX9 et DDX6 semblent être importantes dans la réplication de ce virus. En utilisant un système d'interférence inducible, l'équipe d'He affirment que DHX9 est un cofacteur de la réplication du HCV (He et al. 2008). En 2014, You et coll. démontrent qu'en

réduisant d'environ 70% de l'expression de DHX9 par siRNA dans des Huh7.5, la réplication du virus HCV diminue d'environ 10% confirmant que DHX9 peut en effet être un cofacteur de la réplication virale. DDX6 serait également importante pour la réplication de ce virus et des autres *Flavivirus* comme les virus West Nile (Chahar et al. 2013) et Dengue (Ward et al. 2011), mais son mécanisme d'action reste encore inconnu (Jangra et al. 2010, Huys et al. 2013). De même, DDX1 a été décrite comme interagissant avec l'extrémité 3' UTR du brin positif et 5' du brin négatif mais son rôle supposé dans la réplication n'a pas été confirmé (Tingting et al. 2006). Par contre, le coronavirus de la bronchite infectieuse code pour une protéine non-structurale nsP14 capitale dans la réplication du coronavirus. En effet, Minskaia et coll. ont publié une étude biochimique démontrant que cette enzyme, en plus d'assurer la fidélité pendant la réplication du génome viral, possède une fonction exoribonucléase de 3' en 5' (Minskaia et al. 2006). Ces fonctions démontrent que nsP14 est une protéine actrice de la réplication du génome viral. DDX1 est recrutée par nsP14 dans les sites de réplication du Coronavirus. L'inhibition de sa présence par siRNA montre une diminution de la synthèse d'ARN viral et l'utilisation d'une forme mutante n'exprimant plus l'activité hélicase et ATPase démontre que ces fonctions sont nécessaires pour la synthèse de l'ARN (Xu et al. 2010).

Le *Picornavirus* Foot and Mouth Disease utiliserait également DHX9 pour se répliquer. En effet Lawrence et Rieder démontrent en 2009 que la protéine DHX9 est relocalisée dans le cytoplasme après infection du *Picornavirus*. L'hélicase se fixerait au 5'UTR du génome viral avec des protéines impliquées dans la traduction et favoriseraient la traduction, réplication et production de particules virales. En effet l'inhibition de l'expression de DHX9 par siRNA montre une diminution de l'expression protéique virale, et une diminution de particules virales infectieuses produites (Lawrence et Rieder 2009). Cette hélicase serait également importante dans le cycle réplcatif du virus Influenza. DHX9 est en effet liée par NS1 grâce à de l'ARN. L'inhibition de l'expression de l'hélicase conduit à la réduction de la synthèse de protéines et d'ARN viral (Lin et al. 2012). L'*Arterivirus* responsable du syndrome respiratoire et reproductif porcin (PRRSV) à long ARN positif simple brin de 15Kb se réplique en produisant des ARNs subgénomiques de différentes tailles. Le virus utilise aussi DHX9 pour la synthèse de son ARN génomique et de long ARN subgénomiques (Liu et al. 2016). Sa protéine de nucléocapside lie l'hélicase et permet son recrutement aux complexes de réplication du virus où l'ARN polymérase ARN dépendante nsP9 synthétise les acides nucléiques viraux. L'utilisation de shRNAs inhibant la synthèse de DHX9 de 60% dans des cellules de rein simien MARC145 entraîne diminution de 30 % de la synthèse d'ARN génomique et de 40 % celle des longs ARNs subgénomiques. La surexpression de DHX9 confirme l'effet pro-viral de DHX9 dans la synthèse de ces ARNs et particulièrement dans la transcription des acides nucléiques subgénomiques. Les auteurs de cette étude proposent donc un rôle de DHX9 dans la suppression des structures secondaires de l'ARN pour assister l'avancement de la polymérase nsP9 sur la matrice ARN (Liu et al. 2016).

Le mécanisme exact de chaque hélicase dans la stimulation de la réplication des virus n'est pas connu de manière précise. En revanche, certaines d'entre elles pourraient jouer un rôle spécifique dans l'expression de protéines virales.

### c) Implication dans la traduction de protéines virales

La traduction des protéines virales est une étape primordiale dans le cycle de multiplication du virus. Elle permet en effet de produire les enzymes du virus impliquées dans la réplication du génome et les protéines de structures nécessaires à la formation de nouveaux virions. L'initiation de la traduction est en premier lieu dépendante de l'organisation structurale de l'ARN viral. Le virus de l'hépatite C possède une séquence IRES dans sa partie 5'UTR. Ces arrangements en tige-boucles de sa partie 5'UTR permet à l'ARN de recruter le pré-complexe d'initiation de la traduction 43S (PIC) sans le complexe eIF4F, eIF1, eIF1A, et eIF4B (Pestova et al. 1998, Kieft et al. 2001). DDX3 s'associerait au complexe PIC en se liant à eIF3 et la sous-unité ribosomale 40S. Ce complexe s'assemble ainsi au niveau du codon initiateur AUG dans la séquence IRES induisant la modification de conformation du complexe et la libération de facteurs d'initiation. DDX3 peut alors recruter la sous-unité 60S pour former le ribosome 80S. Geissler et coll démontrent qu'en inhibant l'expression de DDX3 par siRNA dans des Huh7 transfectées avec un réplicon d'HCV contenant la séquence IRES et l'extrémité 3'UTR du virus, la production de protéines virale par western-blot est réduite. Lorsque la construction de l'IRES de HCV suivie d'un rapporteur luciférase est transfectée dans les mêmes conditions, une inhibition de 40% de la production de la luciférase est mesurée. DDX3 semble donc importante dans la traduction IRES dépendante des protéines virales (Geissler et al. 2012).

DHX9 serait également impliquée dans la stimulation de la traduction de l'ARNm de JunD. En effet, elle promeut sa traduction en se liant aux structures secondaires présentes en 5' UTR appelées « Post-transcription Control Elements » (PCE). Ces dernières sont retrouvées chez les rétrovirus dont HTLV-1 et VIH (Bolinger et al. 2007, Bolinger et al. 2010). L'ARN codant pour Pr55Gag du VIH est exporté grâce à la séquence RRE reconnue par Rev. Cet ARN arbore en 5' UTR un PCE, qui permet l'expression de la protéine Pr55Gag. Bolinger et coll. démontrent que DHX9, en se liant au PCE et grâce à son activité hélicase-NTPase, permet de traduire de manière efficace la protéine Pr55Gag puisque la réduction de l'expression de DHX9 diminue significativement la synthèse du précurseur du Pr55Gag (Figure 43) (Bolinger et al. 2010).

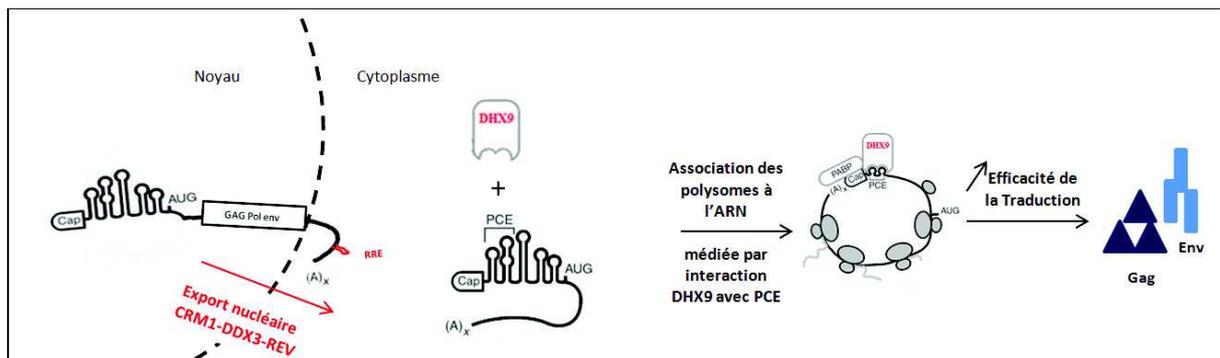


Figure 43: DHX9 en se liant au PCE des ARN rétroviraux augmente l'efficacité de la traduction en permettant le recrutement de polysomes sur l'ARN viral. Inspiré de Bolinger et al, 2010

#### **d) Implication dans l'encapsidation du génome viral et dans l'infectiosité des particules produites**

En plus de son rôle dans l'augmentation de l'efficacité de la traduction de protéines du VIH, Bolinger et coll., démontrent que DHX9 est incorporée dans les virions sans être nécessaire à l'encapsidation du génome viral. En effet, lorsque des cellules sont transfectées avec un siRNA contre la protéine DHX9 ou contrôle, des virions bourgeonnent à la membrane plasmique et sont libérés dans le surnageant des HEK293T. Il a été découvert par qRT-PCR avec des amorces ciblant la séquence codant pour la Pr55Gag, qu'il n'y avait aucune différence en terme de quantité de génomes encapsidés dans les virions issus des cellules exprimant des niveaux différents de DHX9. Par contre, les virions de cellules exprimant moins DHX9 sont moins infectieux (Bolinger et al. 2010). Alors que Roy et coll., émettaient l'hypothèse que cette hélicase encapsidée pourrait affecter l'étape de transcription inverse, Bolinger et coll. ont démontré que cette étape spécifique n'était pas modifiée en présence ou absence de DHX9 (Roy et al. 2006, Bolinger et al. 2010). Le rôle de la protéine DHX9 encapsidée n'est toujours pas connu, mais pourrait selon ces derniers auteurs, permettre l'association du génome avec des protéines virales auxiliaires et rendre les virions synthésés plus infectieux (Bolinger et al. 2010).

En ce qui concerne l'encapsidation de génomes viraux par des protéines à domaine DExD/H, seule une étude confirme le rôle pro-viral d'une de ces hélicases. L'hélicase DDX24, dans le cadre du cycle répliatif du VIH, serait en effet impliquée dans l'encapsidation du génome viral. Elle interagirait avec les protéines Pr55Gag et sa chute d'expression conduirait à une réduction de l'encapsidation de l'ARN génomique dans les nouveaux virions dépendante (Ma et al. 2008). Le mécanisme reste encore méconnu mais Ma et collaborateurs proposent un rôle de DDX24 dans le réarrangement de structures secondaires de l'extrémité 5'UTR en structures branchées avec plusieurs tige-boucles permettant de présenter les signaux de dimérisation d'ARN et d'encapsidation, nécessaires à l'incorporation du génome dans la particule virale (Ma et al. 2008)

Les hélicases à domaine DExD/H, grâce à leurs multiples fonctions dans les processus faisant intervenir de l'ARN, sont des cofacteurs pro-viraux essentiels dans le cycle répliatif de virus. Certaines de ces protéines peuvent ainsi être recrutées aux sites de transcriptions de gènes viraux intégrés dans le génome de la cellule hôte, d'autres vont permettre par la suite l'export nucléaire des ARNs rétroviraux synthésés. Dans le cytoplasme, on les retrouve associées aux complexes de répliation viraux participant à la synthèse d'intermédiaires répliatifs, liées à des facteurs de la traduction participant alors l'expression de protéines virales en remodelant la structure des ribonucléoprotéines ou du support nucléique codant pour les protéines virales. Enfin, certaines d'entre elles sont utiles dans l'encapsidation du génome viral et dans l'infectiosité des nouveaux virions formés.

## **Chapitre II-      Projet de Recherche et Résultats**

## I. Objectifs des travaux de recherche

Malgré son identification ancienne, le CHIKV reste peu étudié. L'élucidation des mécanismes de réplication de ce virus constitue une condition préalable à l'identification de cibles thérapeutiques permettant l'élaboration de molécules anti-infectieuses ainsi qu'à la sélection d'épitopes spécifiques pour la mise en place d'une stratégie de vaccination. La réplication du CHIKV est un processus de copie du génome viral qui bénéficie à la fois d'une structure membranaire de protection et de recrutements de cofacteurs cellulaires assistant le complexe de réplication dans la synthèse de nouveaux génomes viraux. Une compréhension détaillée de ce processus de réplication viral permettrait alors aussi d'identifier de nouveaux cofacteurs et de définir ainsi de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Notre programme de recherche concerne donc la caractérisation des complexes de réplication du CHIKV aussi bien dans son aspect fonctionnel que structural.

Les travaux de Varjak et de ses collaborateurs en 2013 ont permis d'identifier des cofacteurs cellulaires enrichis aux complexes de réplication du virus Semliki Forest. Parmi les protéines présentes aux sites de réplication du virus, les hélicases DHX9 et DDX3 ont été identifiées comme faisant partie des protéines les plus enrichies dans ces compartiments (Varjak et al. 2013). Aucune étude identifiant des cofacteurs cellulaires de la réplication de CHIKV n'a été publiée à ce jour, mais des études d'interactions entre les protéines non-structurales virales et des protéines de cellule hôte ont permis de révéler de possibles partenaires de la réplication virale. Bouraï et ses collaborateurs ont en effet démontré par double-hybride que l'énigmatique nsP3 de CHIKV est capable d'interagir avec DHX9 sans dévoiler la fonction de cette hélicase dans le cycle de multiplication du virus. Les *Alphavirus* possèdent une hélicase, nsP2. Pourquoi les virus Semliki Forest et Chikungunya, recruteraient des hélicases si leur génome code pour l'hélicase nsP2 ? Le groupe d'Andres Merits a étudié l'activité hélicase de nsP2 et discute alors son impossibilité de séparer le brin d'ARN génomique négatif néosynthétisé, apparié avec le brin positif. En effet, nsP2 serait une hélicase dépendante d'une extrémité 5' non appariée. Or, les duplexes d'ARNs génomiques ne laisseraient que des extrémités 3' non appariées (Das et al. 2014b). Un recrutement d'hélicases cellulaires pourrait ainsi initier la séparation de l'intermédiaire de réplication avec sa matrice positive. Une autre fonction possible serait le dépliement de structures secondaires formées par des bases appariées au sein d'un d'ARN génomique. Les hélicases à domaine DExD/H, DDX5, DDX17, DHX9 ont été décrites comme se liant à des tiges-boucles d'ARN afin de faciliter soit l'épissage d'ARNs pré-messagers, soit l'expression de protéines codées par ces acides nucléiques (Kar et al. 2011, Manojlovic et Stefanovic 2012, Moy et al. 2014). Les ARNs des *Alphavirus*, du CHIKV, possèdent également des structures secondaires qui nécessiteraient éventuellement l'intervention d'hélicases cellulaires (Pardigon et Strauss 1992, Frolov et al. 2001, Nickens et Hardy 2008, Kim et al. 2011a, Reynaud et al. 2015). Nous nous sommes donc intéressés au cours de cette thèse au rôle de certaines hélicases à domaine DExD/H, et plus particulièrement de DHX9, dans le cycle de multiplication du virus Chikungunya.

Une autre partie de ce projet de thèse concerne la caractérisation structurale de ce complexe de réplication. Les sphérules répliquatives du CHIKV, formées à la membrane plasmique, sont des protrusions membranaires, de 50-70nm de diamètre, à relief négatif. L'organisation des protéines non-structurales formant le complexe de réplication, au sein de la sphérule, est inconnue, ni même les protéines cellulaires aidant la genèse de cette structure membranaire. Nous avons ainsi entrepris en collaboration avec l'équipe du Dr. Patrick BRON, au Centre de Biochimie Structurale de Montpellier, une étude de la morphologie de ces sphérules par la technique de Cryo-Microscopie Electronique (Cryo-EM). Au sein de

notre laboratoire, nous avons étudié le possible recrutement aux complexes de réplication, de protéines à domaine BAR, capables de conduire à la déformation des membranes cellulaires.

## **II. Etude fonctionnelle du complexe de réplication du CHIKV**

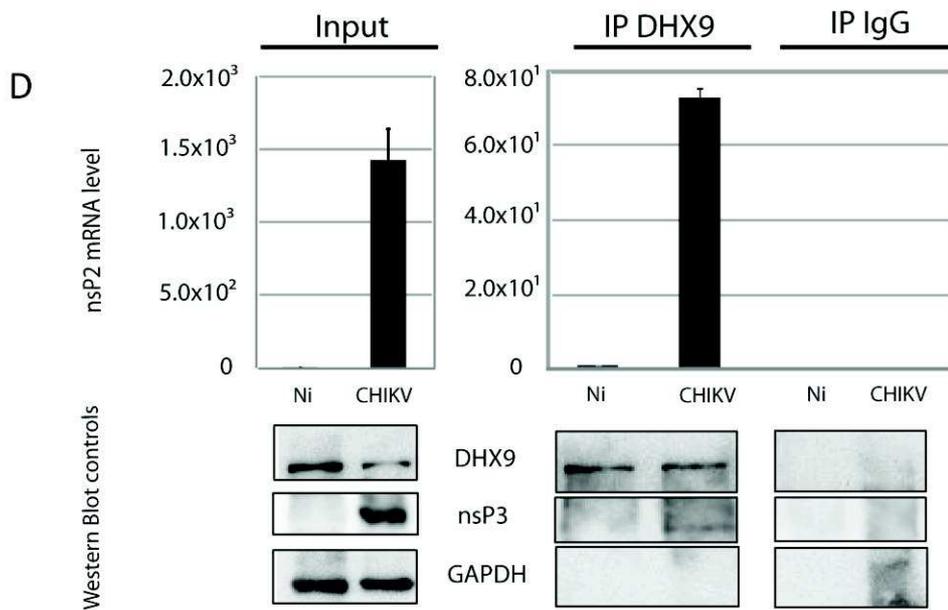
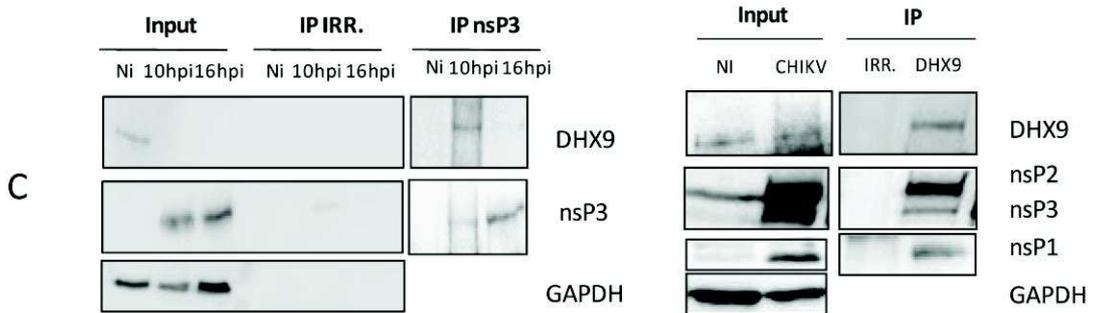
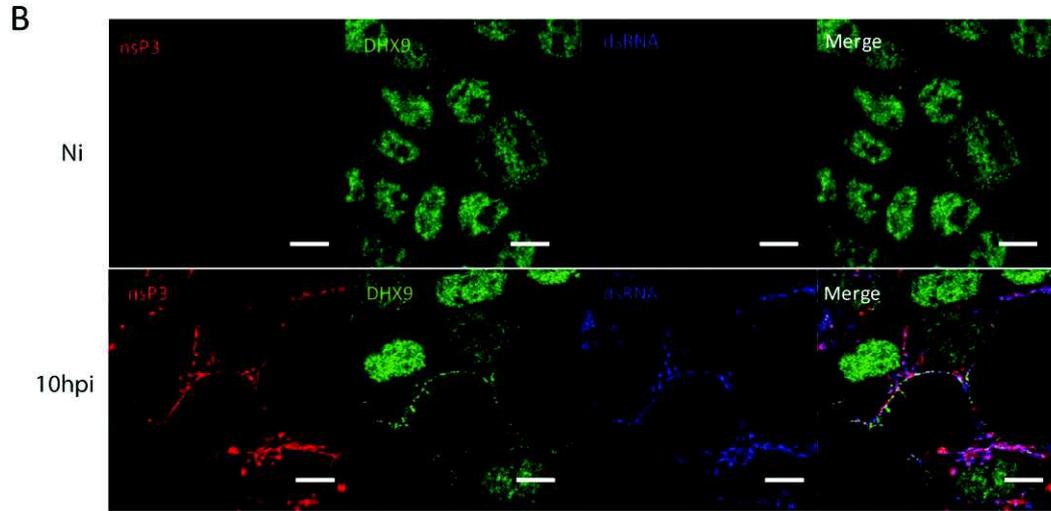
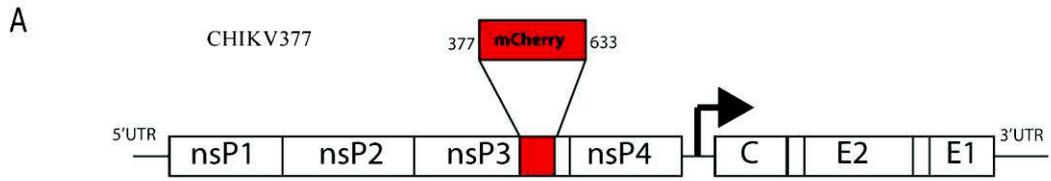
### **A. Implication de protéines à domaine DExD/H dans le cycle de réplication du virus Chikungunya : DHX9 une protéine à deux visages**

#### **1) DHX9 est relocalisée au complexe de réplication du CHIKV**

DHX9 ou l'ARN hélicase A (RHA) est une protéine ubiquitaire, majoritairement nucléaire, mais pouvant aussi transiter entre le compartiment nucléaire et cytoplasmique (Smith et al. 2004, Fujita et al. 2005, Aratani et al. 2006). Dans le contexte d'une infection virale et plus particulièrement celui des *Alphavirus* comme le virus Semliki Forest, DHX9 est recrutée dans les complexes de réplication cytoplasmique (Varjak et al. 2013). En nous basant à la fois sur cette observation et sur des résultats récents décrivant l'interaction en double-hybride de la protéine nsP3 du CHIKV avec DHX9, notre but a été d'évaluer si cette hélicase pouvait être localisée au niveau des complexes de réplication du CHIKV et si ce recrutement dans ces organelles spécialisées avait une conséquence sur la réplication du CHIKV ou sur le cycle de multiplication du virus. Dans un premier temps, nous avons comparé la distribution de DHX9 dans les cellules HEK293T infectées ou non par un virus CHIKV contenant un tag mCherry au sein de la protéine nsP3, pendant 10h et 16h post-infection (Figure 44A et 44B). L'hélicase est localisée principalement dans les noyaux de HEK293T non infectées. En revanche, lorsque les cellules sont infectées par le CHIKV (10h post-infection), DHX9 est en partie relocalisée à la membrane plasmique et co-localise avec nsP3 et l'ARN double brin, marqueur de la réplication virale (Figure 44A et 44B). A 16h post-infection, DHX9 n'est plus retrouvée associée aux membranes ni à nsP3 ni à l'ARN double brin (non montré). L'hélicase nucléaire DHX9 peut donc être en partie relocalisée près des sites de réplication du CHIKV.

Puisque DHX9 est localisée dans les mêmes sites que nsP3 et l'ARNdb constituants du complexe de réplication du CHIKV, nous avons exploré l'interaction de l'hélicase DHX9 avec les protéines non-structurales formant le complexe de réplication en utilisant la technique d'immuno-précipitation. Des cellules HEK293T ont été infectées par le CHIKV pendant 10h et 16h. Les cellules ont été lysées, les protéines récupérées ont été mises en contact avec un anticorps anti-nsP3 (Andres Merits) ou avec un anticorps anti-HA (irrelevant) (Figure 44C) ou avec un anticorps anti-DHX9 (Figure 44C). Les protéines liées aux complexes protéiques immuno-précipités sont identifiées après migration sur gel SDS/PAGE et Western Blot. Ainsi, à 10h post-infection, DHX9 est liée à nsP3 et au complexe nsP1/nsP2/nsP3 (Figure 44C). A 16h post-infection, DHX9 n'est plus associée à nsP3 immuno-précipitée (Figure 44C). Pour évaluer si DHX9 est effectivement bien présent dans les complexes de réplication du CHIKV, nous avons quantifié l'ARN génomique viral par immuno-précipitation de DHX9. Des cellules HEK293T ont été infectées ou non par du

CHIKV pendant 8h à une MOI de 5, lysées puis mises en contact avec l'anticorps anti-DHX9 ou avec un anticorps irrelevant. Une partie du lysat immuno-précipité est déposé sur un gel SDS/PAGE, les protéines séparées sont alors transférées sur une membrane de nitrocellulose par western-blot pour contrôler la qualité de l'immuno-précipitation. La deuxième partie du lysat sert à réaliser une extraction d'ARN. L'ARN génomique du CHIKV présent dans les lysats immuno-précipités est alors quantifié par qRT-PCR (Figure 44D). L'ARN génomique peut être quantifié à la suite de l'immuno-précipitation de DHX9 attestant que l'hélicase cellulaire peut être associée du CHIKV (Figure 44D).

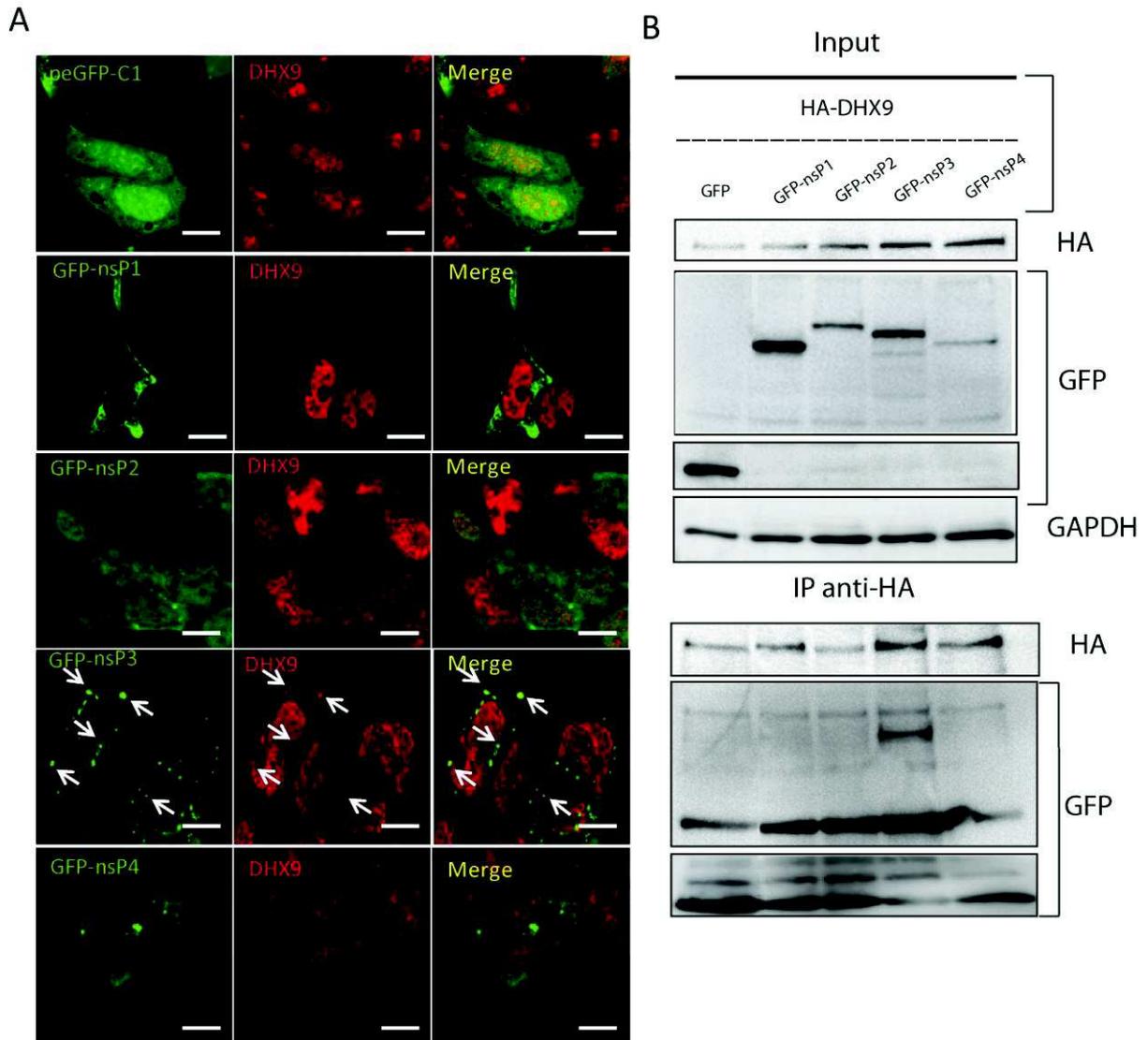


**Figure 44: L'hélicase DHX9 est relocalisée aux complexes de réplication du CHIKV.** Des cellules HEK293T sur lamelles ont été infectées ou non avec CHIKV377 contenant un tag mCherry dans le domaine C-terminal de nsP3 à une MOI de 5 (A) et fixées à la PFA 4% 10h et 16hpi (point non montré). DHX9 est marquée par l'anti-DHX9 au 1/500 reconnu par un anticorps secondaire anti-lapin couplé au fluorochrome Alexa 488 et l'ARN double brin a été marqué avec l'anti-dsRNA J2 (souris) au 1/300 et le secondaire anti-souris couplé au fluorochrome Alexa 647. Les cellules ont été observées au microscope confocal - la barre blanche représente 5µM (B). (C) Des cellules HEK293T ont été infectées ou non avec CHIKV377 pendant 10h et 16h. Les extraits protéiques ont été séparés en fraction « input » et fractions immuno-précipitées avec un anticorps irrelevant (anti-HA), anti-nsP3, ou anti DHX9 en présence de RNase A. Les protéines liées aux différentes cibles d'anticorps sont identifiées par Western-Blot. (D) Des cellules HEK293T ont été infectées ou non avec CHIKV377 à une MOI de 5 pendant 8h. Grâce à un fractionnement cellulaire les phases cytoplasmiques sont séparées en 3 fractions : Input, IP DHX9 et IP IgG. Après immunoprécipitation, 1/10<sup>ème</sup> du volume est récupéré pour contrôler l'immuno-précipitation de DHX9 et est migré sur gel SDS/. Une extraction d'ARN est effectuée dans le volume restant et la quantité d'ARN génomique viral est quantifiée par qRT-PCR.

## 2) NsP3 interagit avec le domaine HelicC de DHX9

Puisque DHX9 est relocalisée dans les complexes de réplication, nous avons évalué le rôle des protéines non-structurales dans le recrutement de DHX9 dans les compartiments de replication. Des constructions de chacune des protéines non-structurales contenant un tag GFP en partie N-terminale ont été réalisées par clonage. Ces constructions ont été transfectées dans des cellules HEK293T cultivées sur des lamelles. Un marquage de DHX9 a ensuite été effectué. Après montage, les lamelles ont été observées au microscope confocal (Figure 45A). La protéine nsP1 exprimée dans les HEK293T est relocalisée aux membranes cellulaires alors que la localisation nucléaire de DHX9 reste inchangée. L'hélicase virale nsP2 est retrouvée dans les compartiments nucléaires et cytosoliques sans co-localiser avec DHX9. Lorsque nsP3 est exprimée dans les cellules transfectées, elle forme des granules cytoplasmiques où est redistribuée DHX9. La polymérase virale nsP4 est exprimée de manière diffuse dans le cytoplasme des cellules mais aussi parfois dans foyers concentrés sans jamais pour autant co-localiser avec DHX9. Dans ce contexte, seule nsP3 est co-localisée avec DHX9. Il est à noter cependant, que le marquage de DHX9 en présence de GFP-nsP2 est réduit dans les cellules exprimant cette protéine virale. Nous avons alors émis l'hypothèse que l'activité NTPase de nsP2 ayant de fortes affinités pour l'ATP et le GTP (Karpe et al. 2011) modifiait la conformation de DHX9, ne pouvant plus lier le GTP dans le noyau. La conformation de l'hélicase étant modifiée, l'anti-DHX9 ne reconnaît plus son épitope en partie C-terminale de DHX9. Parallèlement, Nous avons observé en complémentant la cellule en GTP, grâce à l'apport de guanosine, la réapparition du marquage de DHX9 nucléaire (Figure 46).

Nous avons ensuite cherché à savoir si DHX9 pouvait interagir avec les nsPs et surtout si la co-localisation de nsP3 avec DHX9 était allouée à une interaction entre ces deux protéines. Les constructions de plasmides codant pour les GFP-nsPs et un pcDNA3.1 contenant la séquence de DHX9 fusionnée à un tag Hémagglutinine (HA) en N-terminal ont alors été co-transfectées dans des HEK293T. Les extraits protéiques des cellules transfectées, lysées sont ensuite mis en contact avec des billes d'agarose couplées à des anticorps ciblant le tag HA. Les complexes immuno-précipités sont déposés sur gel d'acrylamide et migrés par western-blot. Seule GFP-nsP3 est identifiée comme étant liée à HA-DHX9 par cette technique (Figure 45B), confirmant alors les résultats obtenus par colocalisation. Ce résultat est également en accord avec l'étude de double hybride menée par Bourai et ses collaborateurs dans laquelle nsP3, uniquement, semble pouvoir lier DHX9 (Bourai et al. 2012).



**Figure 45: Nsp3 est la protéine non-structurale interagissant avec DHX9.** (A) des cellules HEK293T ont été transfectées soit par un pcGFP-C1 control soit par des constructions permettant de coder pour les différentes GFP-nsPs. Les cellules fixées à la PFA 24h post transfections sont immuno-marquées par l'anti-DHX9 au 1/500 et observées au microscope confocal. La barre blanche représente 5 $\mu$ M (B) Les constructions codant pour les GFP-nsPs et un pcDNA3.1 contenant la séquence de DHX9 fusionnée à un tag Hémagglutinine (HA) en N-terminal ont été co-transfectées dans des cellules HEK293T. Une partie du lysat protéique a été déposée pour contrôler l'expression des plasmides transfectés tandis que 200 $\mu$ g d'extrait protéique a été immuno-précipité avec des anti-HA (souris) couplés à des billes d'agarose. Les protéines liées à DHX9 sont identifiées par Western-Blot.

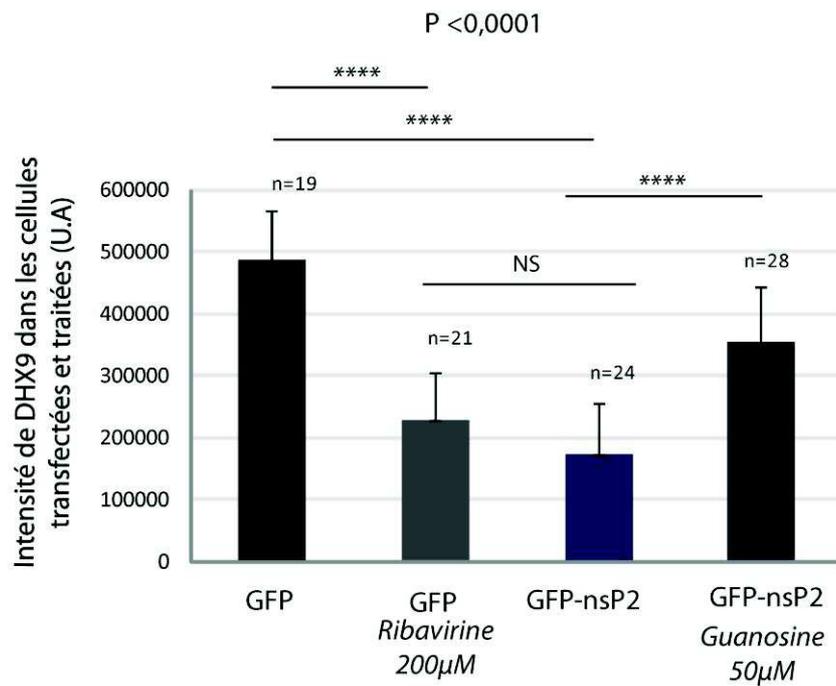
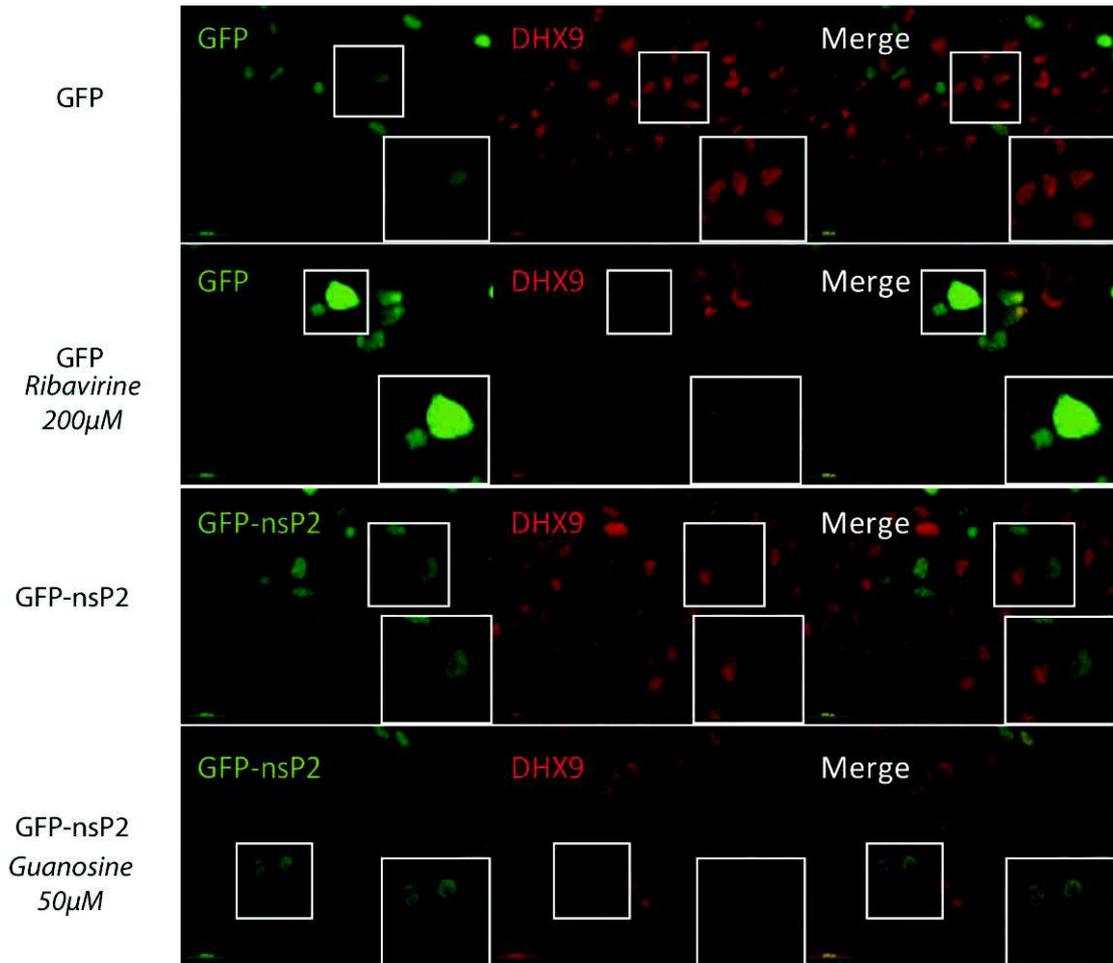
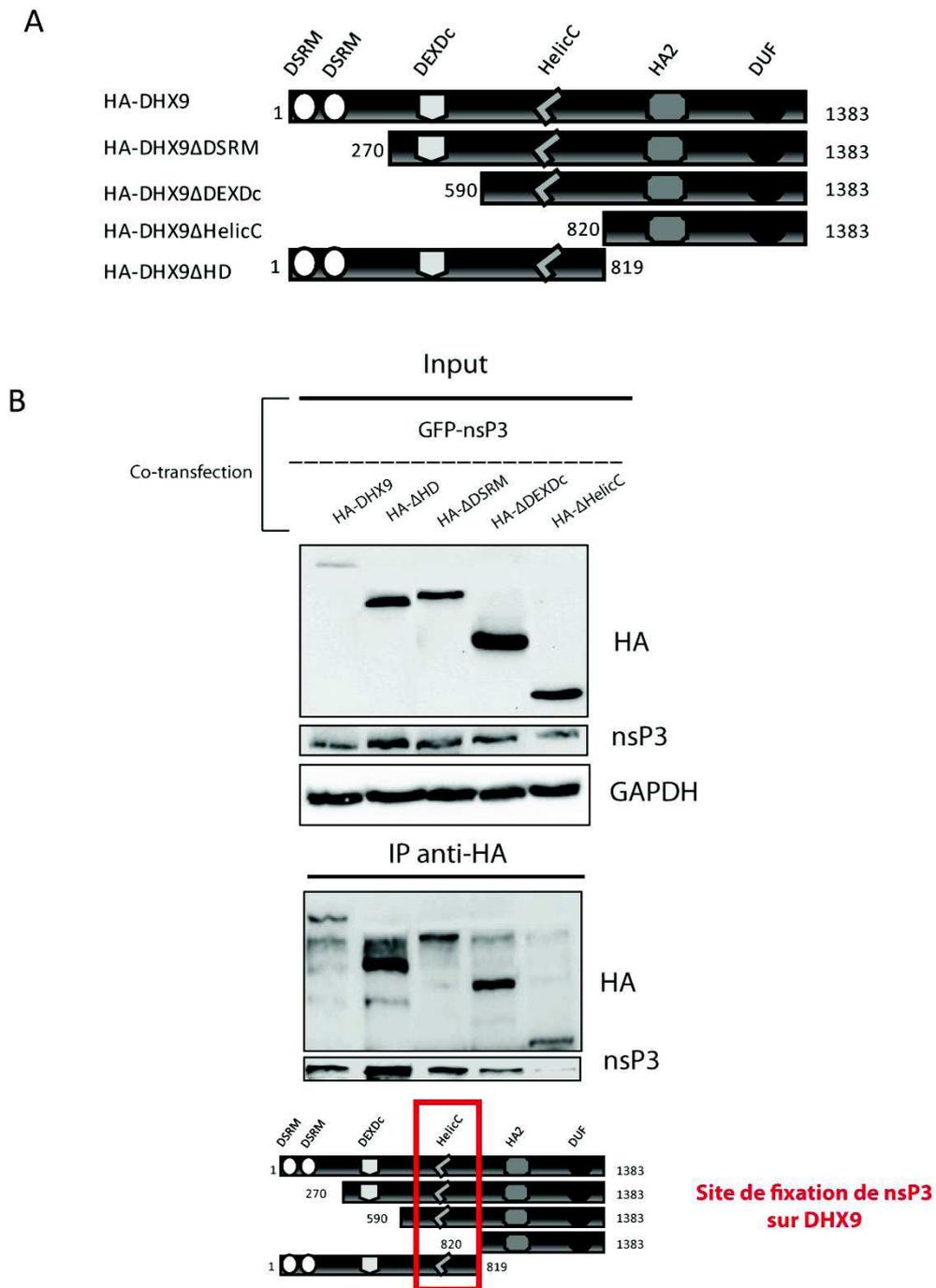


Figure 46: L'activité NTPase de nsP2 entraîne une diminution de marquage de DHX9. Des cellules HeLa ont été transfectées avec peGFP-C1 ou GFP-nsP2 et traitées à la ribavirine 200μM (connue pour entraîner la

disparition de GTP dans la cellule cible) ou à la guanosine 50 $\mu$ M pour compléter les cellules en GTP. Les cellules ont été marquées avec un anti-DHX9 couplé à un anticorps secondaire Alexa 594 et ont observées au microscope droit à fluorescence L'intensité du marquage de DHX9 a été analysé grâce au logiciel ImageJ.

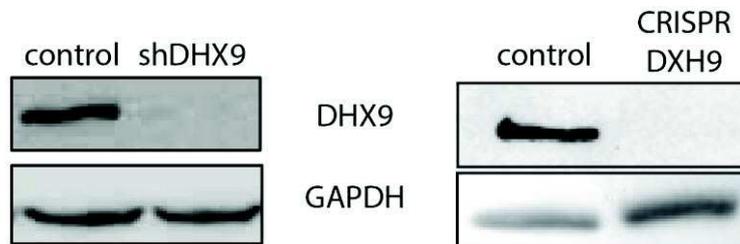
NsP3 étant retrouvée comme interagissant avec DHX9, nous avons voulu préciser le site d'interaction de nsP3 dans DHX9. Cette cartographie a été entreprise en co-transfectant nsP3 et des constructions de HA-DHX9 tronquées dans les domaines caractéristiques d'une protéine à domaine DExD/H (précédemment caractérisées par Zhang et al, 2011), dans des HEK293T (Figure 47A). Les lysats protéiques ont été immuno-précipités avec des billes d'agarose couplées à des anticorps ciblant le tag hémagglutinine. Les complexes formés sont ensuite déposés et migrés par Western-Blot. L'anti-nsP3 permet de révéler la liaison de la phosphoprotéine virale avec la construction de DHX9 co-transfectée. Ainsi, nsP3 peut se lier sur DHX9 privée de sa partie C-terminale (HA-DHX9 $\Delta$ HD), de sa partie N-terminale privée du domaine de liaison des ARNs double-brins (HA-DHX9 $\Delta$ DSRM), et du domaine hébergeant le motif B Walker (HA-DHX9 $\Delta$ DExDc). Par contre, nsP3 ne peut être retrouvée associée avec la construction de DHX9 délétée du domaine C-terminal hélicase présent chez les hélicases de type RecA-like (Figure 47B). NsP3 lie donc DHX9 sur le domaine C-terminal hélicase.



**Figure 47: Le domaine C-terminal hélicase de DHX9 est nécessaire à la liaison de nsP3.** (A) Les constructions tronquées de DHX9 tagguées HA décrites par Zhang et collaborateurs, 2011 ont été co-transfectées avec GFP-nsP3 dans des HEK293T. (B) 24h post-transfection les cellules sont lysées, et une partie de l'extrait est migré par Western-Blot (input) tandis que 200µg d'extraits protéiques sont mis au contact avec des billes d'agaroses couplées à des anti-HA. Les complexes immuno-précipités sont ensuite déposés sur gel d'acrylamide et la présence de nsP3 dans ceux-ci sont révélés par Western-Blot.

### 3) DHX9 est impliquée dans la traduction de l'ARN génomique en protéines non-structurales

Pour déterminer le rôle de DHX9 dans le cycle de multiplication du CHIKV, nous avons tenté de produire des cellules HEK293T « DHX9 Knock Out ». Deux approches ont été utilisées : une basée sur l'utilisation de shRNA permettant l'inhibition de la traduction d'ARNs messagers codant pour la protéine DHX9 par dégradation de son ARNm via RISC et une reposant sur la technique CRISPR/Cas9 empêchant une étape en amont, la transcription d'un ARNm à partir de la séquence génique de DHX9 (Figure 48). Cependant, pendant la culture des clones sélectionnés et au fil des différents passages, ces populations de cellules se sont enrichies en DHX9 et ne peuvent pas être considérées comme des « DHX9 Knock Out », mais comme des « DHX9 Knock Down ». En effet, des cellules KO pour le gène DHX9, en raison de l'implication de l'hélicase dans divers processus biologiques fondamentaux, ne sont pas viables (Lee et Pelletier 2016).



**Figure 48: Production de lignées de HEK293T exprimant faiblement DHX9.** Les HEK293T ont été transfectées par un vecteur PLKO contenant un shRNA ciblant spécifiquement l'ARNm de DHX9 (shDHX9) ou bien par une construction plasmidique contenant la séquence d'ARN génomique de l'exon 1 de DHX9 sous dépendance d'un promoteur U6 et par une construction plasmidique CAS9-GFP permettant l'excision et recombinaison de la région de l'exon 1 de DHX9 (CRISPR DHX9). Après isolation et culture des clones, un western-blot est réalisé pour vérifier l'extinction de l'expression de DHX9

L'hélicase à domaine DExD/H pourrait être impliquée dans la traduction des protéines non-structurales avant que ces dernières puissent synthétiser de nouveaux génomes viraux. En effet, DHX9 a été décrite pour faciliter la traduction de certains ARNs, notamment de celui du précurseur PrGAG du HIV-1 et du HTLV-1 (Bolinger et al. 2010), mais également de protéines cellulaires : facteur de transcription JUND (Hartman et al. 2006), le collagène (Cai et al. 2010b, Manojlovic et Stefanovic 2012), l'IGF2 (Polesskaya et al. 2007), Oct4 (Qiu et al. 2010), l'Histone H2a (Xu et Huang 2009), Cyclines A et B, CDK4 (Xu et al. 2009) notamment en s'associant à Lin28 et à des structures secondaires d'ARN et en recrutant des ribosomes pour former des polysomes avec l'ARNm cible (Jin et al. 2011). Nous avons donc testé la capacité de DHX9 à réguler ou non la traduction des protéines non-structurales. Des cellules HEK293T et HEK293T « DHX9 Knocked down » ont été cultivées puis traitées à la ribavirine 1h avant l'infection de CHIKV147.2 (MOI de 10) présentant un tag GFP au niveau du promoteur subgénomique. La ribavirine, analogue nucléosidique, permet de bloquer la réplication du CHIKV147.2, et donc l'expression de la protéine GFP puisque les ARNs subgénomiques ne peuvent être synthétisés uniquement lorsque le mécanisme de réplication est effectif (Figure 49). Ainsi, les protéines non-structurales produites dans les cellules infectées ne peuvent provenir que de la traduction de l'ARN viral entrant (Figure 50).

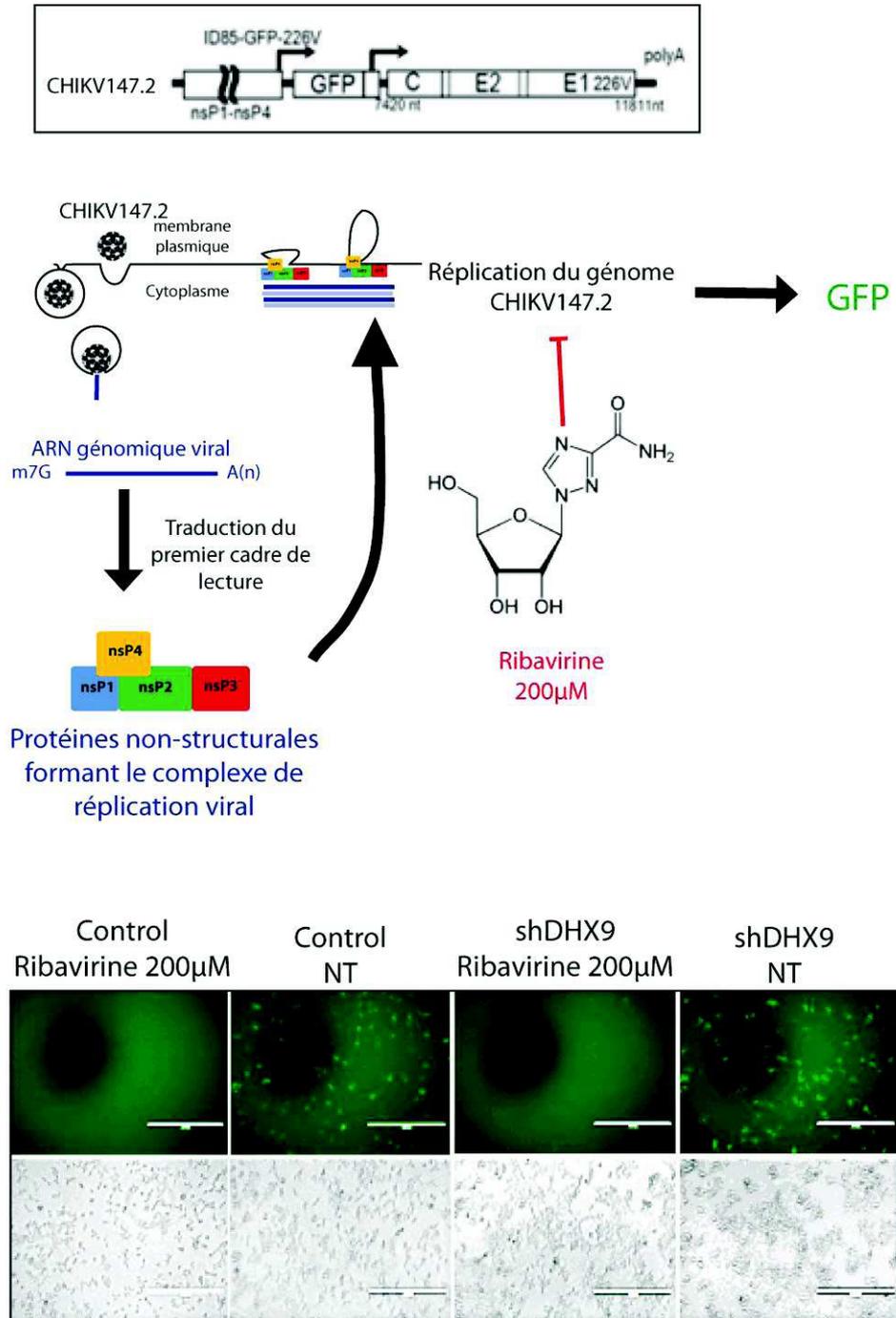
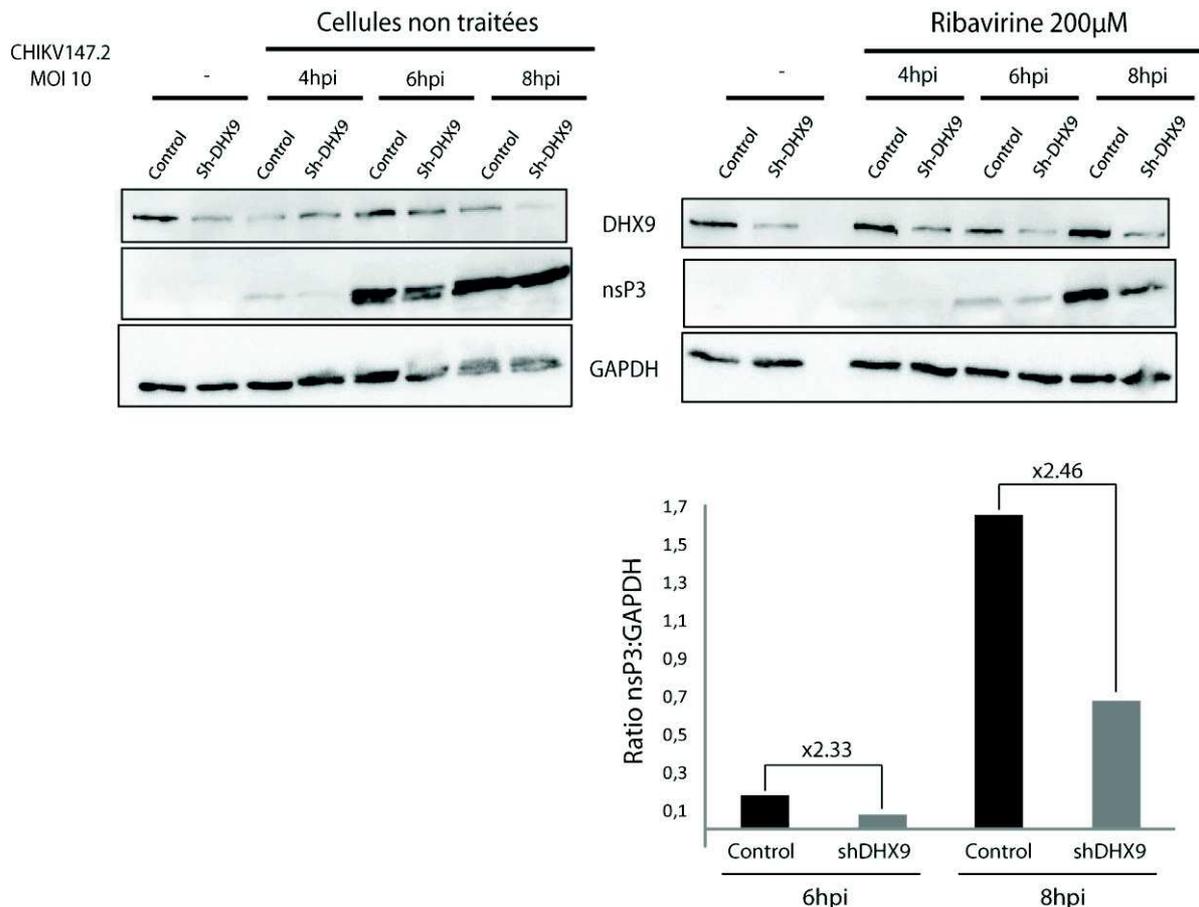


Figure 49 : L'utilisation de Ribavirine empêche la réplication du génome viral et permet d'étudier la traduction de l'ARN génomique entrant. Des HEK293T contrôles ou shDHX9 ont été traitées à la ribavirine ou non 1h pré-infection au CHIKV147.2 possédant un tag GFP au promoteur subgénomique et ont été infectées pendant 8h. A 8hpi, les cellules sont observées sous lumière blanche et sous filtre GFP grâce à l'utilisation d'un microscope inversé à fluorescence EVOS.

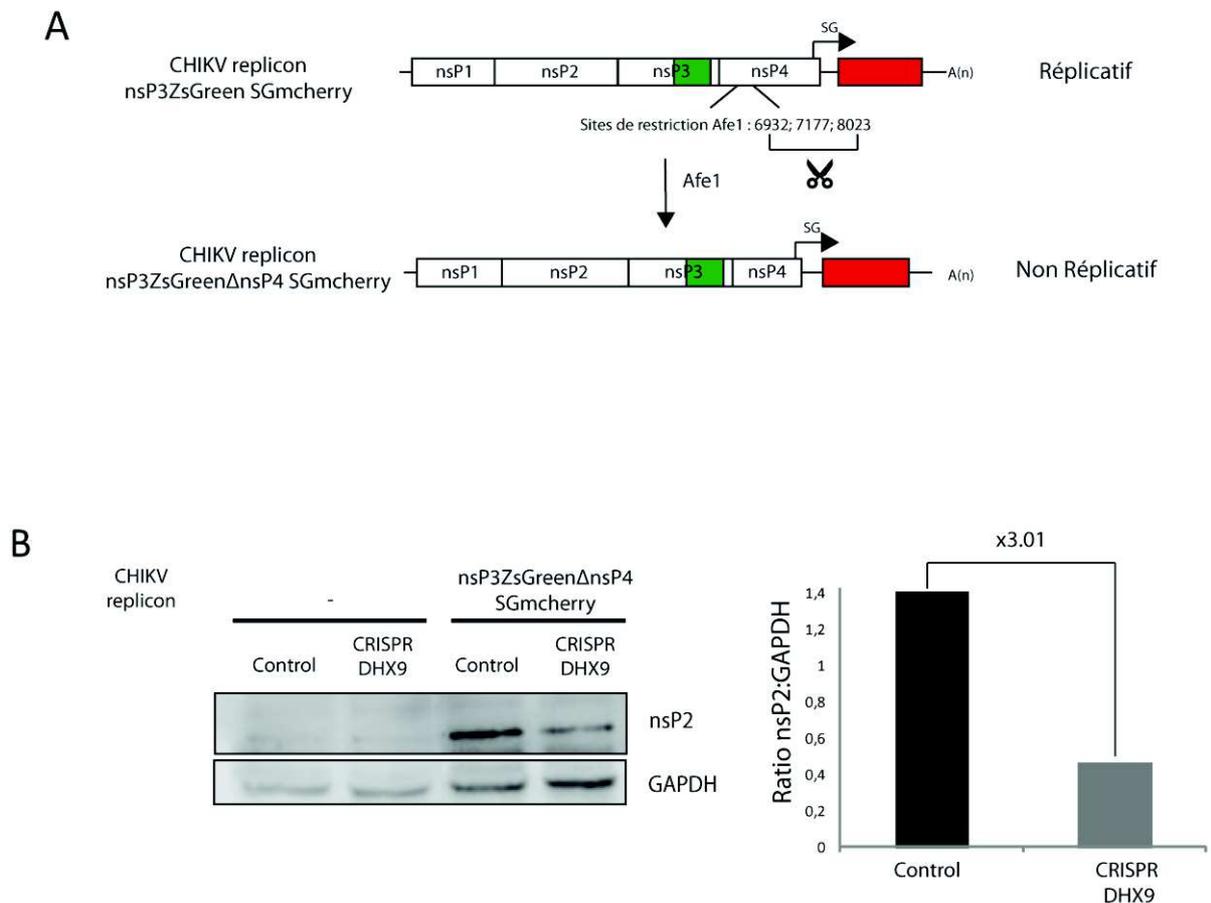
Les cellules sont lysées toutes les deux heures dès 4h post-infection et la quantité de nsPs exprimées, ici nsP3, est quantifiée par Western-Blot. Dans ce cas, les cellules HEK293T contrôles expriment 2,33 à 2,46 fois plus de nsP3 à 6h et 8h post-infection, cette différence s'accroît à 8h post-infection en présence de ribavirine (Figure 50). Ces cellules étant infectées à la même MOI, cela pourrait être dû au fait que peut être que DHX9 (en excès par rapport aux cellules « HEK293T sh-DHX9 ») empêche la réplication du génome viral. Ainsi, les cellules exprimant moins de DHX9 synthétiseraient davantage d'ARNs génomiques pouvant être par la suite traduits en protéines non-structurales.



**Figure 50: DHX9 permet la synthèse de protéines non-structurales dans un contexte d'infection au CHIKV.** Les cellules HEK293T ont été traitées ou non à la ribavirine 200µM et ont été infectées ou non avec CHIKV147.2 à une MOI de 10 pendant 8h. Les extraits protéiques des cellules infectées sont récupérés à 4hpi, 6hpi, 8hpi et la quantité de nsP3 synthétisée par les cellules infectées a été examinée par Western-Blot. Une quantification du signal de nsP3 normalisée à celui de la GAPDH a été réalisée grâce au logiciel ImageJ sur les résultats des cellules infectées à 6hpi et 8hpi préalablement traitées à la ribavirine.

Pour valider l'effet positif de DHX9 sur le mécanisme de traduction de l'ARN viral entrant, nous avons évalué l'étape d'entrée du virus et de la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme. Pour ceci, nous avons construit un réplicon du CHIKV ne pouvant se répliquer du fait d'une large délétion dans la séquence codant pour la polymérase virale nsP4 (Figure 51). Ce réplicon a été transfecté pendant 24h dans des cellules HEK293T ou des cellules CRISPR/Cas9-DHX9, les nsPs synthétisées ont alors été quantifiées par Western-Blot. Nous avons pu observer que la protéine nsP2 était exprimée 3 fois plus dans les cellules contrôles que dans les cellules exprimant faiblement DHX9 (Figure 51). L'ensemble de ces

résultats démontre que DHX9 n'a pas d'effet sur l'entrée du virus, mais que DHX9 favorise la traduction de protéines non-structurales virales à l'origine de la formation du complexe de réplication.

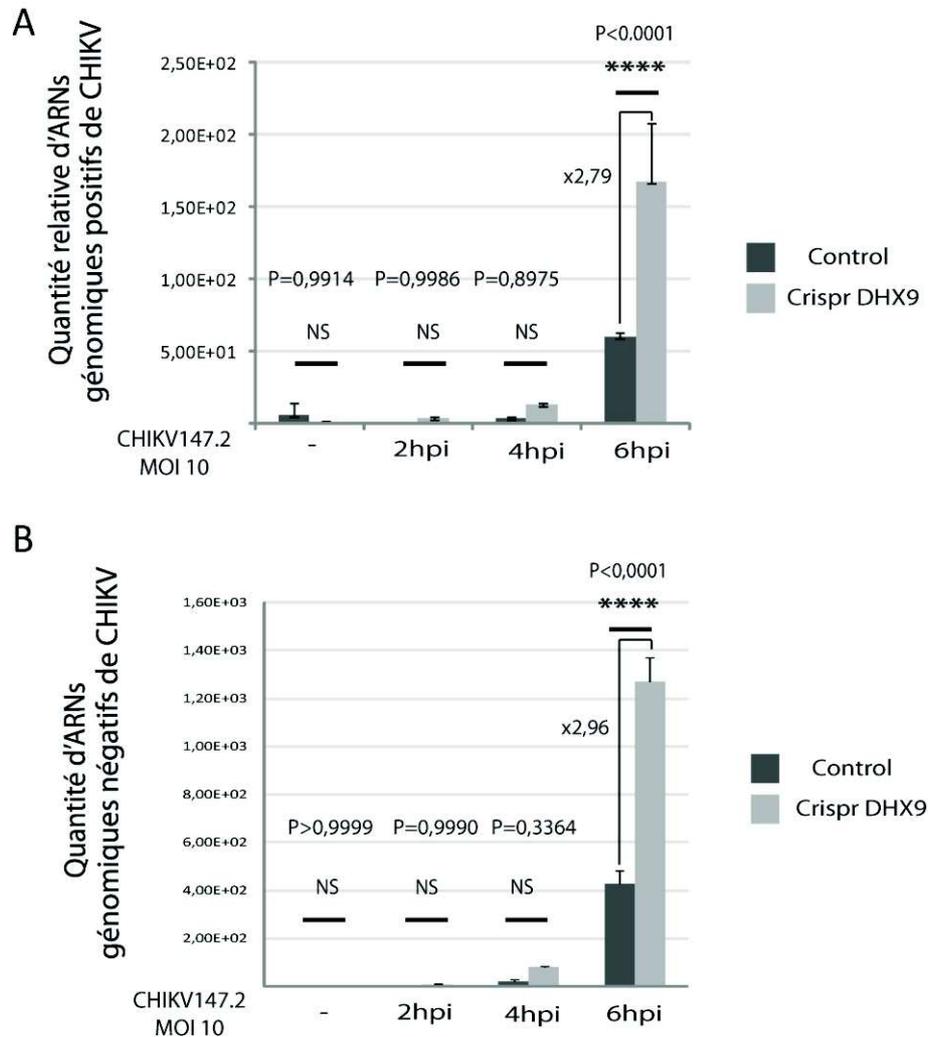


**Figure 51: DHX9 permet d'augmenter l'expression des nsPs codées par le réplicon CHIKV non répliatif.** (A) Le réplicon CHIKVnsP3ZsGreenSGMcherry fourni par Pr. Andres Merits a été modifié par digestion avec l'enzyme Afe1 pour supprimer 1091 nucléotides de la séquence codante pour nsP4 produisant un réplicon CHIKV incapable de se répliatif. (B) Le réplicon CHIKV non répliatif a été transfecté ou non dans des HEK293T contrôles ou dans les CRISPR/Cas9-DHX9 pendant 24h et les extraits protéiques ont été récoltés et examinés par Western-Blot. Le signal nsP2 normalisé à celui de la GAPDH a été quantifié par ImageJ.

#### 4) DHX9 empêche la réplication du génome de CHIKV

Si DHX9 permet de synthétiser les protéines non structurales éléments de base du complexe de réplication viral, nous avons donc évalué son implication dans la réplication du génome viral. Les HEK293T contrôles ou CRISPR/Cas9-DHX9 ont été infectées par le CHIKV147.2 (MOI 10) pendant 6h. Les ARNs totaux ont été isolés toutes les 2 heures post-infection. L'ARN génomique du CHIKV a été quantifié par qRT-PCR. Le virus se répliatif dans les cellules CRISPR/Cas9-DHX9, synthétise 2,79 fois plus d'ARNs génomiques à polarité positive que dans les cellules HEK293T contrôles (Figure 52A). Ainsi, DHX9 inhiberait la synthèse de brin d'ARN génomique de polarité positive. Ce brin positif est synthétisé à partir d'une matrice génomique de polarité négative synthétisée au début de la réplication. Nous avons analysé si DHX9 pouvait aussi moduler les niveaux de synthèse de l'intermédiaire répliatif de polarité négative. Les cellules CRISPR/Cas9-DHX9 infectées par

du CHIKV produisent 2,96 fois plus d'ARNs génomiques viraux de polarité négative (Fig 52B). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'excès de DHX9 dans les cellules contrôles par rapport aux cellules CRISPR/Cas9-DHX9 inhibe la synthèse d'ARNs génomiques de polarité négative, première étape de la réplication virale. Ainsi, il est envisageable que la protéine DHX9 liée à l'ARN CHIKV inhibe la mise en place de réplication de l'ARN génomique.



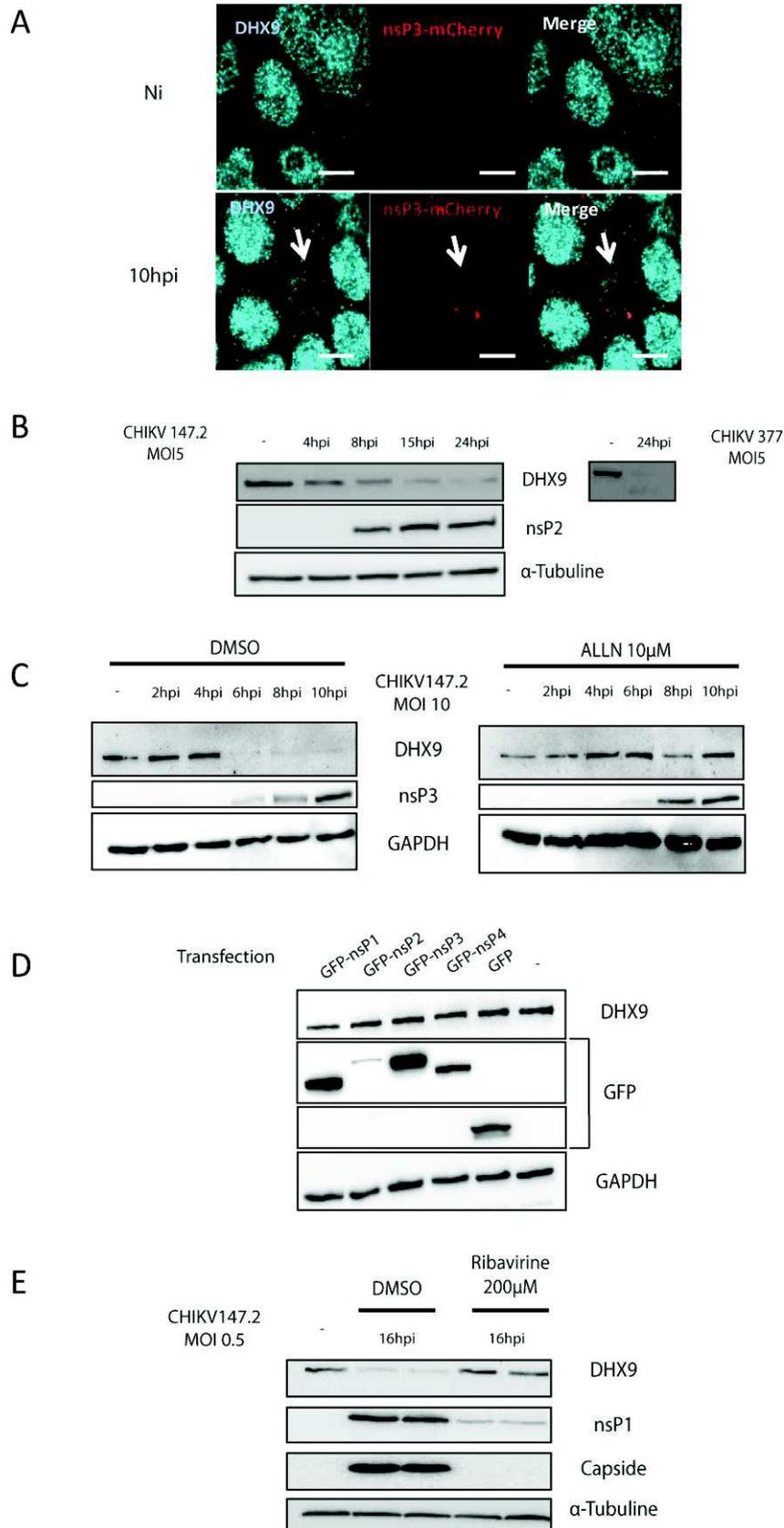
**Figure 52: DHX9 empêche la synthèse de brin d'ARN génomique négatif et la réplication virale.** Des HEK293T contrôles et CRISPR/Cas9-DHX9 ont été infectées avec CHIKV147.2 à une MOI de 10 pendant 6h. Toutes les 2h les cellules sont lysées et les ARNs totaux sont extraits. (A) Une qRT-PCR permet de quantifier l'ARN génomique viral présent dans les cellules infectées en utilisant des amorces reconnaissant nsP2 et en normalisant les données avec la quantité d'ARNs, codant pour la GAPDH, mesurée. (B) La quantité d'ARNs génomiques de polarité négative présents dans les mêmes échantillons a été mesurée par qRT-PCR

## **5) Certaines hélicases dont DHX9 sont dégradées au cours de la réplication du CHIKV**

Nous avons ensuite suivi le devenir de DHX9 au cours de l'infection et donc au cours de la réplication du génome CHIKV. Le marquage de DHX9 dans des cellules HEK293T infectées disparaît du noyau des cellules infectées par CHIKV (Figure 53A). Pour confirmer cette observation, nous avons infecté des HEK293T avec deux souches de CHIKV (CHIKV147.2 isolée initialement à l'île de la Réunion en 2006, et CHIKV377, isolée en 2006 à l'île Maurice), et nous avons alors quantifié la protéine DHX9 (Figure 53B). Au cours du temps, l'expression de DHX9 disparaît que ce soit avec la souche CHIKV147.2 ou avec la souche CHIKV377. Pour analyser cette étape de déplétion de DHX9 et savoir si cette disparition de DHX9 est liée à une dégradation dépendante du protéasome, nous avons infecté des cellules HEK293T (MOI 10) puis ces cellules ont été traitées soit au DMSO, soit avec l'inhibiteur du protéasome ALLN (Figure 53C). Dans ces conditions, DHX9 est visible entre 4h et 6h post-infection. En revanche, cette déplétion n'est pas observée dans les cellules traitées avec l'inhibiteur de protéasome (Figure 53C). En étudiant d'autres hélicases à domaine DExD/H comme les DEAD-Box DDX3, DDX5 nous remarquons qu'elles sont également relocalisées et dégradées de manière dépendante du protéasome au cours de l'infection par CHIKV (Figure 54 et 55- Page 100 et 101). L'hélicase DHX9, de manière similaire à DDX3 et DDX5, est donc dégradée de manière dépendante du protéasome.

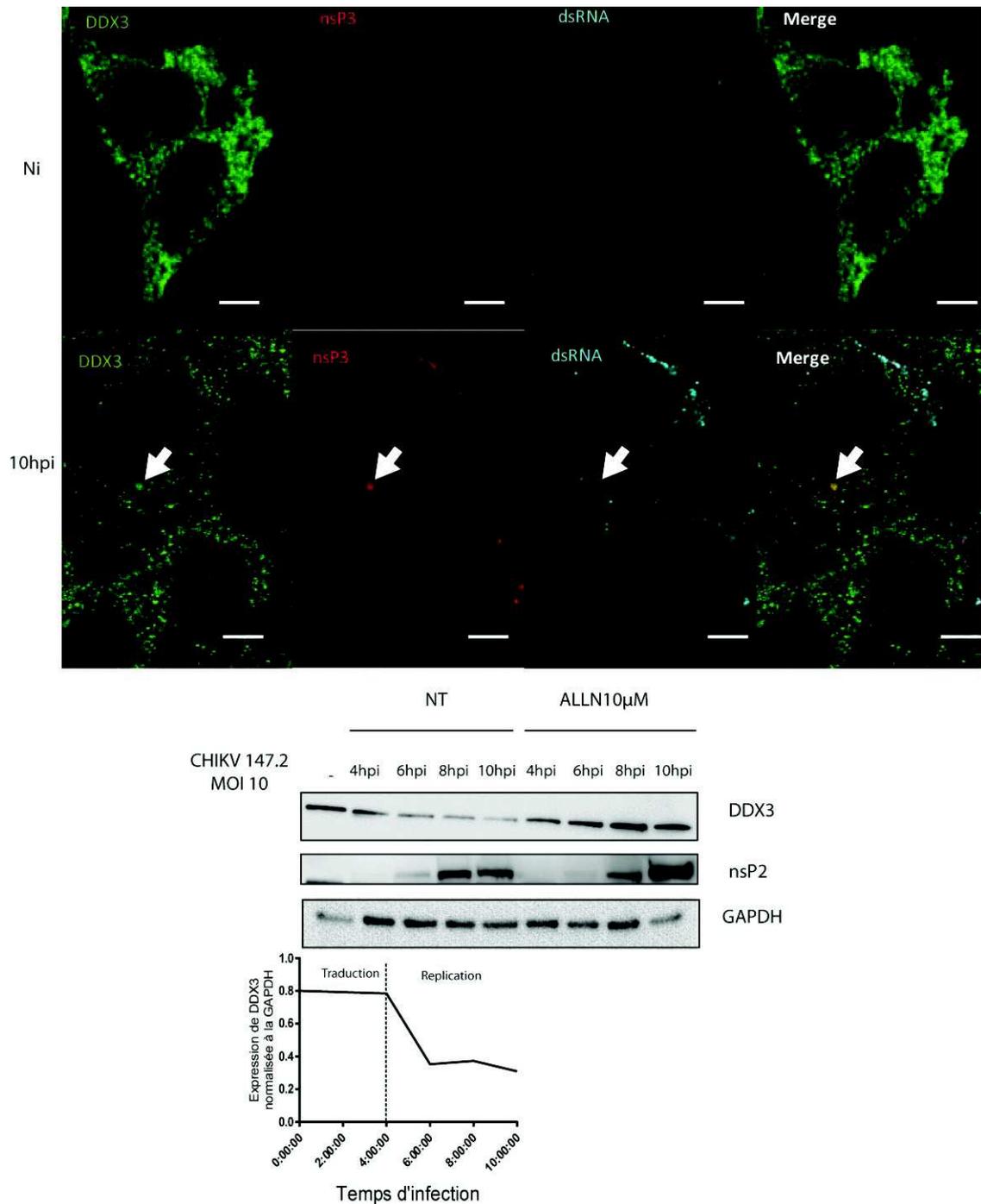
Pour connaître les modalités de cette dégradation de DHX9, à savoir qui est/sont le(s) responsable(s) de cette dégradation, les protéines non-structurales du CHIKV ont été exprimées de manière indépendante par transfection dans des cellules HEK293T, le niveau de DHX9 a été quantifié par Western-Blot (Figure 53D). L'expression isolée de chacune des protéines du complexe de réplication du virus n'entraîne pas de diminution de l'expression de DHX9. En revanche, lorsque les cellules HEK293T infectées sont traitées avec l'inhibiteur la ribavirine empêchant la réplication virale, la dégradation de DHX9 n'est plus visible (Figure 53E). Il faut donc que le mécanisme de réplication du génome viral soit effectif pour que DHX9 soit dégradée activement dans les cellules infectées. Ainsi, si l'expression de chacune des nsPs n'a aucun effet sur la dégradation de DHX9, celle-ci est dépendante de l'ensemble des nsPs organisées en complexe de réplication actif.

DHX9 est donc dégradée par un mécanisme dépendant du protéasome pour permettre la réplication du génome du CHIKV.



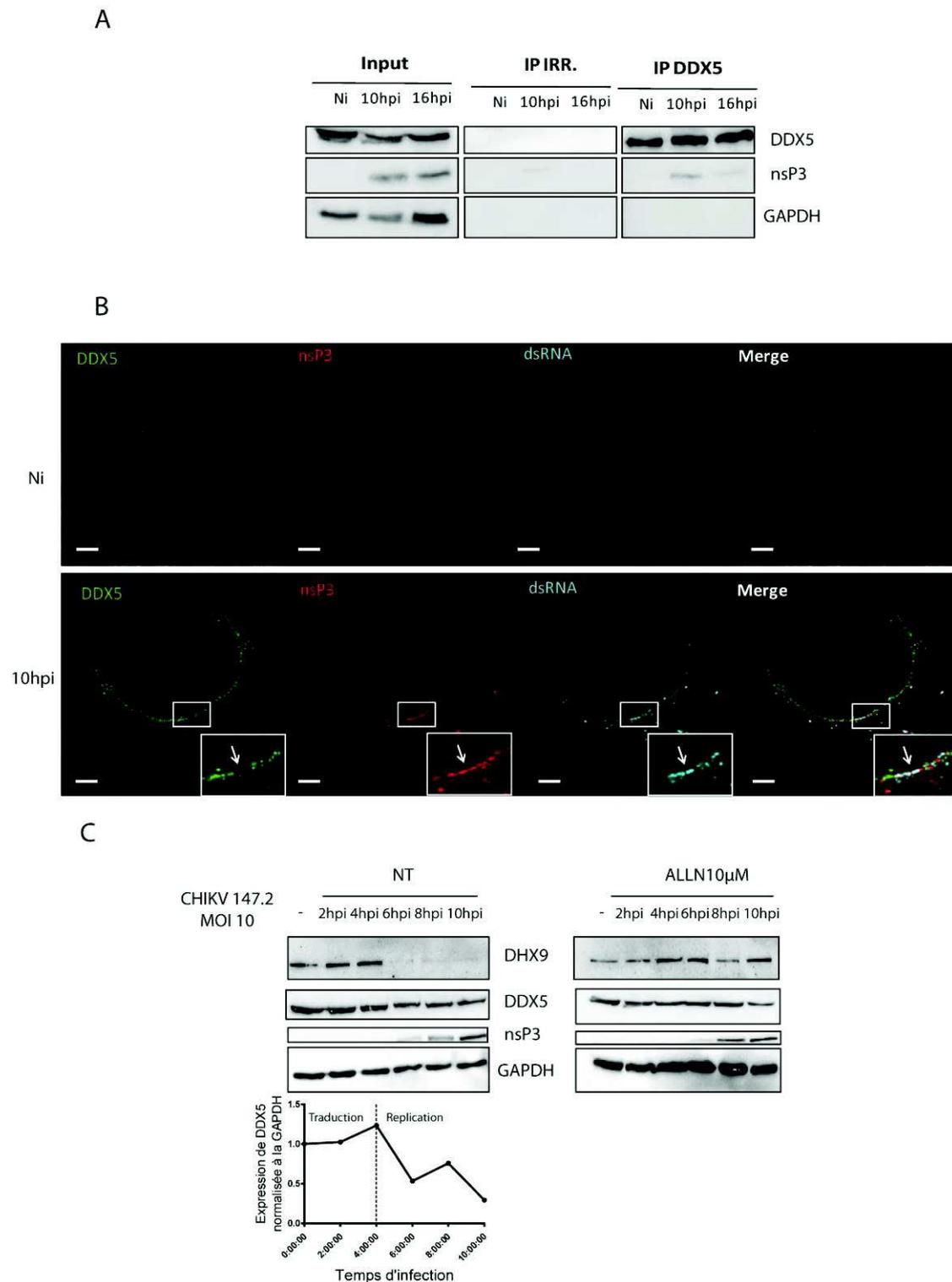
**Figure 53: DHX9 est dégradée pendant la réplique du génome de CHIKV par la voie du protéasome. (A) Des HEK293T ont été infectées ou non avec CHIKV377 à une MOI de 5 pendant 10h. Les cellules ont été fixées à la PFA 8% et DHX9 a été immuno-marquée. Les cellules marquées ont été observées au microscope confocal. La flèche blanche cible une cellule infectée par CHIKV. La barre blanche représente 5 $\mu$ M (B) Des HEK293T ont été infectées par CHIKV147.2 ou par CHIKV377 à une MOI de 5 et les protéines cellulaires ont été**

récupérées au cours de l'infection. 30µg d'extraits protéiques de chaque échantillon ont été déposés sur gel d'acrylamide 10%, et les protéines ont été identifiées par Western-Blot. (C) Des HEK293T ont été infectées avec CHIKV147.2 à une MOI de 10 et traitées au moment de l'infection avec du DMSO (1%) ou de l'ALLN à 10µM, les cellules ont été lysées toutes les 2h et 80µg de protéines sont migrés sur gel d'acrylamide à 10%. Les protéines sont identifiées par Western-Blot. (D) Les différentes constructions codantes pour les GFP-nsPs ou la GFP seule ont été transfectées dans des HEK293T pendant 28h et lysées. 80µg des extraits protéiques ont été déposés sur gel d'acrylamide 10% pour analyse de l'expression de DHX9 par Western-Blot. (E) Des HEK293T ont été traitées au DMSO (1%) ou à la ribavirine 200 µM 1h pré-infection au CHIKV147.2 à une MOI de 0,5. Après 16h d'infection les cellules sont lysées et 30µg d'extraits protéiques sont migrés par Western-blot pour quantifier les niveaux d'expression de DHX9.



**Figure 54: DDX3 colocalise avec nsP3 dans des granules cytoplasmiques et est dégradée de manière dépendante du protéasome au cours de l'infection par CHIKV.** Des cellules HEK293T ont été infectées ou non avec CHIKV377 à une MOI de 5 pendant 10h. Les cellules fixées à la PFA 4% ont été marquées avec les anticorps anti-DDX3 rabbit et anti-dsRNA souris marquant les complexes de réplication actifs. Les cellules sont observées au

microscope confocal. Des cellules HEK293T ont également été infectées avec CHIKV147.2 à une MOI de 10 pendant 10h et traitées ou non à l'inhibiteur du protéasome ALLN 10 $\mu$ M. Le lysat des cellules est récupéré toutes les 2h dès 4hpi et a été migré sur gel SDS/PAGE. Les niveaux d'expression de DDX3 sont ainsi quantifiés par Western-Blot.



**Figure 55 : Un pool de DDX5 est relocalisé aux complexes de réplifications du CHIKV et est dégradé de manière protéasome dépendante au cours de l'infection par CHIKV. (A) Des cellules HEK293T ont été infectées ou non avec CHIKV377 pendant 10h et 16h. Les extraits protéiques ont été séparés en fraction « input » et fractions immuno-précipitées avec un anticorps irrelevant (anti-HA), ou avec un anti-DDX5 en présence de RNase A. Les protéines liées aux différentes cibles d'anticorps sont identifiées par Western-Blot. (B) Des cellules HEK293T ont**

été infectées ou non avec CHIKV377 à une MOI de 5 pendant 10h. Les cellules fixées à la PFA 4% ont été marquées avec les anticorps anti-DDX5 rabbit et anti-dsRNA souris marquant les complexes de réplication actifs. Les cellules sont observées au microscope confocal. (C) Des cellules HEK293T ont également été infectées avec CHIKV147.2 à une MOI de 10 pendant 10h et traitées ou non à l'inhibiteur du protéasome ALLN 10 $\mu$ M. Le lysat des cellules est récupéré toutes les 2h et a été migré sur gel SDS/PAGE. Les niveaux d'expression de DDX5 sont ainsi quantifiés par Western-Blot.

## 6) DHX9 ne conduit pas à la mise en place d'un état antiviral au cours de l'infection par CHIKV

Comme nous l'avons vu dans le point IV.B. 6) « Rôle dans les défenses innées » (Page 69) DHX9 peut être impliquée dans la signalisation de PAMPs aboutissant à la mise en place d'un état antiviral. En effet, Zhang et coll. ont démontré que l'hélicase cellulaire à la capacité de reconnaître les ARNdb dans des cellules dendritiques myéloïdes, et c'est ensuite en se liant à IPS-1, que DHX9 peut activer la signalisation conduisant à la production d'interféron- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), et à l'établissement d'un état antiviral. Dans cette perspective, nous avons testé la capacité de DHX9 à conduire à la transcription d'IFN- $\beta$  suite à l'infection par CHIKV. Pour ce faire, nous avons infecté des cellules HEK293T contrôles ou CRISPR/Cas9-DHX9 par CHIKV et avons extrait les ARNs totaux en vue de la réalisation d'une qRT-PCR afin de quantifier les transcrits d'IFN- $\beta$  des deux types de cellules. Comme montré dans la figure 56, il n'existe aucune différence significative dans la synthèse de transcrits de l'interféron- $\beta$  entre les cellules contrôles et les CRISPR/Cas9-DHX9 infectées. DHX9 n'a donc pas de rôle dans cette signalisation dans les HEK293T infectées par CHIKV, comme décrit par Zhang et coll., dans les cellules dendritiques myéloïdes infectées avec le virus Influenza A ou par l'utilisation de poly I:C (Zhang et al. 2011d).

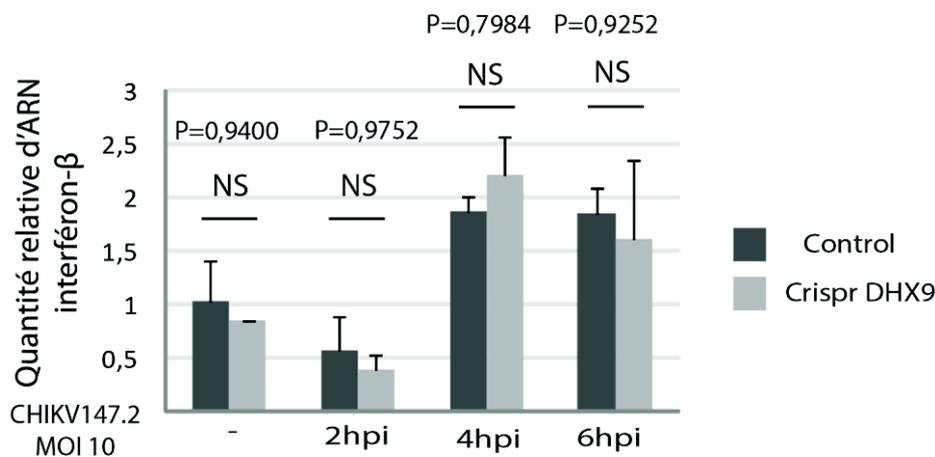
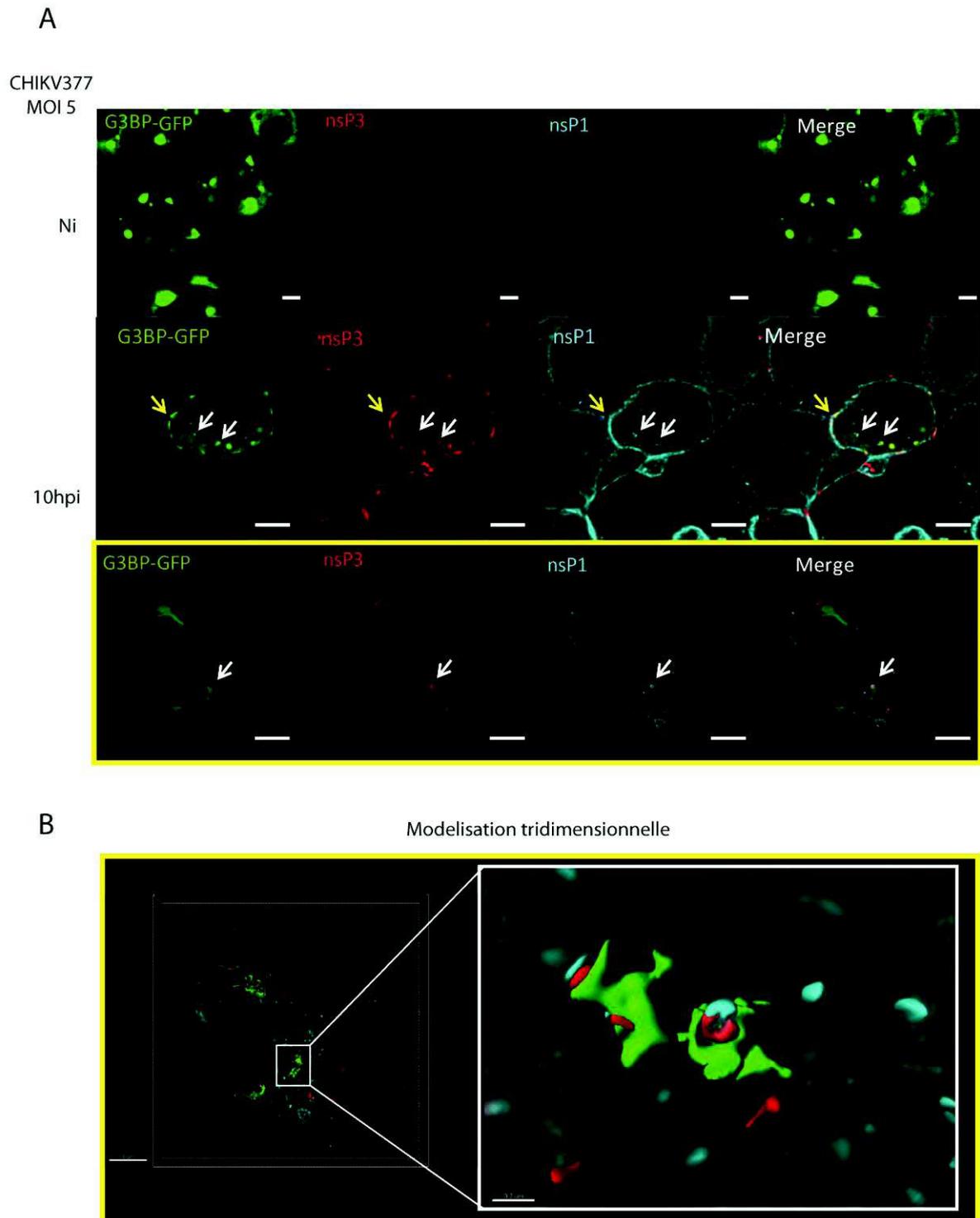


Figure 56 : DHX9 n'a pas d'effet sur la transcription d'ARNm codant pour l'interféron- $\beta$  dans des HEK293T infectées par CHIKV. Des HEK293T contrôles ou CRISPR/Cas9-DHX9 ont été infectées avec CHIKV147.2 à une MOI de 10 pendant 6hpi. Toutes les 2h, les cellules sont lysées et les ARNs totaux sont récupérés. Une qRT-PCR effectuées grâce à des amorces spécifiques pour l'IFN- $\beta$  permet de quantifier les ARNm codant pour l'IFN- $\beta$  dans les cellules infectées et ont été normalisés à la quantification d'ARNm de GAPDH.

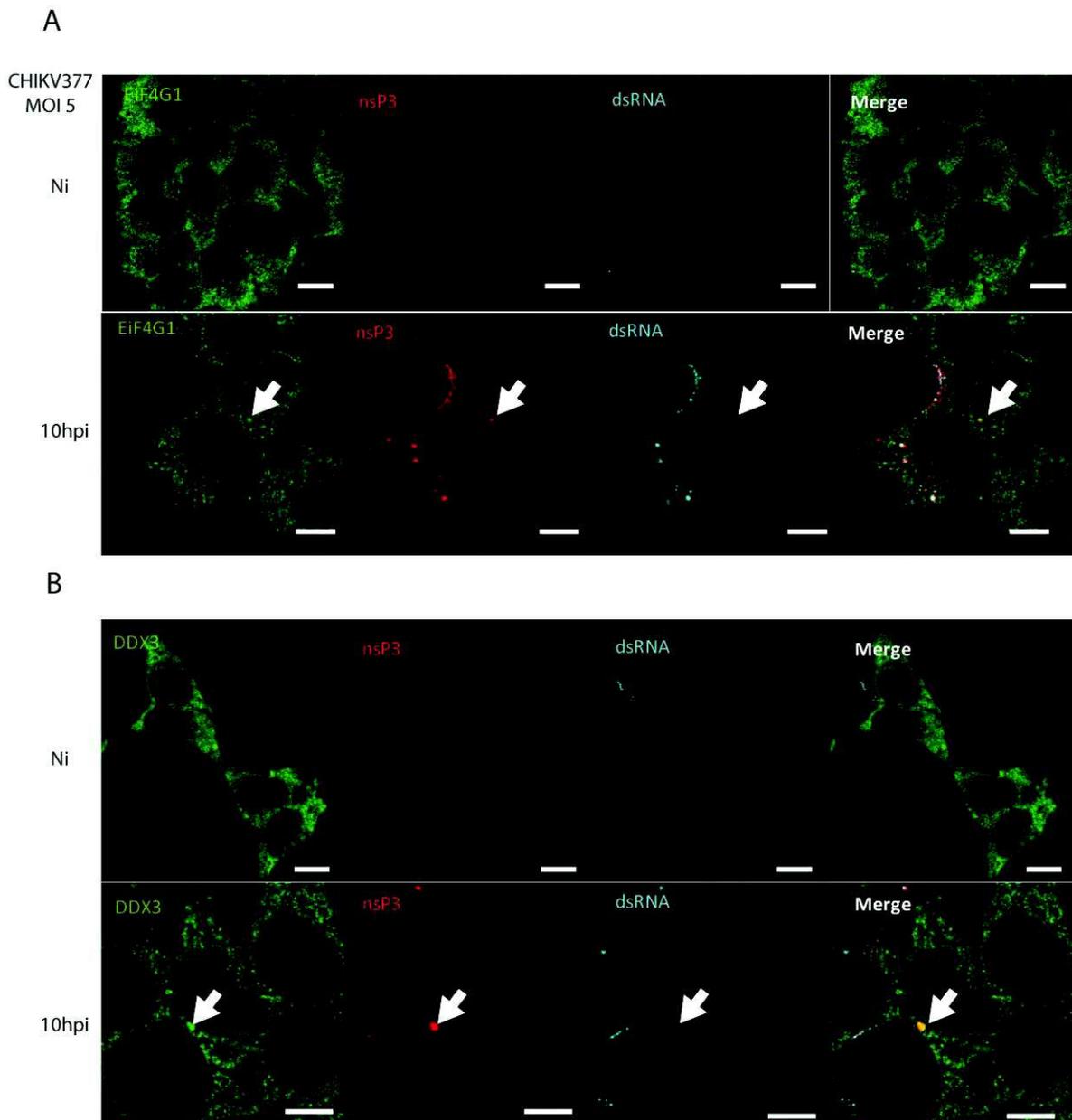
## B. CHIKV, granules de stress et traduction des nsPs

La traduction des protéines non-structurales est un évènement essentiel pour la multiplication du CHIKV puisque elles portent l'ensemble des activités enzymatiques virales nécessaires à la réplication du génome viral. Un des mécanismes de défense mis en place par la cellule au moment de l'infection par un virus est la formation de granules de stress. Ces granules contiennent des protéines chaperones Hsp70/Hsp90, des ARN messagers à queue poly(A) et des protéines impliquées dans la traduction de ces ARNms : Poly(A)-binding protein (PABP), les sous-unités 40S ribosomales, les facteurs d'initiation de la traduction eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF5G, eIF3, eIF2 et des hélicases à domaines DExD/H DDX1, DDX3, DDX5, DDX17, DHX9, (Kedersha et al. 1999, Kedersha et Anderson 2002, Kimball et al. 2003, Anderson et Kedersha 2006, Mazroui et al. 2006, Shih et Lee 2014, Jain et al. 2016). Ce sont donc des structures de mRNPs qui en contexte de stress, lors de l'infection virale, inhibent la traduction coiffe-dépendante en séquestrant les molécules impliquées dans la synthèse protéique. Pour contrecarrer ce mécanisme, le CHIKV inhibe la formation de granules de stress en détournant ses constituants dont notamment la protéine G3BP, formant le cœur de ces granules, grâce aux deux motifs FGDF présents dans la partie hypervariable de nsP3 (Fros et al. 2012, Panas et al. 2014, Panas et al. 2015, Jain et al. 2016). En double hybride, nsP3 semblerait interagir avec DDX5, DDX17, DHX9. Une récente étude démontre que la très proche protéine nsP3 du VEEV, par immunoprécipitation, interagirait avec DDX1, DDX3, PABP, eIF4G, eIF4A (Amaya et al. 2016). La phosphoprotéine virale nsP3 est donc capable d'interagir avec beaucoup de constituants de granules de stress. Scholte et ses collaborateurs ont démontré en 2015 que G3BP était une protéine importante dans le passage de l'étape de traduction des nsPs à l'étape de synthèse du brin négatif à partir de la matrice d'ARN de polarité positive (Scholte et al. 2015). Cela implique que G3BP, composante de granule de stress serait recrutée par les nsPs et/ou associée à l'ARN viral pour exercer cet effet. Dans ces granules de stress, il pourrait donc être envisagé de retrouver la polyprotéine nonstructurale, formant plus tard le complexe de réplication, et l'ARN viral. Nous avons donc évalué la présence de nsP3 dans ces granules, marqués par G3BP et celle de nsP1 qui ne peut colocaliser avec nsP3 qu'au sein de la polyprotéine non-structurale virale ou dans un complexe de réplication actif. Pour cela, nous avons transfecté une construction G3BP-GFP (fournie par Prof. Jamal Tazi) dans des HEK293T et avons infecté ces cellules avec le virus CHIKV377 à une MOI de 5 pendant 10h. nsP3 fusionnée dans sa partie C-terminale avec le tag mCherry, nous avons marqué les cellules avec un anti-nsP1 et avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa 647. La surexpression de G3BP conduit automatiquement à la formation de granules de stress (Tourriere et al. 2003) où cette protéine est localisée. Lorsque la cellule est infectée par CHIKV nous pouvons remarquer la colocalisation entre nsP1, nsP3 et le marqueur de granules de stress G3BP dans des foyers cytoplasmiques (Flèches blanches de la figure 57A- Structure cytoplasmique modélisée en figure 57B). Or, l'expression isolée de nsP1 ne colocalise pas et n'induit pas de relocalisation de G3BP (Scholte et al. 2015). Cela suggère ainsi que soit le complexe de réplication actif se situe dans les mêmes foyers que G3BP soit la polyprotéine non-structurale encore non-active dans la synthèse d'ARN viral est présente dans ces granules de stress.



**Figure 57:** Les protéines non-structurales sont retrouvées dans des granules de stress d'une HEK293T infectées par CHIKV. (A) Des cellules HEK293T ont été transfectées avec un plasmide codant pour G3BP-GFP (construction fournie par Prof. Jamal Tazi) et ont été infectées 24h après avec CHIKV377 à une MOI de 5 pendant 10h. Les cellules fixées à la PFA 4% ont été immunomarquées avec un anti-nsP1 et le secondaire anti-Rabbit Alexa 647. Les cellules ont été visualisées au microscope confocal de la plateforme MRI. (B) Une modélisation des granules cytoplasmiques à été réalisée grâce au logiciel IMARIS (Bitplane) et avec l'aide de Simon Lachambre au plateau technique de MRI. La flèche blanche démontre un foyer cytoplasmique, un granule de stress où colocalise nsP1, nsP3 et G3BP. La flèche jaune démontre un recrutement de G3BP aux membranes plasmiques où s'effectue la réplication du génome du CHIKV. La barre blanche correspond à 5 $\mu$ M sauf dans le panneau de droite de la modélisation où elle équivaut à 0.7  $\mu$ M.

Pour savoir si ces granules de stress contiennent des complexes de réplication actifs ou bien des polyprotéines non-structurales non-actives nous avons vérifié la présence de duplexes d'ARNs par imagerie en marquant différentes protéines constituantes des granules de stress. Pour cela nous avons infecté des cellules HEK293T avec CHIKV377 et avons marqué eiF4G, DDX3, et les duplexes d'ARNs produits au cours de la réplication virale. Comme observé dans la figure 58, ces marqueurs eiF4G et DDX3 sont bien présents dans des granules cytoplasmiques en contexte d'infection par CHIKV et où la protéine nsP3 est également retrouvée. Cependant, nous n'y retrouvons pas d'ARN double brin signifiant qu'il n'y a pas de réplication virale dans ces *foci*. En prenant compte des résultats de la figure 57 avec ceux de la figure 58, cela suggère que dans les granules de stress nous retrouvons des protéines impliquées dans l'initiation de la traduction protéique (Protter et Parker, 2016) ainsi que les protéines formant le complexe de réplication, non actives dans la synthèse de génomes viraux.

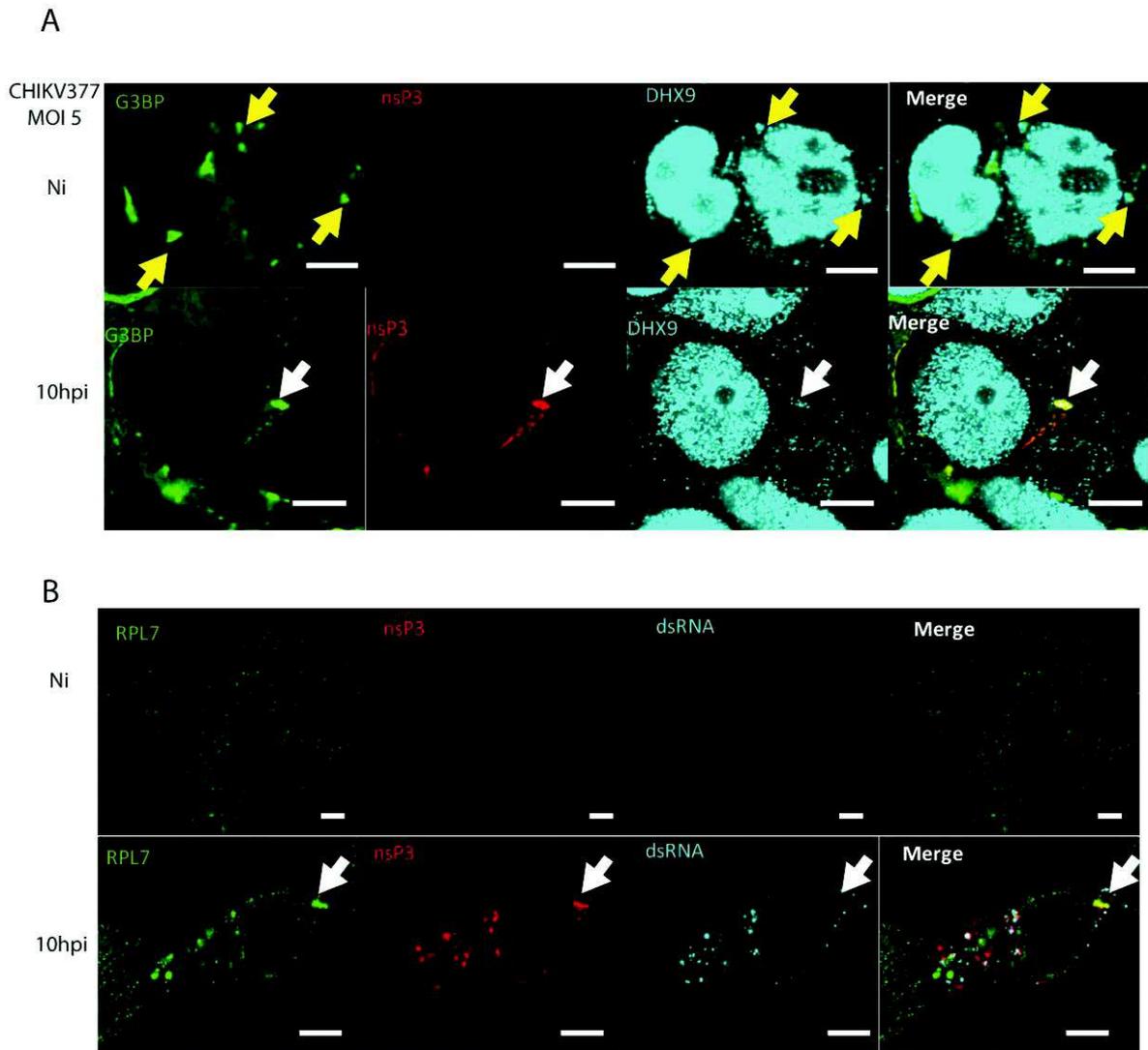


**Figure 58:** Les granules de stress ne contiennent pas de complexes de réplication de CHIKV actifs. Des cellules HEK293T ont été infectées avec CHIKV377 à une MOI de 5 pendant 10h. Les cellules fixées à la PFA 4% ont été immunomarquées avec un anti-dsRNA J2 et son secondaire anti-mouse Alexa 647 ; avec un anti-eiF4G1 (A) ou

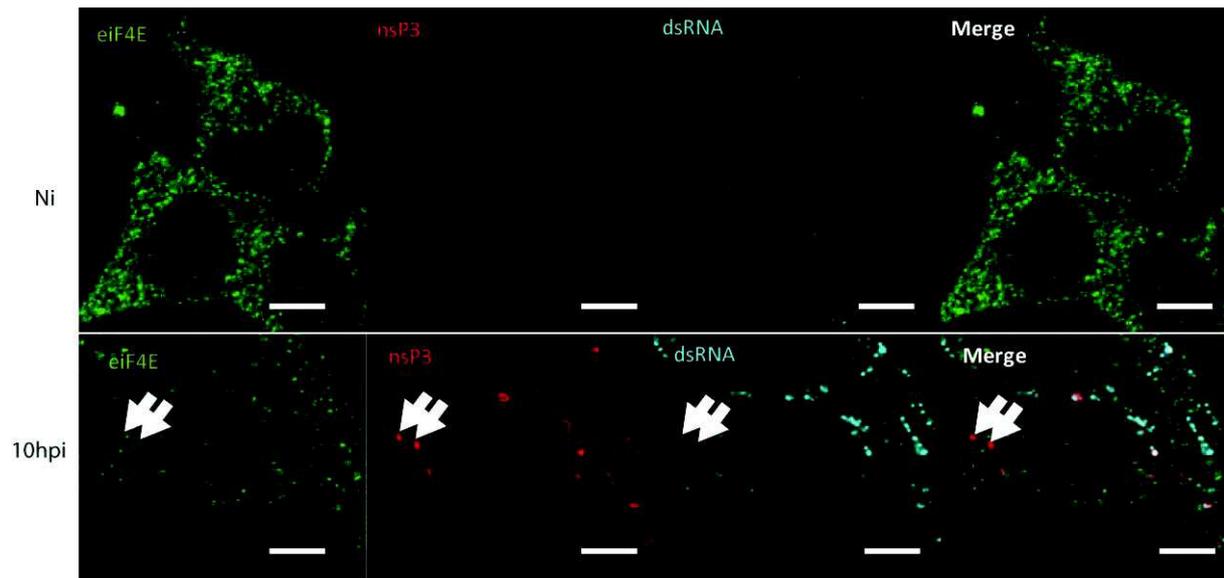
**anti-DDX3 (B) et leur secondaire anti-Rabbit 488. Les cellules ont été visualisées au microscope confocal de la plateforme MRI. La flèche blanche démontre une colocalisation dans des foyers cytoplasmiques des constituants de granules de stress eiF4G1, DDX3 avec nsP3 et où le marqueur de réplication dsRNA est absent. La barre blanche représente 5µM.**

Puisque dans ces granules nous retrouvons ces protéines non-structurales virales non-actives dans la synthèse de génomes du CHIKV, des protéines séquestrées et impliquées dans l'initiation de la traduction et DHX9 (Jain et al. 2016) dont nous avons caractérisé un effet stimulateur de la traduction des nsPs, nous avons voulu savoir si ces granules n'étaient pas tout simplement des structures de synthèses de protéines virales. Les granules de stress sont des structures de séquestration de RNPs, d'ARNs et de protéines impliquées dans la l'initiation de la traduction. Elles ne contiennent pas de grandes sous-unités ribosomales car en association avec les petites sous-unités, elles pourraient conduire à l'assemblage de polysomes, à la mise en place d'une traduction continue et au désassemblage de granules de stress (Protter et Parker, 2016). Ainsi nous avons voulu confirmer la présence de DHX9 dans les granules de stress en observant visuellement sa présence dans les foyers marqués par G3BP et avons regardé la distribution de RPL7, composant protéique des sous-unités larges de ribosomes au cours de l'infection par CHIKV. Nous retrouvons effectivement DHX9 dans les granules de stress dans des HEK293T exprimant de manière exogène G3BP-GFP (Figure 59A). Lorsque les cellules sont infectées par CHIKV377 nous observons une colocalisation entre G3BP, DHX9 et nsP3 dans ces granules cytoplasmiques démontrant encore ce lien entre DHX9 et nsP3 (ou nsPs). Lorsque nous infectons des cellules HEK293T avec CHIKV377, marquons RPL7 et les duplexes d'ARNs, nous observons une redistribution de la protéine des sous-unités larges de ribosome dans un foyer cytoplasmique où est localisée nsP3 et où la réplication n'est pas effective (Figure 59B). Ces granules cytoplasmiques où les duplexes d'ARNs sont absents contiennent donc des sous-unités larges de ribosomes et ne correspondent donc plus à des granules de stress « classiques » mais des granules modifiés de synthèse de protéines non-structurales virales.

Puisque ces granules seraient des sites de traduction de nsPs, nous avons vérifié que ces structures contenaient la protéine d'initiation de la traduction coiffe-dépendante eiF4E. En effet, l'ARN génomique viral codant pour la polyprotéine non-structurale contient une coiffe à l'extrémité 5'UTR pouvant être reconnue par eiF4E pour initier cette traduction (voir section « Les structures de la partie 5'UTR » - Page 22). En immunofluorescence, nous n'avons pas observé de colocalisation entre ces foyers cytoplasmiques et eiF4E lors d'une infection par CHIKV (Figure 60 – Page 108). Cela suggérerait que la traduction de la polyprotéine non-structurale ne passerait pas par la fonction d'eiF4E. Un modèle du mécanisme de traduction de l'ARN génomique du CHIKV sera proposé dans la partie discussion.



**Figure 59:** Les granules cytoplasmiques sont des structures modifiées compétentes dans la traduction du génome du CHIKV. (A) Des cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide codant pour G3BP-GFP et ont été infectées ou non 24h post transfection avec CHIKV377 à une MOI de 5 pendant 10h. Les cellules fixées à la PFA 4% ont été marquées avec l'anticorps anti-DHX9 et son secondaire anti-Rabbit 647. Les cellules sont observées au microscope confocal. La flèche jaune démontre une colocalisation dans des foyers cytoplasmiques du constituant des granules de stress G3BP avec DHX9. La flèche blanche démontre une colocalisation dans des foyers cytoplasmiques de G3BP, DHX9 et nsP3 dans des HEK293T infectées (B) Des cellules HEK293T et ont été infectées ou avec CHIKV377 à une MOI de 5 pendant 10h. Les cellules fixées à la PFA 4% ont été marquées avec l'anticorps anti-RPL7 et son secondaire anti-Rabbit 488, et l'anti-dsRNA J2 et son secondaire anti-Mouse 647. Les cellules sont observées au microscope confocal. La flèche blanche démontre une colocalisation dans des foyers cytoplasmiques de RPL7 et nsP3 dans des HEK293T infectées et où la réplication virale est absente. La barre blanche représente 5 $\mu$ M.



**Figure 60:** eIF4E n'est pas située dans les foyers cytoplasmiques où s'effectuerait la traduction des nsPs. Des cellules HEK293T et ont été infectées ou avec CHIKV377 à une MOI de 5 pendant 10h. Les cellules fixées à la PFA 4% ont été marquées avec l'anticorps anti-eIF4E et son secondaire anti-Rabbit 488, et l'anti-dsRNA J2 et son secondaire anti-Mouse 647. Les cellules sont observées au microscope confocal. La flèche blanche démontre l'absence d'une colocalisation entre nsP3, eIF4E et l'ARN double brin dans des foyers cytoplasmiques nsP3 positifs. La barre blanche représente 5μM.

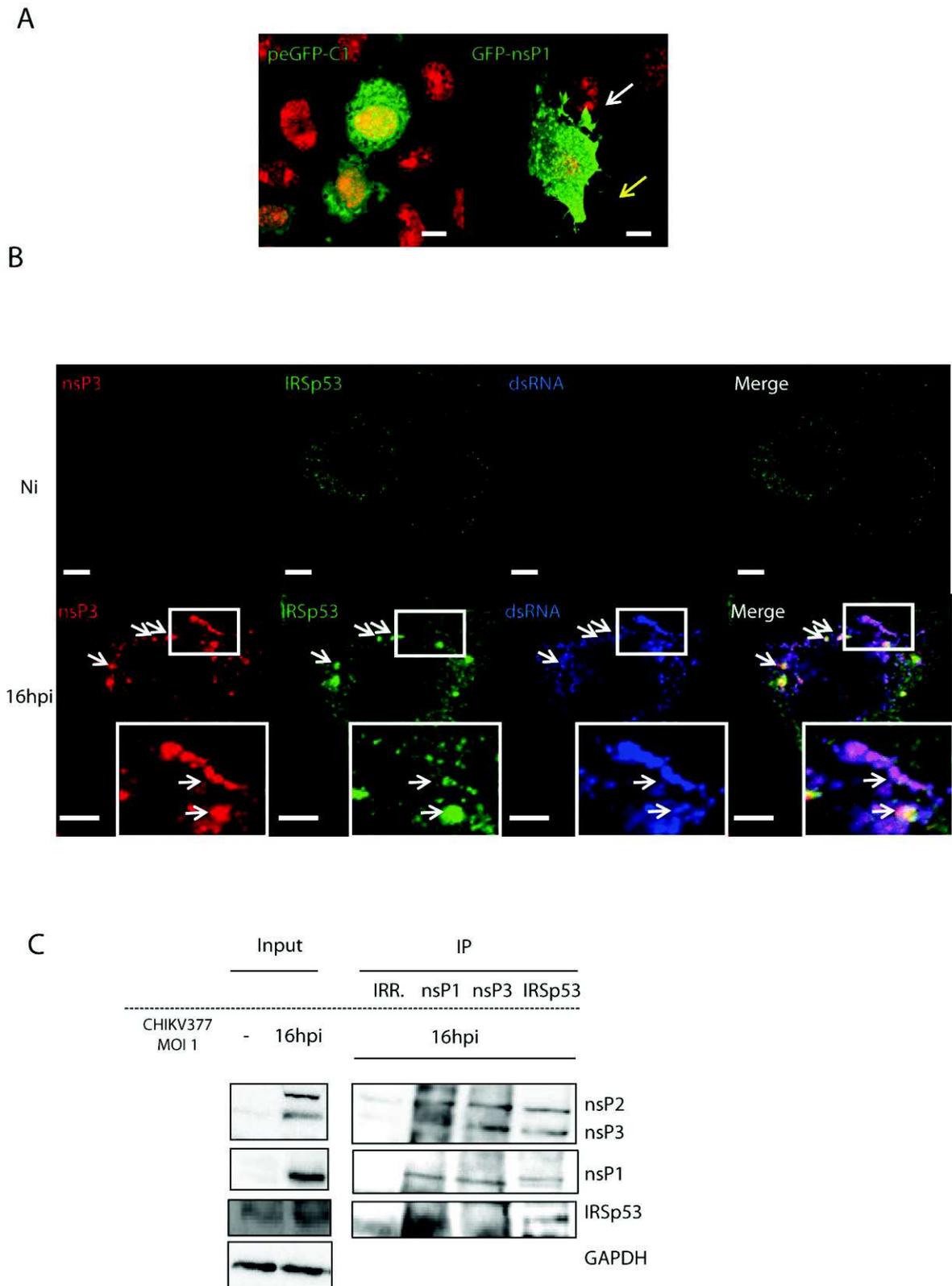
En résumé, la traduction de l'ARN génomique du virus du Chikungunya s'effectuerait dans des structures cytoplasmiques dérivées des granules de stress afin de produire des polyprotéines non-structurales formant plus tard un complexe de réplication actif.

### III. Etude structurale du complexe de réplication du CHIKV

Une seconde partie complémentaire a été consacrée à définir les mécanismes de formation, la structure et l'organisation des sphérules de réplication du CHIKV. A l'heure actuelle, les complexes de réplication des *Alphavirus* sont décrits comme étant des sphérules de 50-70nm générés par des déformations de la membrane plasmique et reliés au cytoplasme par un pore de 5-10nm de diamètre. La production des courbures membranaires à relief négatif conduisant à la formation des sphérules ne dépend pas uniquement des protéines non-structurales, mais aussi de la synthèse active d'ARN viral comme il a été démontré pour le virus Flock House (Ball 1995, Frolova et al. 2010, Kopek et al. 2010, Spuul et al. 2011, Short et al. 2016). Le Flock House virus exprime une seule protéine pour sa réplication (Protéine A) qui à elle seule est suffisante pour former des sphérules à la membrane externe mitochondriale et à la synthèse de l'ARN viral (Ball 1995, Kopek et al. 2010). Ces sphérules sont en tous points identiques à celles des *Alphavirus* (Kallio et al. 2013). Comment ces courbures membranaires peuvent-elles être formées pour produire *in fine* la sphérule répliquative ?

Un mécanisme pouvant être utilisé pour induire la courbure de membrane est le recrutement de protéines à domaine BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs). Les protéines à domaine BAR sont connues pour lier des lipides et pour induire la courbure de la portion avec lesquelles elles interagissent. L'une des protéines la plus caractérisée pour ces propriétés est l'amphiphysine. L'amphiphysine, protéine à domaine F-BAR, permet de former des vésicules recouvertes de clathrines à relief positif et recrute des partenaires comme la dynamine induire la scission entre la vésicule d'endocytose formée et la membrane plasmique (Takei et al. 1999). Dans le cas du CHIKV, il existe une interaction entre cette protéine et la protéine nsP3 grâce à un motif de liaison aux domaines SH3 «<sup>398</sup>PxxPPR<sup>403</sup>» localisé dans son domaine hypervariable (Neuvonen et al. 2011, Tossavainen et al. 2016). L'inhibition de cette interaction diminue la réplication virale mais ne l'abolit pas totalement (Neuvonen et al. 2011). Ce même motif est présent dans la protéine NS5A du HCV et permet également de lier l'amphiphysine (Zech et al. 2003, Masumi et al. 2005). Nsp3 des *Alphavirus* et NS5A de HCV sont des protéines hyperphosphorylées sur des sérines/thréonines. Il a été démontré que le niveau de phosphorylation de nsP3 ou de NS5A module la réplication des deux types de virus (Vihinen et Saarinen 2000, Vihinen et al. 2001, Evans et al. 2004, Neddermann et al. 2004). Dans le cas du HCV, l'amphiphysine régule l'hyperphosphorylation de NS5A néfaste pour la réplication virale (Evans et al. 2004, Neddermann et al. 2004, Masumi et al. 2005). Il est ainsi possible que nsP3 recrute l'amphiphysine pour réguler niveau de phosphorylation pour permettre une réplication optimale du génome viral. L'amphiphysine produisant des courbures membranaires de relief opposé aux sphérules de réplication du CHIKV, son implication dans leurs formations, semble peu probable. En revanche, si le domaine F-BAR de l'amphiphysine, est responsable de la courbure positive de membranes, les protéines à domaine I-BAR induisent elles la courbure de membranes de relief négatif. La protéine virale nsP1 induit la formation de protrusions membranaires ressemblant à des filopodes ou fibres de stress et lamellipodes (Laakkonen et al. 1998a)(Figure 61A- Page 111). Or, des protéines à domaine I-BAR ont été décrites comme induisant des protrusions de la membrane plasmique (Saarikangas et al. 2009), il est dès lors envisageable que des protéines à domaine I-BAR puissent assister la mise en place des sphérules de réplication du CHIKV. Parmi ces protéines à domaine I-BAR, IRTKS (Insulin Receptor Tyrosine Kinase Substrate) et la protéine très homologue IRSp53 (Insulin Receptor Substrate Protein 53) sont impliquées dans la formation de protrusions cellulaires (Krugmann et al. 2001, Mattila et Lappalainen 2008, Sudhaharan et al. 2016). En effet, IRSp53 en s'associant aux protéines WAVE2, Dia1, Mena et EPS8 sur son

domaine SH3 permet d'organiser la production de filopodes (grâce à Mena), de fibres de stress (grâce à Dia1), ou de lamellipodes (grâce à Wave2) (Watanabe et al. 1999, Krugmann et al. 2001, Miki et Takenawa 2002, Robens et al. 2010, Kast et al. 2014). La mutation du domaine SH3, ou la liaison de 14-3-3 entre le domaine CRIB d'IRSp53 et son domaine SH3, empêche la formation de protrusions membranaires (Robens et al. 2010). Or, nsP3 est capable de lier les protéines 14-3-3 (Cristea et al. 2006, Frolova et al. 2006) et possède le site de liaison aux domaines SH3 décrit pour interagir avec le domaine SH3 de l'amphiphysine (Neuvonen et al. 2011). A ce stade, il pourrait être envisagé que la protéine IRSp53 serait recrutée avec nsP1 aux membranes pour induire des déformations à reliefs négatifs. L'interaction de nsP3 avec IRSp53 sur le domaine SH3 ou par l'intermédiaire des protéines 14-3-3 empêcheraient la formation de structures filopodes-*like*, des fibres de stress observés et d'initier les courbures de membrane de relief négatif afin de former la sphérule lors de l'étape de réplication du CHIKV. Dans cette perspective, nous avons analysé le recrutement d'IRSp53 au cours de l'infection par le CHIKV. IRSp53 est retrouvée dans des foyers cytoplasmiques des cellules HEK293T où colocalisent nsP3 et l'ARN double brin marqueur de réplication (Figure 61B). Au niveau d'une portion de membrane plasmique, on peut également observer une colocalisation des trois facteurs démontrant un recrutement d'IRSp53 sur les sites de réplication des génomes viraux (Figure 61B). Pour finir, nous avons évalué la possibilité d'une liaison du complexe de réplication avec IRSp53. Cette protéine est faiblement exprimée dans les cellules HEK293T (Input). Ainsi, l'immuno-précipitation réalisée avec des anticorps anti-nsP1 et anti-nsP3 n'a pas permis de révéler la présence d'IRSp53. Cependant, en concentrant la protéine IRSp53 grâce à un anticorps spécifique, nous avons pu observer la présence des protéines nsP1, nsP2, nsP3 complexées avec IRSp53 (Figure 61C). IRSp53 semble donc présente dans les complexes de réplication du CHIKV. En résumé, il est possible qu'IRSp53, protéine à domaine I-BAR soit recrutée par les protéines du complexe de réplication (*via* nsP1 ou nsP3) pour permettre l'initiation des courbures de membrane de polarité positive.



**Figure 61 : le CHIKV recrute IRSp53, une protéine à domaine I-BAR impliquée dans des déformations membranaires. (A) Des cellules HEK293T ont été transfectées avec un peGFP-C1 ou avec GFP-nsP1 pendant 24h. Les cellules fixées à la PFA 4% sont observées au microscope confocal. Des protrusions cellulaires liées à l'expression ectopique de nsP1 de type lamellipode (flèche blanche) ou filopodes (flèche jaune) sont observées. (B) Des cellules HEK293T ont été infectées ou non avec CHIKV377 à une MOI de 1 pendant 16h. Les cellules fixées à la PFA 4% ont été marquées avec les anticorps anti-IRSp53 goat et anti-dsRNA souris marquant les complexes de réplication actifs. Les cellules sont observées au microscope confocal. Les flèches blanches montrent une co-localisation entre les 3 marqueurs à la membrane plasmique ou dans des foyers cytoplasmiques où le virus se réplique. (C) Des cellules**

**HEK293T ont été infectées ou non avec CHIKV377 à une MOI de 1 pendant 16h. Le lysat de cellules infectées à séparés en 4 fractions pour immuno-précipitations avec un anti-HA (IRR., un anti-nsP1, un anti-nsP3 ou un anti-IRSp53. Les protéines liées aux molécules immuno-précipitées sont identifiées par Western-Blot.**

## **Chapitre III- Discussion et perspectives**

# I. Etude fonctionnelle du complexe de réplication du CHIKV : DHX9 et traduction des nsPs

## A. La liaison de DHX9 sur nsP3

Notre étude démontre que nsP3 interagit avec le domaine C-terminal Helicase de DHX9. Ce domaine représente le site actif hélicase qui a pour fonction de séparer les deux brins d'un acide nucléique sur lequel s'est fixée DHX9 (Xing et al. 2014). Si la protéine nsP3 se lie sur le site actif de DHX9, nous pouvons supposer qu'elle doit inhiber la fonction hélicase de DHX9 qui permet la séparation de double-brins de duplexes d'ARN ou d'une tige-boucle. Le site de liaison de DHX9 sur nsP3 n'étant pas déterminé dans les données présentées, on peut toutefois, en se basant sur la littérature relative aux interactions de DHX9 avec des partenaires cellulaires, émettre l'hypothèse que nsP3 interagit via son AUD avec DHX9. En effet, la ribonucléoprotéine LARP6 par son domaine C-terminal se lie à DHX9 (Manojlovic et Stefanovic 2012)(Figure 62B). Si nous alignons la séquence protéique du domaine C-terminal de LARP6 avec la séquence de nsP3, nous retrouvons un motif partagé par les deux protéines (Figure 62C). Cette séquence SxLxxxRKGθS (ou θ = acide aminé hydrophobe) est située dans le domaine AUD, hautement conservé chez les *Alphavirus*, et est organisé structurellement par la liaison d'un ion Zinc (Shin et al. 2012). Nos résultats préliminaires montrent que dans les cellules HEK293T exprimant nsP3 de manière ectopique, la quantité de DHX9 interagissant avec nsP3 est réduite en utilisant les chélateurs de cations bivalents EDTA/EGTA. Il est donc possible qu'en chélatant l'ion zinc, le domaine AUD perde sa conformation tridimensionnelle modifiant ainsi la capacité de nsP3 à interagir avec DHX9. Cette hypothèse nécessite bien entendu d'être confirmée expérimentalement.



## B. Le CHIKV détourne les granules de stress à son profit

NsP3 n'a pas de fonction enzymatique connue et son rôle dans le cycle de multiplication du CHIKV n'est pas tout à fait compris. Des études ont permis d'identifier des partenaires de nsP3 par double hybride ou par immuno-précipitation dont certains d'entre eux, notamment les hélicases DDX5, DDX17, DHX9 sont également retrouvés dans les granules de stress (Bourai et al. 2012). La protéine nsP3 de VEEV, très similaire à nsP3 CHIKV (Figure 63), est également retrouvée interagissant avec DDX1, présente dans les granules de stress, et avec DDX3 responsable de la formation de ces structures dans le cytoplasme (Shih et al. 2012, Amaya et al. 2016). NsP3 du VEEV serait également présente dans un complexe formé d'eIF4A, eIF4G et PABP grâce à son interaction avec leur partenaire commun DDX3 (Shih et al. 2012, Soto-Rifo et al. 2012, Amaya et al. 2016). Ces interactions ont été discutées par Amaya et ses coll. comme favorisant la traduction de protéines virales (Amaya et al. 2016). Ainsi, la protéine nsP3 de VEEV pourrait interagir avec plusieurs constituants des granules de stress et pourrait potentiellement réguler l'expression de protéines virales.

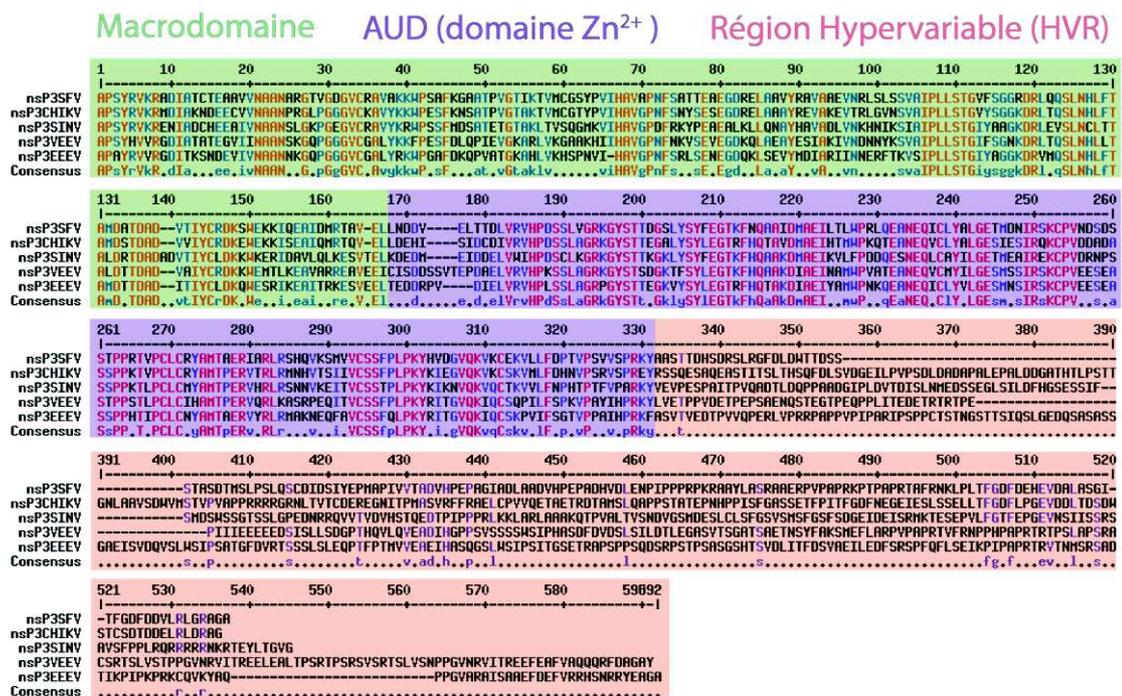


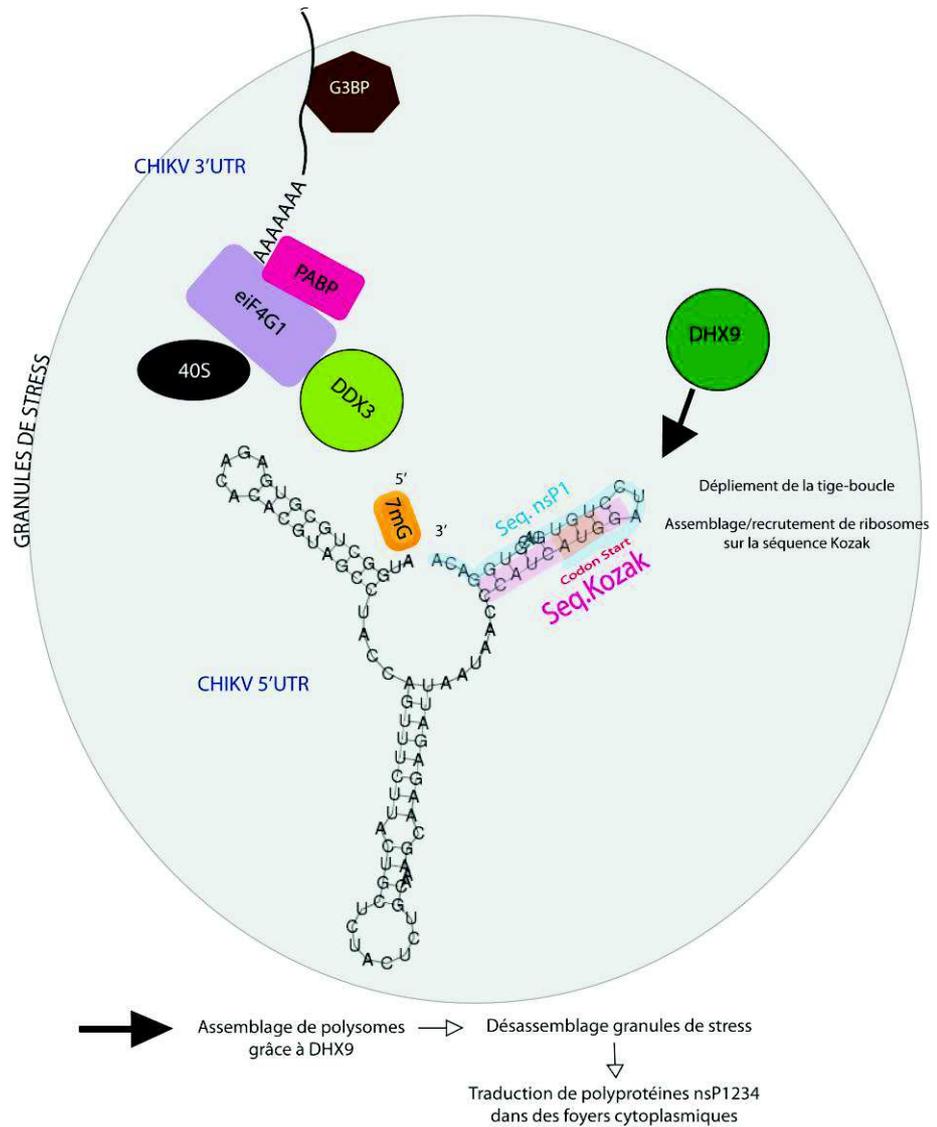
Figure 63: Alignements des séquences de la protéine nsP3 d'Alphavirus. NsP3 est composée de trois domaines : Le macrodomaine en N-terminal, très conservé, l'Alphavirus Unique Domain (AUD) liant un ion zinc et un domaine C-terminal peu conservé, très variable au sein des Alphavirus.

Les données acquises au cours de cette thèse confirment les relations du CHIKV avec ces granules de stress. Nous verrons qu'un modèle d'utilisation/détournement de ces granules de stress peut être envisagé plutôt que son inhibition par nsP3 comme proposé par Panas et ses collaborateurs (Panas et al. 2012, Panas et al. 2014, Panas et al. 2015).

La traduction des nsPs ne passerait pas par un mécanisme de traduction coiffe-dépendante classique, il n'existe pas en effet de colocalisation entre la protéine se liant à la coiffe eIF4E et des foyers de nsP3 (Figure 60 – Page 108), mais pourrait s'effectuer de manière similaire à ce qu'il a été décrit pour la traduction l'ARN génomique du VIH-1 avec DDX3 (Soto-Rifo et al. 2013). En effet, l'utilisation de ribavirine a été démontrée par de nombreuses études comme inhibant, en plus de la réplication de génome viraux, l'activité

d'eIF4E dans la traduction coiffe dépendante (Assouline et al. 2009, Kraljacic et al. 2011, Shi et al. 2015). Nos résultats ont montré que l'utilisation de ribavirine à 200 $\mu$ M (Figure 50 - Page 95) n'entraînait pas une suppression de la production de nsPs de l'ARN CHIKV coiffé entrant. Ainsi la traduction du premier cadre de lecture ne passerait pas par la reconnaissance de la coiffe par eIF4E mais surement grâce à DDX3. Soto-Rifo et coll. ont alors démontré que DDX3 recrute eIF4G1 et PABP à l'extrémité 5' du génome du VIH-1 tout en formant des granules de stress de manière ATP dépendante (Jain et al. 2016, Protter et Parker 2016) et prend la place d'eIF4E pour permettre l'assemblage du complexe de pré-initiation de traduction sur la coiffe (Hilliker et al. 2011, Soto-Rifo et al. 2013). DHX9 est alors recrutée sur les structures secondaires PCE et induit l'association de l'ARN viral avec les ribosomes formant ainsi des polysomes permettant de produire de nombreux précurseurs Pr55Gag (Bolinger et al. 2010).

Le CHIKV possède dans son extrémité 5' UTR, au niveau de la jonction 5'UTR-nsP1 des structures en tige-boucles et une coiffe (Figure 65). Dans ce cas DDX3 liée au pré-complexe d'initiation de la traduction (PIC) pourrait reconnaître ces structures. Le scan médié par PIC doit s'effectuer depuis la coiffe jusqu'à l'AUG présent en amont de nsP1. Ce codon initiateur de la traduction de la polyprotéine non-structurale est localisé au niveau d'une structure tige-boucle (Figure 64). Une fois l'AUG reconnu par la petite sous-unité ribosomale, cette structure doit ensuite être dépliée pour permettre le recrutement de la sous-unité large ribosomale 60S afin que la traduction puisse débuter. Dans ces conditions, DHX9 pourrait être recrutée pour modifier la structure secondaire et permettre l'assemblage des ribosomes sur l'ARN viral du CHIKV. Ce mécanisme particulier a été mis en évidence lors de la traduction de l'ARNm codant pour le collagène (Manojlovic et Stefanovic 2012, Zhang et Stefanovic 2016). En effet, une structure tige-boucle présente dans l'extrémité 5' UTR de cet ARNm contient un codon initiateur de la traduction protéique qui doit être rendu accessible, ce qui nécessite un dépliement de la structure tige-boucle. Grâce au recrutement, par LARP6, de l'hélicase DHX9 les ribosomes peuvent s'assembler au niveau de l'AUG et traduire l'ARNm en protéine du collagène (Manojlovic et Stefanovic 2012, Zhang et Stefanovic 2016).



**Figure 64: Modèle de l'initiation de la traduction du génome CHIKV entrant.** Une fois libéré dans le cytoplasme, la partie 5'UTR du génome pourrait être pris en charge par DDX3 responsable de la formation de granules de stress, et d'autres RNPs (PABP reconnaissant la queue polyA ; G3BP en 3'UTR) résultant en une circularisation du génome viral. DHX9 serait recrutée au niveau d'une tige boucle en 5'UTR contenant la séquence kozak et permettrait l'association de ribosomes. L'assemblage de polysomes permet la traduction de nsPs et le désassemblage de granules de stress.

Une fois que la protéine DHX9 serait fixée sur la tige-boucle du CHIKV, l'association de polysomes entraîne la désorganisation des granules de stress (Kedersha et al. 2000, Buchan et Parker 2009). Ainsi, la traduction de protéines non-structurales du CHIKV serait effectuée. Si les sous-unités 40S ribosomales sont présentes dans les granules de stress, les sous-unités 60S y sont absentes (Kimball et al. 2003). Ces dernières sont constituées d'ARNrs et de RPLs (Protéines de la sous-unité large du ribosome) (Henras et al. 2015). Nous avons observé par une approche d'immunofluorescence, que RPL7, un des constituants de cette sous-unité 60s colocalisait avec nsP3 dans des granules cytoplasmiques en absence de synthèse d'ARN viral (Figure 59- Page 107). Ces données suggèrent que ces granules correspondent à des sites de synthèse de la protéine nsP3 (ou de polyprotéines non-structurales).

En résumé, une fois l'ARN viral du CHIKV libéré dans le cytoplasme de la cellule infectée, celui-ci pourrait être reconnu via sa coiffe m7G par un pré-complexe d'initiation de la traduction contenant DDX3. DDX3 est un moteur d'assemblage de granules de stress concentrant les protéines impliquées dans la traduction (Shih et al. 2012). Parmi ces protéines constituant des granules de stress figurent d'autres hélicases à domaine DExD/H comme DDX5 et DHX9 (Jain et al. 2016)(Matkovic et al, manuscrit en préparation). DHX9 pourrait reconnaître la tige-boucle présente dans la jonction 5'UTR/nsP1 contenant le codon d'initiation AUG de la traduction de la polyprotéine nsPs. Sa liaison sur la tige-boucle induirait le dépliement de cette structure et permettrait l'accès à l'AUG, contenu dans une séquence Kozak, par la sous-unité 40S ribosomale puis l'assemblage/recrutement des ribosomes. Des polyprotéines non-structurales pourraient alors être synthétisées.

Ces protéines non-structurales vont ensuite s'appliquer à la réplication du génome du CHIKV en formant un complexe de réplication actif. Il doit exister donc une dynamique moléculaire permettant le passage de l'étape de traduction du génome viral entrant à l'étape de synthèse d'un brin négatif complémentaire à ce génome.

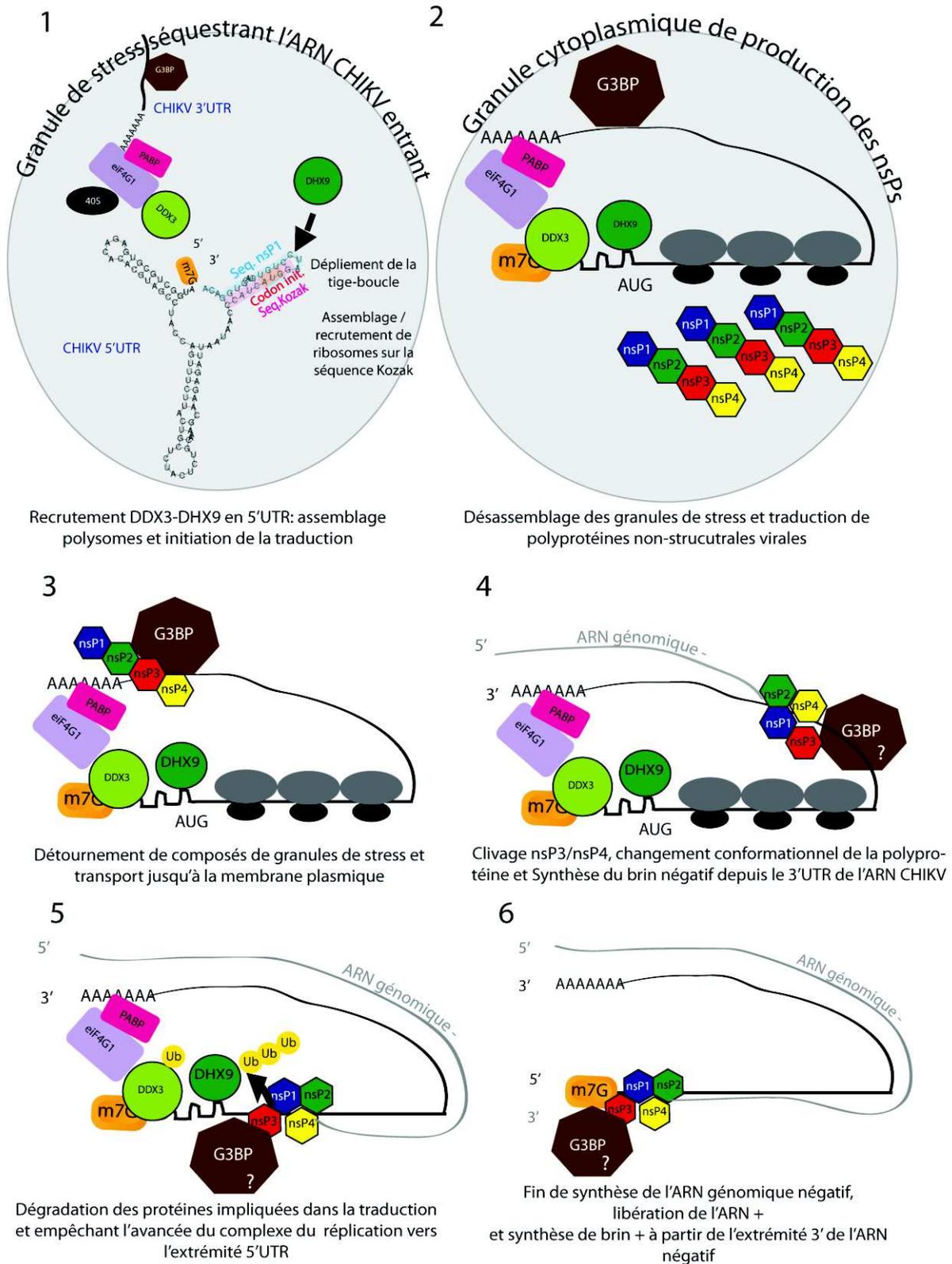
Nous avons vu que DHX9 pouvait donc permettre le recrutement de ribosomes sur l'ARN génomique CHIKV afin d'amplifier la production de nsPs, entraînant alors l'inhibition des granules de stress. En effet, en réduisant l'expression de 2,55 fois dans les cellules shDHX9 nous diminuons d'un facteur 2,33 la synthèse de protéine non-structurale à 6h post-infection (Figure 50- Page 95). Ce taux de réduction de la synthèse de nsPs oscille entre 2,33 et 3 et est du même ordre de grandeur que l'augmentation de la synthèse des ARNs génomiques de polarité négative (Figure 52- Page 97). La réduction de la synthèse d'ARNs viraux en présence de DHX9 pourrait donc être liée à l'augmentation de l'efficacité de traduction de l'ARN génomique mettant en jeu des protéines liées à l'ARN viral, qui doit être copié, et empêchant donc la mise en place de la réplication. Ceci est en accord avec les travaux de Scholte, dans lesquels les auteurs démontrent que la protéine G3BP recrutée et liée à nsP3 permet de passer de l'étape de traduction à l'étape de réplication (Scholte et al. 2015). Ainsi, la traduction des nsPs en présence de DHX9 liée au niveau d'une tige boucle en 5'UTR, s'effectuerait de 5' vers l'extrémité 3', puis le recrutement de G3BP liée à nsP3 permettrait depuis l'extrémité 3' vers 5' de répliquer le génome viral en dégradant les protéines impliquées dans la traduction qui perturberaient la polymérisation conduite par nsP4. Le mécanisme de dégradation de DHX9 comme nous l'avons montré est dépendant du protéasome et s'effectue de manière concomitante avec l'avancée sur la matrice virale de la polymérase nsP4 en cours d'élongation pour synthétiser l'ARN de polarité négative. Ces résultats sont en adéquation avec les études de Karpe et coll. démontrant un rôle essentiel de l'activité du protéasome dans la réplication du CHIKV (Karpe et al. 2016). Le complexe de réplication du CHIKV pourrait donc répliquer le génome grâce à la dégradation de certains facteurs entravant la mise en place de cette étape. Dans ce contexte, il est connu que nsP2 peut entraîner la dégradation de la sous-unité Rpb1 de l'ARN polymérase II ce qui a pour conséquence l'arrêt de la transcription d'ARN pré-messagers cellulaires (Akhrymuk et al. 2012). Bien qu'aucune interaction directe entre Rpb1 et nsP2 ni de poly-ubiquitylation directe n'aient été documentées, d'après les études réalisées en double-hybride, il a été montré que nsP2 pouvait lier la protéine UBQLN4 ciblant des protéines ubiquitylées au protéasome et TRIM27 connue pour entraîner la dégradation de certains facteurs protéiques (Bourai et al. 2012, Zurek et al. 2012). NsP2 n'induisant pas à elle seule la dégradation de DHX9, il est possible de penser que la fixation de DHX9 à nsP3 permette d'obtenir une conformation tridimensionnelle accessible à nsP2 et à ses cofacteurs d'ubiquitylation recrutés au sein du complexe de réplication. Nous avons montré que la dégradation de DHX9 dans les cellules HEK293T infectées (MOI de 10) était un phénomène majeur entre 4h et 6h post-infection (Figure 53- Page 99). Cet intervalle de temps est corrélé avec l'augmentation significative de

la synthèse d'ARNs génomiques viraux de polarité négative puis positive (Figure 52- Page 97). Nous proposons ainsi le modèle suivant : l'avancée du complexe de réplication de 3' en 5' permettant la synthèse du brin de polarité négative serait liée à une dégradation dépendante du protéasome des protéines liées à la matrice d'ARN impliquées dans la traduction de protéines non-structurales. Par ailleurs, cette dégradation de DHX9 pourrait aussi avoir pour conséquence d'empêcher la reconnaissance par DHX9 des intermédiaires de la réplication (ARNdb) et ainsi d'empêcher la mise en place d'un mécanisme de réponse innée. Nous avons observé que DHX9, dans les cellules HEK293T infectées par CHIKV, n'était pas impliquée dans la transcription d'ARNm d'IFN- $\beta$  (Figure 56- Page 102).

Dans notre hypothèse, le recrutement et le transport de l'ARN viral par les nsPs à la membrane plasmique, où s'effectue la réplication du génome CHIKV, permettrait de détourner les constituants des granules de stress vers la membrane plasmique et qui sont liés à cet acide nucléique. En double hybride des interactions ont été décrites entre nsP2, nsP4, nsP3 de CHIKV et G3BP (Bourai et al. 2012). L'interaction entre G3BP et nsP3 a été ensuite confirmée (Fros et al. 2012). De la même manière, il a été observé que lorsque nsP2 est exprimée de manière isolée, celle-ci colocalise au niveau des foyers cytoplasmiques (Scholte et al. 2015). Les données que nous avons obtenues en immunofluorescence indiquent que G3BP est recrutée à proximité des sites de réplication du CHIKV. Ce recrutement de G3BP ainsi que d'autres composants protéiques des granules de stress a été préalablement caractérisé pour le virus Semliki Forest (Varjak et al. 2013). Il est donc raisonnable de penser qu'il en est de même pour le CHIKV. G3BP est une protéine de liaison à l'ARN reconnaissant un motif 5'ACCCA(U/C)(A/C)(C/G)G(C/A)AG 3' grâce à sa partie C-terminale (Tourrière et al. 2003). Dans la partie 3'UTR du CHIKV une séquence quasi-similaire à ce site d'interaction est retrouvée (5'ACCCACAGGGA 3'). Cette homologie de séquence souligne la possibilité d'une fixation de G3BP sur le motif présent dans le 3'UTR du CHIKV. Récemment, l'équipe de Scholte et coll. a proposé un modèle, dans lequel G3BP régule le passage de l'étape de traduction à l'étape de réplication et permettrait la transcription du brin négatif du 3'UTR vers le 5' UTR du CHIKV (Scholte et al. 2015). La machinerie de réplication virale lors de la synthèse du brin de polarité négative se retrouverait bloquée par la présence des protéines cellulaires liées à la matrice ARN et impliquées dans la traduction des nsPs. Ceci aurait pour conséquence le blocage de la progression de la polymérase virale nsP4 (Frolov et al. 2001, Scholte et al. 2015). Dans ce contexte, la polymérisation du génome viral étant inhibée, ces protéines cellulaires présentes doivent être éliminées. Dans notre étude, nous avons montré que lors de la synthèse du brin de polarité négative les protéines DHX9, DDX3, DDX5 liées à l'ARN étaient dégradées (Figures 53, 54, 55 – Pages 99, 100, 101). Ce résultat nous conduit à proposer un modèle dans lequel lorsque DHX9 et DDX3 sont dégradées, et donc ne sont plus présentes sur la partie 5'UTR de la matrice ARN du CHIKV, la polymérase nsP4 peut alors synthétiser la région complémentaire de la partie 5'UTR. Dans cette région, on retrouve la séquence conservée CSE1 (Ou et al. 1983) alors présente dans la partie 3' de l'ARN génomique de polarité négative. Ce site peut ensuite être utilisé par le complexe de réplication pour initier la synthèse d'un brin d'ARN génomique de polarité positive (Ou et al. 1983). Ainsi, les composants de granules de stress DDX3, DDX5, DHX9, seraient détournés au profit, d'abord, de la synthèse des protéines non-structurales puis ensuite, grâce à G3BP, au profit de la réplication virale. La fonction de DDX5 dans le cycle de multiplication du CHIKV est inconnue. Cependant, comme il a été précisé dans l'introduction de ce manuscrit, le CSE de 51 nucléotides, présent dans la séquence codante de nsP1 pourrait correspondre à une séquence stimulatrice de la réplication virale des *Alphavirus* (Niesters et Strauss 1990, Fayzulin et Frolov 2004). Cette séquence, parce qu'elle se situe dans la séquence codant pour la protéine nsP1, est réfractaire à des mutations qui changeraient la structure et la fonction de nsP1. Si toutefois cette séquence devait subir des mutations,

supprimant ses deux tige-boucles, des modifications génétiques adaptatives pourraient apparaître dans les séquences codantes de nsP2 et nsP3 (Niesters et Strauss 1990, Fayzulin et Frolov 2004). Ce quatrième CSE est très important pour la réplication du virus Sindbis dans les cellules de moustique infectées (Fayzulin et Frolov 2004) puisqu'il serait impliqué dans la traduction des nsPs, de la synthèse du génome en brin positif et négatif et que les modifications des structures secondaires réduit considérablement la réplication virale du VEEV (Michel et al. 2007). Il est alors possible qu'un recrutement d'une hélicase, peut être lié par nsP2 et nsP3, pourrait permettre de reconnaître ces structures et stimuler la traduction/réplication du génome des *Alphavirus*. L'hélicase DDX5 est la seule aujourd'hui à être documentée pour lier en double hybride à la fois nsP2 et nsP3 (Bourai et al. 2012). De futures études pourraient confirmer ou non son recrutement au niveau de ces séquences.

En prenant en compte l'ensemble des résultats obtenus dans cette partie « fonctionnelle » nous proposons donc un modèle global en 6 étapes décrit dans la figure 65. Il pourrait alors apporter de nouveaux éléments dans la compréhension du mécanisme de traduction de l'ARN viral entrant et dans la dynamique d'interactions des protéines de la cellule hôte avec les protéines non structurales virales afin de passer d'une étape de production des composants du complexe de réplication à l'étape de la réplication du génome du CHIKV.



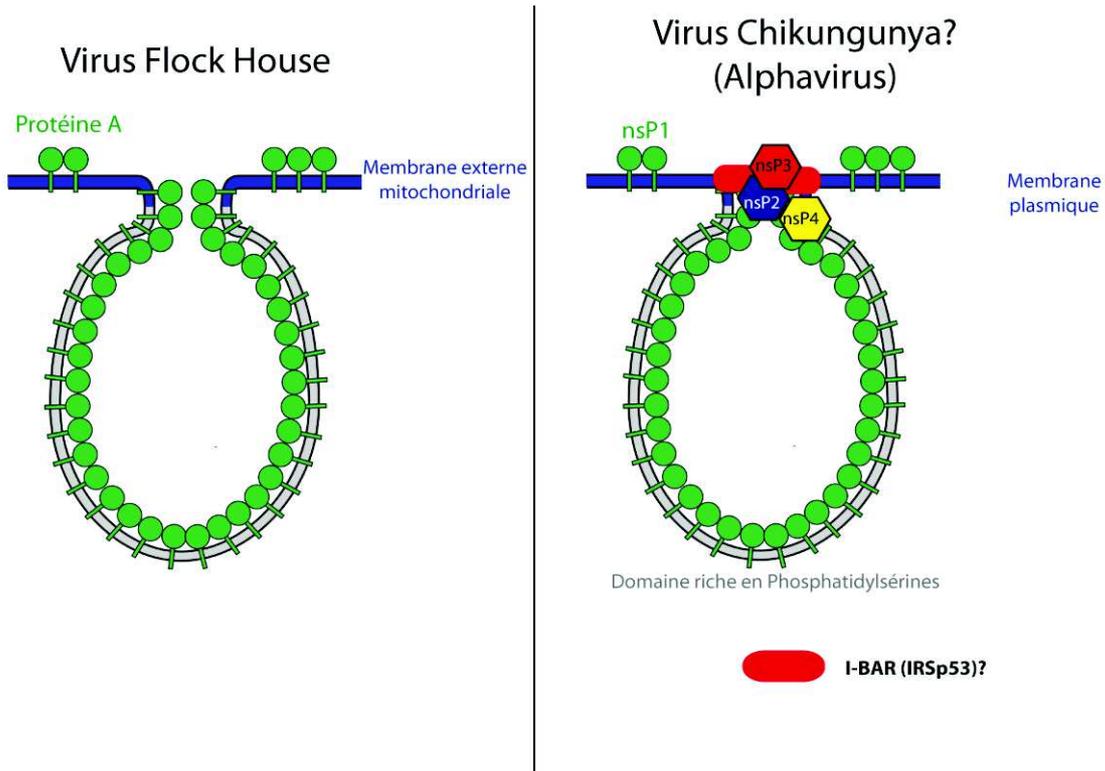
**Figure 65: Modèle global du détournement de composants des granules de stress au profit de la multiplication CHIKV.** 1 : L'ARN génomique de CHIKV libéré dans le cytoplasme de la cellule infectée est pris en charge par DDX3 sur la coiffe en 5'UTR, PABP sur la queue polyA, G3BP en 3'UTR dans un granule de stress cytoplasmique. DHX9 est recrutée sur la tige boucle contenant la séquence Kozak et permet le recrutement de ribosomes. 2 : La synthèse de nsPs au sein des polysomes désassemble le granule de stress. 3 : Les protéines non-structurales s'associent au complexe ARN-protéines du granule (via G3BP ?) et recrutent le complexe aux sites de réplication, à la membrane plasmique. 4 : La sphérule se forme à la membrane en synthétisant le brin d'ARN génomique complémentaire de polarité négative depuis son extrémité 3' grâce à l'hélicase G3BP. 5 : Le complexe de

réplication du CHIKV dégrade de manière protéasome dépendante les molécules des granules impliquées dans la traduction (dont DDX3 et DHX9) de l'ARN génomique viral pour libérer la matrice virale. 6 : L'ARN génomique négatif est synthétisé et sert de matrice pour synthétiser un autre ARN génomique viral de polarité positive. Le point d'interrogation sur G3BP signifie qu'il est incertain que cette protéine assiste l'avancée du complexe de réplication au cours de la synthèse de l'ARN complémentaire à la matrice.

## II. Caractérisation structurale du complexe de réplication

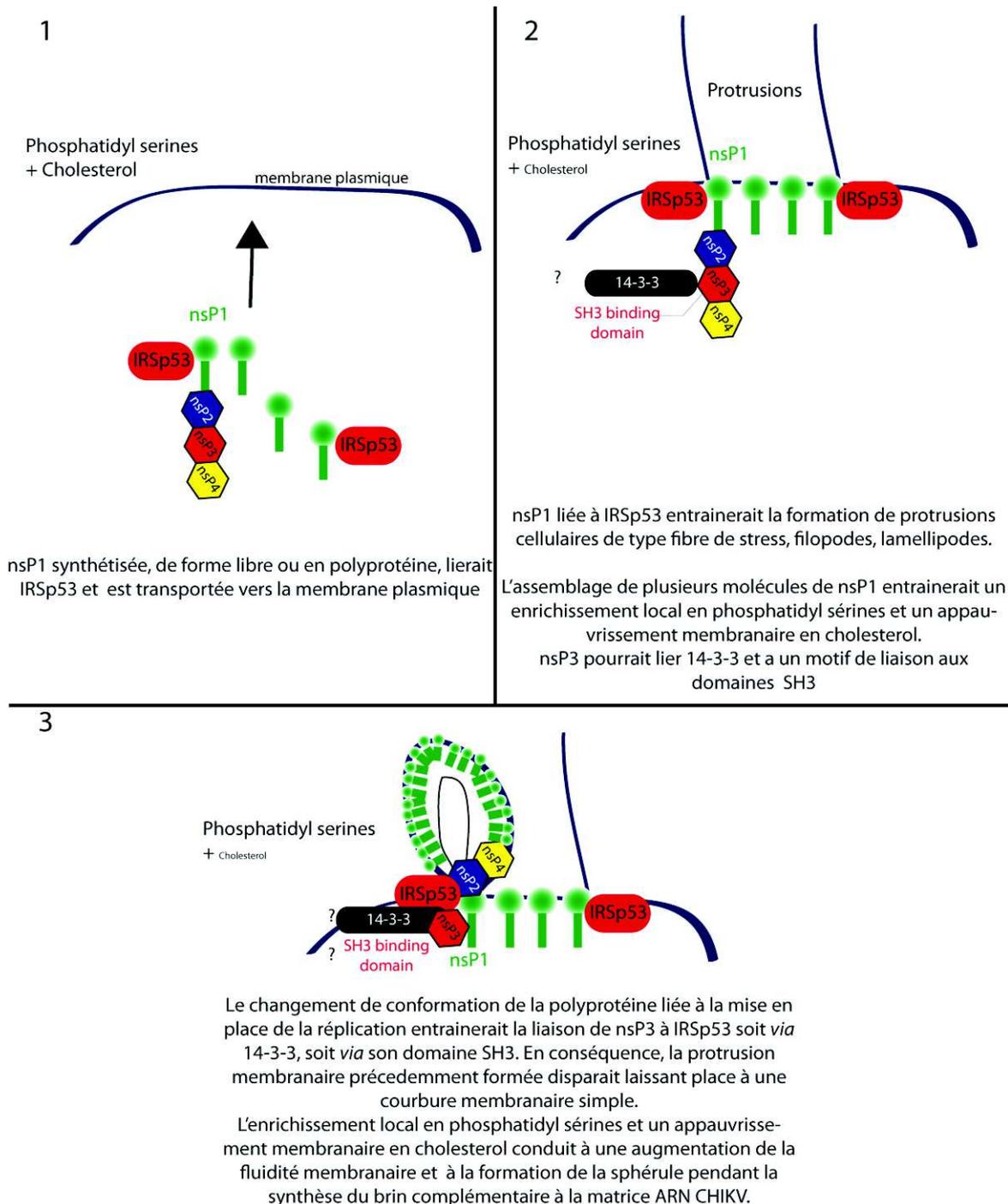
Le recrutement de protéine à domaine I-BAR (peut être IRSp53) pourrait permettre de contribuer à la formation de la sphérule répliquative du CHIKV. Cependant il est possible que le recrutement seul de cette protéine ne soit pas suffisant pour former une sphérule de réplication. En effet, les dimensions des sphérules de l'*Alphavirus* SFV augmentent au cours de la synthèse de l'ARN de polarité négative (Kallio et al. 2013). Du point de vue physique, ceci implique que le feuillet interne (et/ou externe) de la membrane plasmique soit modifiable ou bien que la composition lipidique puisse être remaniée par le recrutement de nouveaux lipides permettant d'obtenir une plus grande fluidité membranaire.

La liaison aux membranes plasmiques et les activités enzymatiques du complexe de réplication du SFV sont dépendants de phospholipides anioniques (Ahola et al. 1999, Lampio et al. 2000). De même, le virus Sindbis est incapable de se répliquer dans des cellules de hamster CHO modifiées pour ne plus exprimer de phospholipides anioniques phosphatidylsérines (Kuge et al. 1989). Pour les *Alphavirus*, les lipides chargés négativement sont indispensables à l'accrochage du complexe de réplication à la membrane plasmique. Cet ancrage est dépendant de l'hélice  $\alpha$  amphiphatique de nsP1 (Spuul et al. 2007). En enrichissant une portion de membrane en phospholipides, le ratio Cholesterol/Phospholipides diminue ce qui a pour conséquence d'augmenter la fluidité des membranes (Cooper 1978) et de faciliter ainsi la courbure de membranes. Dans le cas du CHIKV, pour enrichir un domaine membranaire en phosphatidylsérines, plusieurs molécules de nsP1 pourraient s'ancrer sur ce domaine membranaire. Si tel était le cas, nsP1 tapisserait une partie de la membrane de la sphérule de réplication comme il l'a été démontré avec la protéine A du virus Flock house (Figure 66).



**Figure 66: Modèle proposé pour la formation de la sphérule de réplication du CHIKV. Adapté de Kopek et al, 2007**

Un modèle de recrutement d'IRSp53 et de la biogenèse des sphérules, en lien avec la partie « Etude structurale du complexe de réplication du CHIKV » (Page 109-112) est proposé dans la figure 67.



**Figure 67: Modèle proposé quant au recrutement d'IRSp53 et aux mécanismes de formation de la sphérule au cours de la réplication du CHIKV. La diminution de taille de la police pour le cholestérol souligne la diminution de sa concentration locale.**

Une étude de la caractérisation de ces structures sphériques a été entreprise au cours de cette thèse en collaboration avec le CBS de Montpellier CNRS UMR 5048- INSERM UMR 1054, par une approche de cryo-électromicroscopie, afin de pouvoir définir l'organisation structurale des sphérules du virus Chikungunya. Cette analyse devrait permettre notamment de déterminer l'organisation interne et la stoechiométrie des nsPs.

## Chapitre IV- Matériel et Méthodes

### Culture cellulaire :

Les cellules humaines adhérentes HEK293T et HeLa utilisées au cours de cette thèse ont été cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant de la glutamine (Glutamax ; Gibco-Invitrogen), et supplémenté à hauteur de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 100 U/mL de pénicilline, 100µg/mL de streptomycine. Elles ont ensuite été maintenues dans un incubateur à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Pour la production de stocks viraux, les cellules VERO, BHK21 ont été cultivées dans les mêmes conditions que les cellules humaines adhérentes, les cellules de glandes salivaires d'*Aedes albopictus* C6/36 ont été maintenues dans un incubateur à 26°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### Productions de stocks viraux et titration :

Le cDNA CHIKV-LR 5'GFP (CHIKV147.2) dans lequel la séquence codante pour la GFP, insérée en 5' des gènes structuraux du virus et sous la dépendance d'un second promoteur subgénomique a été produit et décrit par Tsetsarkin et collaborateurs (Tsetsarkin et al. 2006) La production d'ARNm viral à partir de ce cDNA a été permise grâce à une linéarisation par NotI, et transcription in vitro en utilisant le kit SP6 mMACHINE kit (Ambion). Le cDNA pCHIKV-M dans lequel la séquence codante pour le tag mCherry, inséré entre l'histidine 377 et la thréonine 378 de nsP3 a été produit et décrit par Kummerer et collaborateurs (Kummerer et al. 2012). La production d'ARNm viral à partir de ce cDNA a été permise grâce à une linéarisation par NotI, et transcription in vitro en utilisant le kit T7 mMACHINE kit (Ambion). Au laboratoire confiné de niveau 3, 10µg d'ARN ont été transfectés par la lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) dans 1.10<sup>7</sup> BHK21 cultivées dans une flasque de 75cm<sup>2</sup>. 6h post transfection le milieu est changé avec ajout de 15mL de DMEM frais et la flasque est incubée à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> pendant 24h. Le surnageant récupéré est clarifié par centrifugation 5 minutes à 1500 rpm et filtré (filtre à pores de 0,22µm) et est aliquoté par 500µL (+ 2 tube de 1mL pour titration) et congelé à -80°C. Pour la titration virale, 450 000 cellules VERO sont plâtées en plaques 6 puits, la veille de leur infection. Les tubes de 1mL de surnageant filtré sont dilués à différents Log (de 10<sup>-5</sup> à 10<sup>-9</sup>) et 750µL des différentes dilutions sont mis au contact des cellules VERO dépourvues de surnageant pendant 4h. Après 4h d'infection, le surnageant viral est retiré des puits, et les cellules sont rincées avec du DMEM frais. Puis 2mL une gélose constituée de DMEM et d'agarose low gelling temperature (Sigma) à concentration finale de 1,5% est coulée sur les cellules et solidifiée 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont incubées 3 jours à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. A J3 post-infection, la gélose est retirée, et une solution de crystal violet (0,2% de crystal violet dans 10% formaldéhyde et 20% d'éthanol) permet de révéler les plages de lyses. Le titre de la production virale est calculé par:

$$\text{titre viral} = \frac{(\text{Nombre de plages de lyses dans un puit d'un facteur de dilution}) \times 1000}{750}$$

Ex : si 8 plages de lyse ont été retrouvées dans la dilution 10<sup>-7</sup>

$$\text{titre viral} = \frac{(8.10^7) \times 1000}{750} \text{ PFU/mL}$$

$$\text{titre viral} = 1,06 \times 10^8 \text{ PFU/mL}$$

### Production d'un réplicon CHIKV non réplicatif :

La construction ADN SP6-CHIKRepl-P3ZsGreen-SG-mCherry, généreusement offerte par Prof. Andres Merits a été modifiée en utilisant 20 unités d'enzyme de restriction *AfeI*, et le et son tampon CutSmart® (NEB-Biolabs), dont les sites de coupures 6932, 7177, 8023 sont situés dans la séquence de nsP4. La digestion à 37°C pendant 1h30 conduit à une délétion de la séquence 6932-8023 entraînant ainsi une linéarisation du plasmide de taille de 10 685 pb. La ligation du plasmide digéré s'est effectuée à 16°C sur la nuit. Des DH5 $\alpha$ , rendues électrocompétentes au sein du laboratoire ont été transformées avec le plasmide produit par électroporation et étalées sur boîtes contenant un bouillon lysogène et de l'ampicilline 50 $\mu$ g/mL. Les colonies obtenues ont été contrôlée pour la délétion dans nsP4 par PCR en utilisant une amorce sens nsP3 et une amorce antisens nsP4 et ont été amplifiées pour extraction d'ADN et séquençage.

### Anticorps :

Les anticorps anti-nsP1, anti-nsP2, anti-nsP3, anti-nsP4, anti-capside, produits et récupérés de sérums de lapin, sont des dons de Prof. Andres Merits. L'anti-DHX9 est un polyclonal lapin ciblant les acides aminés de la position 1220 à la partie C-terminale, provenant de BETHYL Laboratories, Inc. et référencé sous A300-855A. L'anti-DDX5 utilisé en Immunofluorescence est un polyclonal lapin ciblant les acides aminés de la position 575 à C-terminale et provient de BETHYL Laboratories, Inc et est référencé sous A300-523A-T. Celui qui est utilisé en IP et en Western Blot est un monoclonal souris ciblant la partie C-terminale de DDX5, provenant de SantaCruz Biotechnology et référencé sous SC-166167. L'anti-DDX3 est un polyclonal lapin ciblant les acides aminés de la position 1 à 50, provenant de BETHYL Laboratories, Inc. et référencé sous A300-474A-T. L'anti-dsRNA ou anti-ARN double brin d'English and Scientific Consulting Kft, Hungary (SCICONS) est produit chez la souris et est référencé sous anti-dsRNA. L'anti-IRSp53 est un polyclonal chèvre ciblant la région interne d'IRSp53 provenant de SantaCruz Biotechnology et référencé sous SC-50011. L'anti-GAPDH lapin provient de SantaCruz Biotechnology et est référencé sous SC-25778. L'anti- $\alpha$ -Tubuline lapin est un polyclonal provenant d'Abcam ciblant les 100 premiers acides aminés de la protéine et est référencé sous ab4074. L'anti-RPL7 est un polyclonal lapin ciblant les acides aminés de la position 200 à 248, provenant de BETHYL Laboratories, Inc. et référencé sous A300-741A-T. L'anti-eiF4E est un polyclonal lapin ciblant les acides aminés de la position 925 à 985, provenant de BETHYL Laboratories, Inc. et référencé sous A300-706A-T. L'anti-eiF4G1 est un polyclonal lapin ciblant les acides aminés de la position 200 à 250, provenant de BETHYL Laboratories, Inc. et référencé sous A301-774A-T. L'anti-HA monoclonal, produit chez la souris est référencé sous H9658 chez Sigma. L'anti-GFP monoclonal, reconnaissant l'épitope 157-191 de la GFP provient de SantaCruz Biotechnology (SC-390394). Les anticorps secondaires anti-souris, et anti-chèvre, couplés HRP proviennent de Jackson immunoresearch (référéncés respectivement 115-035-003 et 305-035-003) tandis que les anti-lapin-HRP proviennent de Sigma (A6154-1ML). Pour les expériences d'immunofluorescence, les anticorps anti-lapin 488 (A21206), 594 (A11072), 647 (21244), anti-mouse 488 (A11017), anti-chèvre 647 (A21442) proviennent de Life Technologies. L'anti-mouse 647 (ab150107) a été acheté chez Abcam.

<b>Anticorps</b>	<b>Western-Blot (dilution dans lait 5%)</b>	<b>Immunofluorescence (dilution)</b>
<b>Anti-nsP1</b>	1/10000	1/2000
<b>Anti-nsP2</b>	1/10000	X
<b>Anti-nsP3</b>	1/10000	X
<b>Anti-nsP4</b>	1/2000	X
<b>Anti-DHX9</b>	1/2500	1/500
<b>Anti-DDX5</b>	1/500	1/100
<b>Anti-DDX3</b>	1/1000	1/50
<b>Anti-dsRNA</b>	X	1/300
<b>Anti-IRSp53</b>	1/500	1/50
<b>Anti-GAPDH</b>	1/500	X
<b>Anti-Tubuline</b>	1/1000	X
<b>Anti-RPL7</b>	1/1000	1/50
<b>Anti-eiF4E</b>	1/1000	1/50
<b>Anti-eiF4G1</b>	1/1000	1/50
<b>Anti-GFP</b>	1/500	X
<b>Anti-HA</b>	1/1000	X
<b>Secondaires-HRP</b>	1/10000	X
<b>Secondaires- Immunofluorescence</b>	X	1/2000

### Analyse des protéines :

Western Blot : Les cellules dans lesquelles la quantification de protéines a été réalisée ont été lysées avec un tampon « RIPA » (20mM Tris HCL pH 8 ; 100mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 tablette d'inhibiteur de protéases cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail (Roche)). La concentration protéique de chaque échantillon a été déterminée par dosage Bradford en utilisant le kit « Coomassie Protein Assay reagent » (Thermo Fisher Pierce). Une quantité équivalente de protéines a été déposée

sur gel d'acrylamide dans un tampon de charge Laemmli 5X (312,5mM TRIS pH 6,8 ; 50% glycérol ; 12,5%  $\beta$ -mercaptoethanol ; 10% SDS ; 0,01% Bleu de Bromophénol) et transférée sur membrane PVDF préalablement activée au méthanol pour immunoblot. Après transfert la membrane est saturée au PBS - Tween(0,1%), Lait 5% pendant 1h. La membrane saturée est ensuite découpée et mise à incubation avec les anticorps appropriés sur la nuit, en chambre froide (4°C) sous agitation constante. Après 3 lavages de 5 minutes chacun, le secondaire dilué PBS - Tween(0,1%), Lait 5% mis au contact de la membrane pendant 1h. Le complexe antigène-anticorps primaire-anticorps secondaire est détecté grâce à l'utilisation du substrat de l'HRP Luminata Forte (WBLUF0100- Merck Millipore). La révélation s'est effectuée grâce à l'appareil Gnome (Syngene ou avec la G:Box (Syngene)). La quantification d'expression de protéine a été analysée par le logiciel Image J.

### Immunoprécipitations :

La détection d'ARNs génomiques viraux liés à DHX9 dans le cytoplasme de cellules infectées ou non à une MOI de 5 pendant 8h a été effectuée en utilisant le Magna RIP™ RNA-Binding Protein Immunoprecipitation Kit (Merck Millipore) fourni par Dr. Jean-Marie Péloponèse. Au préalable, les cellules lysées ont été fractionnées en présence d'inhibiteurs de RNase (CS203219 - Merck Millipore) grâce au kit ProteoJET™ Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit (Fermentas Life Sciences) pour récupérer la phase cytoplasmique où s'effectue la réplication du CHIKV. L'anti-DHX9 (Bethyl) a été utilisé pour immunoprécipiter DHX9 et en contrôle l'anti-lapin IgG fourni dans le kit d'immunoprécipitation. Après contact avec les billes magnétiques de protéines A/G et lavages sous aimantation, le volume de billes est divisé en deux fractions : l'une pour quantification par qRT-PCR de l'ARN génomique du CHIKV (voir « Analyses des acides nucléiques ») l'autre pour contrôle d'immunoprécipitation de DHX9 par Western-Blot. Les immunoprécipitations réalisées au cours de l'étude pour confirmer les interactions entre protéines ont été réalisées en mettant en contact 100 à 200 $\mu$ g de lysats protéiques avec soit des billes d'agarose pré-couplées à l'anti-HA (EZ view Red anti-HA E6775-1ML – Sigma) soit avec des billes magnétiques de protéine A (Protein A Mag Sepharose- 28-9440-06 - GE Healthcare Life Sciences). Lors de l'utilisation des billes d'agarose pré-couplées à l'anti-HA, 30 $\mu$ L par échantillon sont lavées avec 1mL de tampon de lyse « RIPA », centrifugation 4000 rpm, 4°C, pendant 10 minutes. 200 $\mu$ g de protéines transfectées avec les constructions de DHX9 tagguée -HA sont ajoutées aux billes lavées et incubées 4°C sur la nuit, sur roue à rotation 14 rpm. Pour les billes magnétiques de protéine A, 5 $\mu$ g d'anticorps spécifiques à la cible immunoprécipitée, ou anti-HA comme irrelevant, sont déposés dans les lysats protéiques. Le complexe lysat/anticorps est incubé à 4°C, sur la nuit et sur roue à rotation 14rpm. Le jour suivant, 15 $\mu$ L de billes magnétiques de protéine A sont rajoutées et les lysats immunoprécipités + billes sont déposés sur roue à 4°C, sur la nuit ou 4h à température ambiante sur roue à 14rpm. Pour les immunoprécipitations avec billes d'agarose pré-couplées à l'anti-HA, des 5 lavages de 1mL de RIPA froid/ centrifugation 4000rpm sont effectués. Pour les billes magnétiques de protéine A, 5 lavages de 1mL de RIPA froid/aimantation sont effectués. L'élution des immunoprécipitations s'effectue en ajoutant aux billes 70 $\mu$ L de tampon de charge 1X puis bain à 95°C pendant 15 minutes. Les extraits de lysats sont également mis à bouillir et sont considérés comme « input ». Les « input » et extraits immunoprécipités sont analysés par Western-Blot. Pour l'interaction de DHX9 avec le complexe de réplication du CHIKV, un traitement à la RNase A (RNASEA-RO Roche), à été effectué (10 $\mu$ gde RNase A pendant 2h à 37°C)

## Analyse des acides nucléiques:

Lavage PBS 2 fois, trypsine 5 min à 37°C, +Volume égal de DMEMc, passage en plaque 96 puits fond conique, lavages PBS.

### **Extraction des ARNs :**

Lyser les cellules avec 1 mL de TRI Reagent (T9424- Sigma)

Incuber 5 min à Température ambiante

Ajouter 200 µL de chloroforme (par mL de Tri Reagent), vortexer le mélange

Centri 13 200 rpm à 4°C pendant 10 min

Récupération phase aqueuse

Ajout de 500 µL d'isopropanol (par mL de Tri reagent), vortexer 10 sec, incubation 5 à 10 minute à T° ambiante.

Centrifuger à 13 200 rpm à 4°C pendant 10 min

Éliminer le surnageant

Laver le culot avec 1 mL d'éthanol 75% froid, centrifuger 7 500g 5 minutes, éliminer l'éthanol et fait sécher le culot.

Reprendre le culot d'ARN dans 26µL d'eau stérile

Traitement à la DNase

26 µL d'Echantillon + 3µL Tp DNase 10x + 1µL de DNase : 45 min à 37°C

Inactivation DNase par ajout EDTA 5 mM final et 15 min 75°C

### ***Pour le brin génomique négatif CHIKV***

### **Réaction de Transcription inverse utilisant la SuperScript® III Reverse Transcriptase (18080044-ThermoFisher Scientific) :**

Préparer le mix CHIKV T Tag Strand (-) (nsp1) / dNTP : 1µL primer à 10 uM (= 500 nM final) + 1µL dNTP 10 mM (préparer 2 fois plus de mix que le nombre d'échantillon car RT + et RT-)

*Amorce CHIKV T Tag Strand (-) (nsp1) :*

5' GGCAGTATCGTGAATTCGATGCCGCTGTACCGTCCCCATTCC 3'

Prévoir un point avec RT et sans oligos (=vérification autoprimering)

2µL mix ChikV T Tag Strand (-) (nsp1) / dNTP + 11µL Echantillon traité à la DNase (faire des duplicats pour chaque échantillon : RT+ et RT-)

Chauffer 5 min à 65°C et 1 minute dans la glace

Préparer les mix RT+ et RT-

Mix x 1 : 4µL de TP 5x, 1µl DTT 0.1M, 1µL SuperScript (pour le mix RT+), 1µL H<sub>2</sub>O pour le mix RT+ ou 2 uL H<sub>2</sub>O pour RT-

7µL mix RT+ou- par échantillon, mixer à la pipette, incuber 1h à 42°C

Inactiver la RT 15 min à 70°C

Précipitation EtoH 100% + Ac Na 3M

**Traitement Exonuclease I :**

37°C – 1h

Inactivation exonuclease 80°C – 20 min

**Dosage ADNc par qPCR :**

Préparer le mix qPCR :

Mix 1 : 0.9µL H<sub>2</sub>O, 5µL Super mix SYBR Green (Roche), 0.8µL amorce Tag strand (-) à 10 µM, 0.8µL amorce CHIKV complement strand (+) (nsP1) à 10 µM.

Amorces :

*Tag strand (-): 5'GGCAGTATCGTGAATTCGATGC 3'*

*CHIKV complement strand (+) (nsP1): 5' ACTGCTGAGTCCAAAGTGGG 3'*

Distribuer 7.5µL de mix dans chaque tube PCR, ajouter 2.5µL de l'échantillon à doser.

**Cycles sur RotorGene:**

1 cycle

95°C – 10 min

40 cycles

95°C – 15 sec

62 °C – 30 sec

72°C – 30 sec

1 cycle :

Hold 4°C

### ***Pour le brin génomique positif CHIKV***

#### **Réaction de Transcription inverse utilisant la SuperScript® III Reverse Transcriptase (18080044-ThermoFisher Scientific) :**

Préparer le mix Oligo dT-dNTP : 1µL oligo dT 50µM + 1µL dNTP 10 mM (préparer deux fois plus de mix que le nombre d'échantillon)

2µL Mix OligodT-dNTP + 11µL Echantillon traité à la DNase (faire des duplicats pour chaque échantillon : RT+ et RT-)

Chauffer 5 min à 65°C et 1 minute dans la glace.

Préparer les mix RT+ et RT-

Mix x 1 : 4µL de TP 5x, 1µL DTT 0.1M, 1µL SuperScript (pour le mix RT+) + 1µL H<sub>2</sub>O ou 2µL H<sub>2</sub>O pour le mix RT -.

7µL mix RT+ou- par échantillon, mixer à la pipette, incuber 1h à 52°C.

Inactiver la RT 15 min à 70°C

#### **Dosage des ADNc par qPCR :**

Préparer une gamme de 40, 400, 4000, 40 000 et 400 000 copies/µL en H<sub>2</sub>O (car on en met 2,5 µL par point dans 10µL final donc la quantité (copies) d'ADN CHIKV par tube de la gamme est 100, 1000, 10 000, 100 000 et 1 000 000)

Préparer le mix qPCR :

Mix nsP2 : 0.9µL H<sub>2</sub>O, 5µL Super mix SYBR Green (Roche), 0.8µL amorce sens nsP2 ou Interféron-β à 5µM, 0.8µL amorce anti-sens nsP2 ou Interféron-β à 5µM.

Mix GAPDH : 0.9µL H<sub>2</sub>O, 5µL Super mix SYBR Green (Roche), 0.8µL amorce sens GAPDH à 5µM, 0.8µL amorce anti-sens GAPDH à 5µM.

#### **Amorces :**

*nsP2 sens: 5'GGCAGTGGTCCCAGATAATTCAA 3'*

*nsP2 anti-sens: 5'GCTGTCTAGATCCACCCCATACA 3'*

*Interféron-β sens: 5'GACGCCGCATTGACCATCTA 3'*

*Interféron-β anti-sens: 5'TTGGCCTTCAGGTAATGCAGAA 3'*

*GAPDH sens: 5'GCTCACTGGCATGGCCTTCCGTG 3'*

*GAPDH anti-sens: 5'TGGAGGAGTGGGTGTCGCTGTTG 3'*

Distribuer 7.5µL de mix dans chaque tube PCR (distinct), ajouter 2.5µL de l'échantillon à doser.

#### **Cycles sur RotorGene:**

1 cycle

95 °C – 10 minutes

40 cycles :

95°C – 30 secondes

60 °C – 30 sec

72°C – 30 sec

1 cycle:

Hold 4°C

Les données sont ensuite analysées via le logiciel Rotor-Gene 6

### Plasmides :

Les plasmides HA-DHX9, HA-DHX9ΔDExDc, HA-DHX9ΔDSRM, HA-DHX9ΔHelicC, HA-DHX9ΔHD ont été fournis par Dr. Jean-Marie Péloponèse et précédemment décrit par (Zhang et al., 2011d). Le plasmide contrôle pcDNA3.1 BirA(R118G)-HA, a été fourni par Dr. Matteo Bonazzi. Les protéines non-structurales nsP1, nsP2, nsP3, nsP4 ont été clonées dans un peGFP-C1 par digestion et ligation en utilisant des amorces dont amplifiant les séquences des nsPs à partir du cDNA CHIKV-LR 5'GFP.

**Amorces nsP1** contenant les sites de restrictions **HindIII** (NEB Biolabs)-**PstI** (NEB Biolabs) :

Sens : 5' AGATCTCGAGCTC**AAGCT**TCGATGGAATCCTGTGTACGTG 3'

Anti-Sens : 5' TTAACCGTCGA**CTGCAG**ATCCTGCGCCCGCTCTGTC 3'

**Amorces nsP2** contenant les sites de restrictions **XhoI** (NEB Biolabs)-**KpnI** (Fermentas) :

Sens : 5' TCCGACTCAGAT**CTCGAG**CTATAATAGAGACTCCGAGAGGA 3'

Anti-Sens : 5' GGATCCCGGGCCCCGC**GGTACC**ACATCCTGCTCGGGTGGC 3'

**Amorces nsP3** contenant les sites de restrictions **XhoI** (NEB Biolabs)-**KpnI** (Fermentas) :

Sens : 5' TCCGACTCAGAT**CTCGAG**CTGCACCGTCGTACCGGGTA 3'

Anti-Sens : 5' GGATCCCGGGCCCCGC**GGTACC**CCACCTGCCCTGTCTAG 3'

**Amorces nsP4** contenant les sites de restrictions **XhoI** (NEB Biolabs)-**KpnI** (Fermentas) :

Sens : 5' TCCGACTCAGAT**CTCGAG**CTTATATATTCTCGTCGGAC 3'

Anti-Sens : 5' GGATCCCGGGCCCCGC**GGTACC**CTATTTAGGACCGCCGTA 3'

Après digestion des séquences de nsPs purifiées sur gel à 37°C pendant 1h, une ligation a été effectuée avec un ratio 1 vecteur peGFP-C1 digéré/ 5 inserts nsPs digérés à 16°C sur la nuit. Une transformation par électroporation a été réalisée et les bactéries ont alors été étalées sur boîte de pétri contenant un bouillon lysogène et l'antibiotique Kanamycine (50µg/mL). Les boîtesensemencées sont incubées à 37°C sur la nuit. Les colonies piquées sont amplifiées et contrôlées par PCR. Une maxiprep des colonies positives est réalisée en utilisant le QIAGEN Plasmid Maxi Kit (12163- QIAGEN).

### Protocole d'Immunofluorescence :

- Retirer le milieu de culture
- 1 lavage avec 500 µL PBS
- Fixation avec 500 uL Formaline (PFA 4%) 15 minutes à RT
- 3 lavages PBS
- Perméabilisation Triton 0.1% dans PBS (10µL Triton ; 10mL PBS) (**500µL** par puit)
- 2 lavages PBS
- Saturation avec **500** µL PBS + 2% SVF décomplémenté et filtré + 0.05% tween (50mL PBS ; 25µL Tween ; 1mL SVF) pendant 60' à température ambiante
- 1 lavage PBS
- Anticorps dilué dans PBS + tween 0.05% + BSA 0.2% (50mL PBS + 25µL Tween + 0,1g BSA)
- **150 uL** d'anticorps dilué par lamelle
- 2h d'incubation pour l'anticorps primaire
- 3 lavages au PBS (500µL)
- 1h d'incubation pour l'anticorps secondaire
- 3 lavages au PBS (500µL)
- Dapi à diluer au 1/1000 dans PBS (**150µL/puit**) incubation de 15 minutes.
- 2 lavages PBS
- Montage de la lamelle sur lame en utilisant le ProLong® Gold Antifade Mountant (P10144)

### Traitement aux drogues/molécules :

La guanosine (G6752- Sigma) solubilisée dans de l'eau stérile été ajouté 2 h post transfection pour atteindre une concentration finale de 50µM jusqu'à fixation des lamelles. La transfection de GFP-nsP2 a été effectuée selon le protocole Jet-Pei (Polyplus), au Polyéthylèneimine 'Max' préalablement dissout dans l'eau et aliquoté à 5mg/mL (linear, MW 25 000) (Polysciences, Inca).

La ribavirine (R9644- Sigma), solubilisée dans l'eau stérile a été ajoutée 2h post transfection de peGFP-C1 ou 1h post-infection avec CHIKV pour atteindre une concentration finale de 200µM et jusqu'à la fixation des lamelles ou jusqu'à lyse des cellules infectées.

L'ALLN (sc-221236- SantaCruz Biotechnology), solubilisée dans du DMSO a été ajoutée au moment de l'infection par CHIKV et à une concentration finale de 10µM.

## Cellules Sh-DHX9 et CRISPR/Cas9-DHX9:

### **Sh-DHX9**

Les plasmides codant pour les séquences sh-RNA ciblant DHX9 et le vecteur vide pLKO.1 ont été fournis par Dr. Jean-Marie Péloponèse et proviennent de Sigma.

SH2: pLKO.1 DHX9 (Sigma-TRCN0000314575):

5'CCGGACGACAATGGAAGCGGATATACTCGAGTATATCCGCTTCCATTGTCGTTT  
TTTG 3'

SH3 : pLKO.1 DHX9 (Sigma-TRCN0000350304):

5'CCGGGGGCTATATCCATCGAAATTTCTCGAGAAATTTTCGATGGATATAGCCCTT  
TTTG 3'

Les plasmides pLKO.1 ont été transfectés isolément ou en combinaison SH2+SH3 dans des HEK293T 1x10<sup>6</sup> cellules par puit en plaque 6 puits grâce à la lipofectamine 2000. 6h après transfection le milieu est changé. 24h post transfection, la puromycine à 2µg/mL est ajoutée à la culture afin de sélectionner les cellules ayant exprimé le sh-RNA. Les cellules sélectionnées sont piquées et mis en culture sous puromycine dans une plaque 96 puits puis, 12 puits, puis 6 puits. Les clones sont alors testés pour l'expression de DHX9 par western-blot et congelées à -80°C dans des cryotubes + 10% DMSO.

### **CRISPR/Cas9-DHX9**

Les plasmides pUC57-sgRNA expression vector et pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458) ont été fournis par Frédéric Lionneton de la plateforme Montpellier Genomic Collections. Les oligos ont été sélectionnés grâce au site <http://crispr.mit.edu> et en utilisant la séquence de l'exon 1 de DHX9 (Référence NCBI : NM\_001357.4).

Séquence sens : 5' CACCGCATCTTCCTTTTGCCACACC 3'

Séquence anti-sens : 5' AAACGGTGTGGCAAAGGAAGATGC 3'

Ces oligos ont ensuite été dimérisés selon le protocole suivant :

1µl de chacun des oligos à 100µM, 1µl Tampon enzyme BbsI, 7µl eau

-95°C 2min

Repos à température ambiante jusqu'à ce que la température soit inférieure à 65°C

5µg de vecteur d'expression pUC57-sgRNA a été digéré par BbsI (Lifetechnologies- ER1011) dans un volume de 50µL final, 3h à 37°C.

Une migration sur gel agarose 1% et purification sur colonne ont été entreprises et le plasmide digéré est repris dans 30µL d'eau stérile.

Une ligation en présence des oligos dimérisés s'effectue selon les conditions suivantes :

10µl de volume final :

2µl de vecteur digéré par BpiI (200ng)

0,5µl oligo double brin (200ng)

1µl ATP 10nM

1µl Tampon G

1µl T4 ligase

0,5µl BpiI (pour éviter que le vecteur ne se re-ligue sur lui-même)

4µl d'eau stérile

Incubation 37°C sur la nuit.

Une transformation des bactéries par électroporation permet d'amplifier le vecteur d'expression pUC57-DHX9sgRNA. Un contrôle par séquençage permet de vérifier les clones DH5α ayant poussé sur bouillon lysogène contenant l'antibiotique Kanamycine (50µg/mL).

1,25µg des plasmides pUC57-DHX9sgRNA et pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458) sont co-transfectées dans des HEK293T platées en plaques 6 puits grâce à la lipofectamine 2000. 6h post transfection, le milieu est retiré et les cellules sont trypsinées (par la Trypsine-EDTA (0.25%) - référencé sous 25200056 - ThermoFisher Scientific). La suspension cellulaire est comptée et une concentration de 20 000 cellules par mL est établie. 2000 cellules dans 200µL sont déposées dans un puit de plaque 96 puits. Une dilution au ½ est effectuée de puit en puit en vertical depuis le puit A1 vers le puit H1. Une dilution au ½ est ensuite ré-effectuée des puits A1 à H1 vers les puits A12 vers H12. L'apparition de clones positifs à la GFP est vérifiée chaque jour. Les clones positifs à la GFP sont transférés en plaque 24 puits pour expansion, puis en plaque 12 puits et enfin en plaque 6 puits.

### Analyses statistiques :

Toutes les analyses statistiques réalisées au cours de cette thèse ont été produites grâce à des *test t-student* au sein du logiciel Prism 7 (Graphpad).

### Imagerie :

Les images présentées sont issues du microscope inversé à fluorescence EVOS™ FL Cell Imaging System présent au sein de l'équipe de Matteo Bonazzi, et d'un microscope confocal LEICA SP5 présent sur la plateforme Montpellier RIO Imaging (MRI) du Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire (CRBM). Les images obtenues des différents canaux ont été traitées, analysées et assemblées grâce au logiciel Image J.

## **Chapitre V-Conclusion Générale**

**Au cours de ces travaux nous avons caractérisé la fonction de DHX9 dans le cycle de multiplication du CHIKV :**

Lors de l'infection de CHIKV, l'ARN libéré dans le cytoplasme est pris en charge par des Ribonucléoprotéines et Hélicases présentes dans les granules de stress.

-L'association de DHX9 à l'ARN viral permet de traduire le premier cadre de lecture, permettant ainsi la synthèse des protéines non-structurales portant les activités enzymatiques du virus nécessaires à la formation des complexes de réplication du CHIKV.

-Ces protéines non-structurales peuvent détourner des molécules liées à l'ARN virale et migrer vers la membrane plasmique où sera formée la sphérule répliquative.

-La protéine nsP3 interagit avec le domaine hélicase de DHX9. Lors de la réplication, les protéines liées à l'ARN, en particulier DHX9, sont dégradées de manière active, dépendante du protéasome. En effet, la présence de ces protéines ne permet pas l'accès du complexe de réplication à la matrice d'ARN viral de polarité positive à partir de laquelle l'ARN de polarité négative est synthétisé.

-En dégradant DHX9, le CHIKV non seulement permet la réplication du génome viral, mais s'assure également que l'hélicase possédant un domaine DEIH n'induit pas la production d'IFN- $\beta$  pouvant d'inhiber la prolifération virale.

**En parallèle de ces travaux, nous avons étudié le mécanisme de biogenèse des sphérules de réplication par une approche fonctionnelle et structurale.**

-Une protéine à domaine I-BAR, IRSp53, est retrouvée au niveau des sites de réplication du CHIKV et sa fonction dans l'initiation de la courbure de membrane de relief négatif devra être analysée par des approches expérimentales complémentaires.

-Enfin, une étude structurale de la sphérule de réplication débutée au cours de ma thèse permettra de caractériser l'architecture du complexe de réplication du CHIKV.

## **Chapitre VI- Bibliographie**

- Abaeva, I. S., A. Marintchev, V. P. Pisareva, C. U. Hellen and T. V. Pestova (2011). "Bypassing of stems versus linear base-by-base inspection of mammalian mRNAs during ribosomal scanning." EMBO J **30**(1): 115-129.
- Abdel-Monem, M. and H. Hoffmann-Berling (1976). "Enzymic unwinding of DNA. 1. Purification and characterization of a DNA-dependent ATPase from *Escherichia coli*." Eur J Biochem **65**(2): 431-440.
- Ablasser, A., F. Bauernfeind, G. Hartmann, E. Latz, K. A. Fitzgerald and V. Hornung (2009). "RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate." Nat Immunol **10**(10): 1065-1072.
- Abraham, R., P. Mudaliar, A. Padmanabhan and E. Sreekumar (2013). "Induction of cytopathogenicity in human glioblastoma cells by chikungunya virus." PLoS ONE **8**(9): e75854-e75854.
- Adhami, J. and P. Reiter (1998). "Introduction and establishment of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* skuse (Diptera: Culicidae) in Albania." J Am Mosq Control Assoc **14**(3): 340-343.
- Agaisse, H. and N. Perrimon (2004). "The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses." Immunol Rev **198**: 72-82.
- Aggarwal, N. T., S. L. Pfister, K. M. Gauthier, Y. Chawengsub, J. E. Baker and W. B. Campbell (2009). "Chronic hypoxia enhances 15-lipoxygenase-mediated vasorelaxation in rabbit arteries." Am J Physiol Heart Circ Physiol **296**(3): H678-688.
- Ahola, T. and L. Kaariainen (1995). "Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(2): 507-511.
- Ahola, T., P. Kujala, M. Tuittila, T. Blom, P. Laakkonen, A. Hinkkanen and P. Auvinen (2000). "Effects of Palmitoylation of Replicase Protein nsP1 on Alphavirus Infection." Journal of Virology **74**(15): 6725-6733.
- Ahola, T., P. Laakkonen, H. Vihinen and L. Kaariainen (1997). "Critical residues of Semliki Forest virus RNA capping enzyme involved in methyltransferase and guanylyltransferase-like activities." Journal of Virology **71**(1): 392-397.
- Ahola, T., A. Lampio, P. Auvinen and L. Kaariainen (1999). "Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity." EMBO J **18**(11): 3164-3172.
- Aitken, C. E. and J. R. Lorsch (2012). "A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes." Nature Structural & Molecular Biology **19**(6): 568-576.
- Akhrymuk, I., I. Frolov and E. I. Frolova (2016). "Both RIG-I and MDA5 detect alphavirus replication in concentration-dependent mode." Virology **487**: 230-241.
- Akhrymuk, I., S. V. Kulemzin and E. I. Frolova (2012). "Evasion of the Innate Immune Response: the Old World Alphavirus nsP2 Protein Induces Rapid Degradation of Rpb1, a Catalytic Subunit of RNA Polymerase II." Journal of Virology **86**(13): 7180-7191.

- Amaya, M., T. Brooks-Faulconer, T. Lark, F. Keck, C. Bailey, V. Raman and A. Narayanan (2016). "Venezuelan equine encephalitis virus non-structural protein 3 (nsP3) interacts with RNA helicases DDX1 and DDX3 in infected cells." Antiviral Res **131**: 49-60.
- Andersen, C. B., L. Ballut, J. S. Johansen, H. Chamieh, K. H. Nielsen, C. L. Oliveira, J. S. Pedersen, B. Seraphin, H. Le Hir and G. R. Andersen (2006). "Structure of the exon junction core complex with a trapped DEAD-box ATPase bound to RNA." Science (New York, N.Y.) **313**(5795): 1968-1972.
- Andersen, J. S., Y. W. Lam, A. K. Leung, S. E. Ong, C. E. Lyon, A. I. Lamond and M. Mann (2005). "Nucleolar proteome dynamics." Nature **433**(7021): 77-83.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2002). "Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation." Cell Stress Chaperones **7**(2): 213-221.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2006). "RNA granules." The Journal of Cell Biology **172**(6): 803-808.
- Antoine, A. F., C. Montpellier, K. Cailliau, E. Browaeys-Poly, J. P. Vilain and J. Dubuisson (2007). "The alphavirus 6K protein activates endogenous ionic conductances when expressed in *Xenopus* oocytes." J Membr Biol **215**(1): 37-48.
- Arankalle, V. A., S. Shrivastava, S. Cherian, R. S. Gunjekar, A. M. Walimbe, S. M. Jadhav, A. B. Sudeep and A. C. Mishra (2007). "Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic." Journal of General Virology **88**(Pt 7): 1967-1976.
- Aratani, S., R. Fujii, H. Fujita, A. Fukamizu and T. Nakajima (2003). "Aromatic residues are required for RNA helicase A mediated transactivation." Int J Mol Med **12**(2): 175-180.
- Aratani, S., R. Fujii, T. Oishi, H. Fujita, T. Amano, T. Ohshima, M. Hagiwara, A. Fukamizu and T. Nakajima (2001). "Dual roles of RNA helicase A in CREB-dependent transcription." Mol Cell Biol **21**(14): 4460-4469.
- Aratani, S., T. Oishi, H. Fujita, M. Nakazawa, R. Fujii, N. Imamoto, Y. Yoneda, A. Fukamizu and T. Nakajima (2006). "The nuclear import of RNA helicase A is mediated by importin- $\alpha$ 3." Biochem Biophys Res Commun **340**(1): 125-133.
- Ariumi, Y., M. Kuroki, K. Abe, H. Dansako, M. Ikeda, T. Wakita and N. Kato (2007). "DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication." Journal of Virology **81**(24): 13922-13926.
- Aschenbrenner, L., T. Lee and T. Hasson (2003). "Myo6 facilitates the translocation of endocytic vesicles from cell peripheries." Molecular Biology of the Cell **14**(7): 2728-2743.
- Assouline, S., B. Culjkovic, E. Cocolakis, C. Rousseau, N. Beslu, A. Amri, S. Caplan, B. Leber, D. C. Roy, W. H. Miller, Jr. and K. L. Borden (2009). "Molecular targeting of the oncogene eIF4E in acute myeloid leukemia (AML): a proof-of-principle clinical trial with ribavirin." Blood **114**(2): 257-260.

- Atasheva, S., A. Fish, M. Fornerod and E. I. Frolova (2010). "Venezuelan equine Encephalitis virus capsid protein forms a tetrameric complex with CRM1 and importin alpha/beta that obstructs nuclear pore complex function." Journal of Virology **84**(9): 4158-4171.
- Atasheva, S., N. Garmashova, I. Frolov and E. Frolova (2008). "Venezuelan equine encephalitis virus capsid protein inhibits nuclear import in Mammalian but not in mosquito cells." Journal of Virology **82**(8): 4028-4041.
- Aubry, M., J. Finke, A. Teissier, C. Roche, J. Broult, S. Paulous, P. Despres, V. M. Cao-Lormeau and D. Musso (2015). "Seroprevalence of arboviruses among blood donors in French Polynesia, 2011-2013." Int J Infect Dis **41**: 11-12.
- Balint, E. E. and K. H. Vousden (2001). "Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein." Br J Cancer **85**(12): 1813-1823.
- Ball, L. A. (1995). "Requirements for the self-directed replication of flock house virus RNA 1." J Virol **69**(4): 2722.
- Banroques, J., M. Doere, M. Dreyfus, P. Linder and N. K. Tanner (2010). "Motif III in superfamily 2 "helicases" helps convert the binding energy of ATP into a high-affinity RNA binding site in the yeast DEAD-box protein Ded1." J Mol Biol **396**(4): 949-966.
- Barbalat, R., S. E. Ewald, M. L. Mouchess and G. M. Barton (2011). "Nucleic acid recognition by the innate immune system." Annu Rev Immunol **29**: 185-214.
- Barnhart, M. D., S. L. Moon, A. W. Emch, C. J. Wilusz and J. Wilusz (2013). "Changes in cellular mRNA stability, splicing, and polyadenylation through HuR protein sequestration by a cytoplasmic RNA virus." Cell Rep **5**(4): 909-917.
- Barral, P. M., J. M. Morrison, J. Drahos, P. Gupta, D. Sarkar, P. B. Fisher and V. R. Racaniello (2007). "MDA-5 is cleaved in poliovirus-infected cells." Journal of Virology **81**(8): 3677-3684.
- Barry, G., R. Fragkoudis, M. C. Ferguson, A. Lulla, A. Merits, A. Kohl and J. K. Fazakerley (2010). "Semliki forest virus-induced endoplasmic reticulum stress accelerates apoptotic death of mammalian cells." Journal of Virology **84**(14): 7369-7377.
- Bates, G. J., S. M. Nicol, B. J. Wilson, A. M. Jacobs, J. C. Bourdon, J. Wardrop, D. J. Gregory, D. P. Lane, N. D. Perkins and F. V. Fuller-Pace (2005). "The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor." EMBO J **24**(3): 543-553.
- Beck, C. E. and R. W. Wyckoff (1938). "Venezuelan Equine Encephalomyelitis." Science (New York, N.Y.) **88**(2292): 530.
- Beltran, D. and S. Lopez-Verges (2014). "NK Cells during Dengue Disease and Their Recognition of Dengue Virus-Infected cells." Front Immunol **5**: 192.
- Berlanga, J. J., I. Ventoso, H. P. Harding, J. Deng, D. Ron, N. Sonenberg, L. Carrasco and C. de Haro (2006). "Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2alpha kinase GCN2 against RNA viruses." EMBO J **25**(8): 1730-1740.

- Bernard, E., R. Hamel, A. Neyret, P. Ekchariyawat, J.-P. Molès, G. Simmons, N. Chazal, P. Desprès, D. Missé and L. Briant (2015). "Human keratinocytes restrict chikungunya virus replication at a post-fusion step." Virology **476**: 1-10.
- Bernard, E., M. Solignat, B. Gay, N. Chazal, S. Higgs, C. Devaux and L. Briant (2010). "Endocytosis of Chikungunya Virus into Mammalian Cells: Role of Clathrin and Early Endosomal Compartments." PLoS ONE **5**(7): e11479.
- Berthelot, K., M. Muldoon, L. Rajkowitsch, J. Hughes and J. E. McCarthy (2004). "Dynamics and processivity of 40S ribosome scanning on mRNA in yeast." Mol Microbiol **51**(4): 987-1001.
- Bertolotti, A., Y. Zhang, L. M. Hendershot, H. P. Harding and D. Ron (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." Nature Cell Biology **2**(6): 326-332.
- Bien, S., C. A. Ritter, M. Gratz, B. Sperker, J. Sonnemann, J. F. Beck and H. K. Kroemer (2004). "Nuclear factor-kappaB mediates up-regulation of cathepsin B by doxorubicin in tumor cells." Mol Pharmacol **65**(5): 1092-1102.
- Bienz, K., D. Egger, Y. Rasser and W. Bossart (1983). "Intracellular distribution of poliovirus proteins and the induction of virus-specific cytoplasmic structures." Virology **131**(1): 39-48.
- Bissonnette, E. Y., P. A. Rossignol and A. D. Befus (1993). "Extracts of mosquito salivary gland inhibit tumour necrosis factor alpha release from mast cells." Parasite Immunol **15**(1): 27-33.
- Bolinger, C., A. Sharma, D. Singh, L. Yu and K. Boris-Lawrie (2010). "RNA helicase A modulates translation of HIV-1 and infectivity of progeny virions." Nucleic Acids Research **38**(5): 1686-1696.
- Bolinger, C., A. Yilmaz, T. R. Hartman, M. B. Kovacic, S. Fernandez, J. Ye, M. Forget, P. L. Green and K. Boris-Lawrie (2007). "RNA helicase A interacts with divergent lymphotropic retroviruses and promotes translation of human T-cell leukemia virus type 1." Nucleic Acids Research **35**(8): 2629-2642.
- Bonatti, S., G. Migliaccio and K. Simons (1989). "Palmitoylation of viral membrane glycoproteins takes place after exit from the endoplasmic reticulum." The Journal of Biological Chemistry **264**(21): 12590-12595.
- Bosco, D. A., N. Lemay, H. K. Ko, H. Zhou, C. Burke, T. J. Kwiatkowski, Jr., P. Sapp, D. McKenna-Yasek, R. H. Brown, Jr. and L. J. Hayward (2010). "Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules." Hum Mol Genet **19**(21): 4160-4175.
- Bourai, M., M. Lucas-Hourani, H. H. Gad, C. Drosten, Y. Jacob, L. Tafforeau, P. Cassonnet, L. M. Jones, D. Judith, T. Couderc, M. Lecuit, P. Andre, B. M. Kummerer, V. Lotteau, P. Despres, F. Tangy and P. O. Vidalain (2012). "Mapping of Chikungunya Virus Interactions with Host Proteins Identified nsP2 as a Highly Connected Viral Component." Journal of Virology **86**(6): 3121-3134.

- Bowers, D. F., C. G. Coleman and D. T. Brown (2003). "Sindbis virus-associated pathology in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)." J Med Entomol **40**(5): 698-705.
- Breakwell, L., P. Dosenovic, G. B. Karlsson Hedestam, M. D'Amato, P. Liljestrom, J. Fazakerley and G. M. McInerney (2007). "Semliki Forest virus nonstructural protein 2 is involved in suppression of the type I interferon response." Journal of Virology **81**(16): 8677-8684.
- Brenner, S., L. Barnett, E. R. Katz and F. H. Crick (1967). "UGA: a third nonsense triplet in the genetic code." Nature **213**(5075): 449-450.
- Briggs, M. S., L. M. Gierasch, A. Zlotnick, J. D. Lear and W. F. DeGrado (1985). "In vivo function and membrane binding properties are correlated for *Escherichia coli* lamB signal peptides." Science (New York, N.Y.) **228**(4703): 1096-1099.
- Brow, D. A. (2002). "Allosteric cascade of spliceosome activation." Annu Rev Genet **36**: 333-360.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (2009). "Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL." J Lipid Res **50** Suppl: S15-27.
- Buchan, J. R. and R. Parker (2009). "Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation." Molecular Cell **36**(6): 932-941.
- Burke, C. W., C. L. Gardner, J. J. Steffan, K. D. Ryman and W. B. Klimstra (2009). "Characteristics of alpha/beta interferon induction after infection of murine fibroblasts with wild-type and mutant alphaviruses." Virology **395**(1): 121-132.
- Burnham, A. J., L. Gong and R. W. Hardy (2007). "Heterogeneous nuclear ribonuclear protein K interacts with Sindbis virus nonstructural proteins and viral subgenomic mRNA." Virology **367**(1): 212-221.
- Butsch, M., S. Hull, Y. Wang, T. M. Roberts and K. Boris-Lawrie (1999). "The 5' RNA terminus of spleen necrosis virus contains a novel posttranscriptional control element that facilitates human immunodeficiency virus Rev/RRE-independent Gag production." Journal of Virology **73**(6): 4847-4855.
- Cai, L., D. Fritz, L. Stefanovic and B. Stefanovic (2010a). "Binding of LARP6 to the conserved 5' stem-loop regulates translation of mRNAs encoding type I collagen." J Mol Biol **395**(2): 309-326.
- Cai, L., D. Fritz, L. Stefanovic and B. Stefanovic (2010b). "Nonmuscle myosin-dependent synthesis of type I collagen." J Mol Biol **401**(4): 564-578.
- Campbell, C. L., K. M. Keene, D. E. Brackney, K. E. Olson, C. D. Blair, J. Wilusz and B. D. Foy (2008). "*Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against Sindbis virus infection." BMC Microbiol **8**: 47.
- Cao-Lormeau, V. M. and D. Musso (2014). "Emerging arboviruses in the Pacific." Lancet **384**(9954): 1571-1572.

Carissimo, G., E. Pondeville, M. McFarlane, I. Dietrich, C. Mitri, E. Bischoff, C. Antoniewski, C. Bourgooin, A. B. Failloux, A. Kohl and K. D. Vernick (2015). "Antiviral immunity of *Anopheles gambiae* is highly compartmentalized, with distinct roles for RNA interference and gut microbiota." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(2): E176-185.

Castorena, K. M., K. A. Stapleford and D. J. Miller (2010). "Complementary transcriptomic, lipidomic, and targeted functional genetic analyses in cultured *Drosophila* cells highlight the role of glycerophospholipid metabolism in Flock House virus RNA replication." BMC Genomics **11**: 183.

Causey, O. R. and O. M. Maroja (1957). "Mayaro virus: a new human disease agent. III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the river Guama in Para, Brazil, and isolation of Mayaro virus as causative agent." Am J Trop Med Hyg **6**(6): 1017-1023.

Chahar, H. S., S. Chen and N. Manjunath (2013). "P-body components LSM1, GW182, DDX3, DDX6 and XRN1 are recruited to WNV replication sites and positively regulate viral replication." Virology **436**(1): 1-7.

Chamberlain, R. W. and W. D. Sudia (1955). "The effects of temperature upon the extrinsic incubation of eastern equine encephalitis in mosquitoes." Am J Hyg **62**(3): 295-305.

Chen, H. C. and S. C. Cheng (2012). "Functional roles of protein splicing factors." Biosci Rep **32**(4): 345-359.

Chen, R., E. Wang, K. A. Tsetsarkin and S. C. Weaver (2013). "Chikungunya Virus 3' Untranslated Region: Adaptation to Mosquitoes and a Population Bottleneck as Major Evolutionary Forces." PLoS Pathog **9**(8): e1003591.

Chow, A., Z. Her, E. K. Ong, J. M. Chen, F. Dimatatac, D. J. Kwek, T. Barkham, H. Yang, L. Renia, Y. S. Leo and L. F. Ng (2011). "Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor." J Infect Dis **203**(2): 149-157.

Clavarino, G., N. Cláudio, T. Couderc, A. Dalet, D. Judith, V. Camosseto, E. K. Schmidt, T. Wenger, M. Lecuit, E. Gatti and P. Pierre (2012). "Induction of GADD34 Is Necessary for dsRNA-Dependent Interferon- $\beta$  Production and Participates in the Control of Chikungunya Virus Infection." PLoS Pathogens **8**(5): 1-17.

Conway, M. J., A. M. Watson, T. M. Colpitts, S. M. Dragovic, Z. Li, P. Wang, F. Feitosa, D. T. Shepherd, K. D. Ryman, W. B. Klimstra, J. F. Anderson and E. Fikrig (2014). "Mosquito saliva serine protease enhances dissemination of dengue virus into the mammalian host." Journal of Virology **88**(1): 164-175.

Cooper, R. A. (1978). "Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells." J Supramol Struct **8**(4): 413-430.

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

- Couderc, T. and M. Lecuit (2009). "Focus on Chikungunya pathophysiology in human and animal models." Microbes Infect **11**(14-15): 1197-1205.
- Cristea, I. M., J.-W. N. Carroll, M. P. Rout, C. M. Rice, B. T. Chait and M. R. MacDonald (2006). "Tracking and Elucidating Alphavirus-Host Protein Interactions." Journal of Biological Chemistry **281**(40): 30269-30278.
- Cristea, I. M., H. Rozjabek, K. R. Molloy, S. Karki, L. L. White, C. M. Rice, M. P. Rout, B. T. Chait and M. R. MacDonald (2010). "Host Factors Associated with the Sindbis Virus RNA-Dependent RNA Polymerase: Role for G3BP1 and G3BP2 in Virus Replication." Journal of Virology **84**(13): 6720-6732.
- Crosby, L., C. Perreau, B. Madeux, J. Cossic, C. Armand, C. Herrmann-Storke, F. Najjioullah, R. Valentino and G. Thiery (2016). "Severe manifestations of chikungunya virus in critically ill patients during the 2013-2014 Caribbean outbreak." Int J Infect Dis **48**: 78-80.
- Cui, S., K. Eisenacher, A. Kirchhofer, K. Brzozka, A. Lammens, K. Lammens, T. Fujita, K. K. Conzelmann, A. Krug and K. P. Hopfner (2008). "The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I." Molecular Cell **29**(2): 169-179.
- Daelemans, D., E. Afonina, J. Nilsson, G. Werner, J. Kjems, E. De Clercq, G. N. Pavlakis and A. M. Vandamme (2002). "A synthetic HIV-1 Rev inhibitor interfering with the CRM1-mediated nuclear export." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14440-14445.
- Das, I., I. Basantray, P. Mamidi, T. K. Nayak, P. B. M, S. Chattopadhyay and S. Chattopadhyay (2014a). "Heat Shock Protein 90 Positively Regulates Chikungunya Virus Replication by Stabilizing Viral Non-Structural Protein nsP2 during Infection." PLoS ONE **9**(6): e100531.
- Das, P. K., A. Merits and A. Lulla (2014b). "Functional cross-talk between distant domains of chikungunya virus non-structural protein 2 is decisive for its RNA-modulating activity." The Journal of Biological Chemistry **289**(9): 5635-5653.
- Das, P. K., A. Merits and A. Lulla (2014c). "Functional Crosstalk between Distant Domains of Chikungunya Virus Non-Structural Protein 2 Is Decisive For Its RNA-Modulating Activity." Journal of Biological Chemistry: jbc.M113.503433.
- Das, T., M. C. Jaffar-Bandjee, J. J. Hoarau, P. Krejbich Trotot, M. Denizot, G. Lee-Pat-Yuen, R. Sahoo, P. Guiraud, D. Ramful, S. Robin, J. L. Alessandri, B. A. Gauzere and P. Gasque (2010). "Chikungunya fever: CNS infection and pathologies of a re-emerging arbovirus." Prog Neurobiol **91**(2): 121-129.
- Davis, W. G., J. B. Bowzard, S. D. Sharma, M. E. Wiens, P. Ranjan, S. Gangappa, O. Stuchlik, J. Pohl, R. O. Donis, J. M. Katz, C. E. Cameron, T. Fujita and S. Sambhara (2012). "The 3' untranslated regions of influenza genomic sequences are 5'PPP-independent ligands for RIG-I." PLoS ONE **7**(3): e32661.
- De Gregorio, E., P. T. Spellman, P. Tzou, G. M. Rubin and B. Lemaitre (2002). "The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*." EMBO J **21**(11): 2568-2579.

- de Groot, R. J., W. R. Hardy, Y. Shirako and J. H. Strauss (1990). "Cleavage-site preferences of Sindbis virus polyproteins containing the non-structural proteinase. Evidence for temporal regulation of polyprotein processing in vivo." EMBO J **9**(8): 2631-2638.
- De, I., S. G. Sawicki and D. L. Sawicki (1996). "Sindbis virus RNA-negative mutants that fail to convert from minus-strand to plus-strand synthesis: role of the nsP2 protein." Journal of Virology **70**(5): 2706-2719.
- Delisle, E., C. Rousseau, B. Broche, I. Leparc-Goffart, G. L'Ambert, A. Cochet, C. Prat, V. Foulongne, J. B. Ferre, O. Catelinois, O. Flusin, E. Tchernonog, I. E. Moussion, A. Wiegandt, A. Septfons, A. Mendy, M. B. Moyano, L. Laporte, J. Maurel, F. Jourdain, J. Reynes, M. C. Paty and F. Golliot (2015). "Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014." Euro Surveill **20**(17).
- Devarkar, S. C., C. Wang, M. T. Miller, A. Ramanathan, F. Jiang, A. G. Khan, S. S. Patel and J. Marcotrigiano (2016). "Structural basis for m7G recognition and 2'-O-methyl discrimination in capped RNAs by the innate immune receptor RIG-I." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(3): 596-601.
- Dickson, A. M., J. R. Anderson, M. D. Barnhart, K. J. Sokoloski, L. Oko, M. Opyrchal, E. Galanis, C. J. Wilusz, T. E. Morrison and J. Wilusz (2012). "Dephosphorylation of HuR protein during alphavirus infection is associated with HuR relocalization to the cytoplasm." The Journal of Biological Chemistry **287**(43): 36229-36238.
- Dudha, N., J. Rana, S. Rajasekharan, R. Gabrani, A. Gupta, V. K. Chaudhary and S. Gupta (2015). "Host-pathogen interactome analysis of Chikungunya virus envelope proteins E1 and E2." Virus Genes **50**(2): 200-209.
- Dupuis-Maguiraga, L., M. Noret, S. Brun, R. Le Grand, G. Gras 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**(3): e1446.
- Dye, B. T., D. J. Miller and P. Ahlquist (2005). "In vivo self-interaction of nodavirus RNA replicase protein a revealed by fluorescence resonance energy transfer." Journal of Virology **79**(14): 8909-8919.
- Emr, S. D. and T. J. Silhavy (1983). "Importance of secondary structure in the signal sequence for protein secretion." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(15): 4599-4603.
- Errett, J. S., M. S. Suthar, A. McMillan, M. S. Diamond and M. Gale, Jr. (2013). "The essential, nonredundant roles of RIG-I and MDA5 in detecting and controlling West Nile virus infection." Journal of Virology **87**(21): 11416-11425.
- Evans, M. J., C. M. Rice and S. P. Goff (2004). "Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(35): 13038-13043.
- Fayzulin, R. and I. Frolov (2004). "Changes of the secondary structure of the 5' end of the Sindbis virus genome inhibit virus growth in mosquito cells and lead to accumulation of adaptive mutations." Journal of Virology **78**(10): 4953-4964.

- Ferreira, B. R. and J. S. Silva (1998). "Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity." Vet Immunol Immunopathol **64**(3): 279-293.
- Fields, W. and M. Kielian (2015). "Interactions involved in pH protection of the alphavirus fusion protein." Virology **486**: 173-179.
- Firth, A. E., B. Y. Chung, M. N. Fleeton and J. F. Atkins (2008). "Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma." Virology Journal **5**: 108.
- Firth, A. E., N. M. Wills, R. F. Gesteland and J. F. Atkins (2011). "Stimulation of stop codon readthrough: frequent presence of an extended 3' RNA structural element." Nucleic Acids Research **39**(15): 6679-6691.
- Fivaz, B. H. (1989). "Immune suppression induced by the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901." J Parasitol **75**(6): 946-952.
- Fongsaran, C., K. Jirakanwisal, A. Kuadkitkan, N. Wikan, P. Wintachai, C. Thepparit, S. Ubol, N. Phaonakrop, S. Roytrakul and D. R. Smith (2014). "Involvement of ATP synthase beta subunit in chikungunya virus entry into insect cells." Archives of Virology **159**(12): 3353-3364.
- Fornerod, M., J. van Deursen, S. van Baal, A. Reynolds, D. Davis, K. G. Murti, J. Fransen and G. Grosveld (1997). "The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88." EMBO J **16**(4): 807-816.
- Foy, B. D., K. C. Kobylinski, J. L. Chilson Foy, B. J. Blitvich, A. Travassos da Rosa, A. D. Haddow, R. S. Lanciotti and R. B. Tesh (2011). "Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA." Emerg Infect Dis **17**(5): 880-882.
- Fredericksen, B. L., B. C. Keller, J. Fornek, M. G. Katze and M. Gale, Jr. (2008). "Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1." Journal of Virology **82**(2): 609-616.
- Friendewey, D. and W. Keller (1985). "Stepwise assembly of a pre-mRNA splicing complex requires U-snRNPs and specific intron sequences." Cell **42**(1): 355-367.
- Friedman, R. M., J. G. Levin, P. M. Grimley and I. K. Berezsky (1972). "Membrane-associated replication complex in arbovirus infection." Journal of Virology **10**(3): 504-515.
- Frolov, I., R. Hardy and C. M. Rice (2001). "Cis-acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis." RNA **7**(11): 1638-1651.
- Frolov, I. and S. Schlesinger (1996). "Translation of Sindbis virus mRNA: analysis of sequences downstream of the initiating AUG codon that enhance translation." Journal of Virology **70**(2): 1182-1190.
- Frolova, E., R. Gorchakov, N. Garmashova, S. Atasheva, L. A. Vergara and I. Frolov (2006). "Formation of nsP3-Specific Protein Complexes during Sindbis Virus Replication." Journal of Virology **80**(8): 4122-4134.

- Frolova, E. I., R. Z. Fayzulin, S. H. Cook, D. E. Griffin, C. M. Rice and I. Frolov (2002). "Roles of nonstructural protein nsP2 and Alpha/Beta interferons in determining the outcome of Sindbis virus infection." J Virol **76**(22): 11254-11264.
- Frolova, E. I., R. Gorchakov, L. Pereboeva, S. Atasheva and I. Frolov (2010). "Functional Sindbis Virus Replicative Complexes Are Formed at the Plasma Membrane." Journal of Virology **84**(22): 11679-11695.
- Fros, J. J., N. E. Domeradzka, J. Baggen, C. Geertsema, J. Flipse, J. M. Vlak and G. P. Pijlman (2012). "Chikungunya virus nsP3 blocks stress granule assembly by recruitment of G3BP into cytoplasmic foci." J Virol **86**(19): 10873-10879.
- Fros, J. J., W. J. Liu, N. A. Prow, C. Geertsema, M. Ligtenberg, D. L. Vanlandingham, E. Schnettler, J. M. Vlak, A. Suhrbier, A. A. Khromykh and G. P. Pijlman (2010). "Chikungunya Virus Nonstructural Protein 2 Inhibits Type I/II Interferon-Stimulated JAK-STAT Signaling." Journal of Virology **84**(20): 10877-10887.
- Fros, J. J., E. v. d. Maten, J. M. Vlak and G. P. Pijlman (2013a). "The C-Terminal Domain of Chikungunya Virus nsP2 Independently Governs Viral RNA Replication, Cytopathicity, and Inhibition of Interferon Signaling." Journal of Virology **87**(18): 10394-10400.
- Fros, J. J., E. van der Maten, J. M. Vlak and G. P. Pijlman (2013b). "The C-terminal domain of chikungunya virus nsP2 independently governs viral RNA replication, cytopathicity, and inhibition of interferon signaling." Journal of Virology **87**(18): 10394-10400.
- Froshauer, S., J. Kartenbeck and A. Helenius (1988). "Alphavirus RNA replicase is located on the cytoplasmic surface of endosomes and lysosomes (English)." The Journal of Cell Biology **Vol. 107**(Issue 6): p2075-2086.
- Fujii, R., M. Okamoto, S. Aratani, T. Oishi, T. Ohshima, K. Taira, M. Baba, A. Fukamizu and T. Nakajima (2001). "A Role of RNA Helicase A in cis-Acting Transactivation Response Element-mediated Transcriptional Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1." Journal of Biological Chemistry **276**(8): 5445-5451.
- Fujita, H., T. Ohshima, T. Oishi, S. Aratani, R. Fujii, A. Fukamizu and T. Nakajima (2005). "Relevance of nuclear localization and functions of RNA helicase A." Int J Mol Med **15**(4): 555-560.
- Fullam, A. and M. Schröder (2013). "DEXD/H-box RNA helicases as mediators of anti-viral innate immunity and essential host factors for viral replication." SI: The Biology of RNA helicases - Modulation for life **1829**(8): 854-865.
- Fuller, S. D. (1987). "The T=4 envelope of Sindbis virus is organized by interactions with a complementary T=3 capsid." Cell **48**(6): 923-934.
- Gaedigk-Nitschko, K., M. X. Ding, M. A. Levy and M. J. Schlesinger (1990). "Site-directed mutations in the Sindbis virus 6K protein reveal sites for fatty acylation and the underacylated protein affects virus release and virion structure." Virology **175**(1): 282-291.
- Gardner, J., I. Anraku, T. T. Le, T. Larcher, L. Major, P. Roques, W. A. Schroder, S. Higgs and A. Suhrbier (2010). "Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice." Journal of Virology **84**(16): 8021-8032.

- Garmashova, N., S. Atasheva, W. Kang, S. C. Weaver, E. Frolova and I. Frolov (2007). "Analysis of Venezuelan equine encephalitis virus capsid protein function in the inhibition of cellular transcription." Journal of Virology **81**(24): 13552-13565.
- Garmashova, N., R. Gorchakov, E. Frolova and I. Frolov (2006). "Sindbis Virus Nonstructural Protein nsP2 Is Cytotoxic and Inhibits Cellular Transcription." Journal of Virology **80**(12): 5686-5696.
- Garneau, N. L., K. J. Sokoloski, M. Opyrchal, C. P. Neff, C. J. Wilusz and J. Wilusz (2008). "The 3' untranslated region of sindbis virus represses deadenylation of viral transcripts in mosquito and Mammalian cells." Journal of Virology **82**(2): 880-892.
- Garoff, H., D. Huylebroeck, A. Robinson, U. Tillman and P. Liljestrom (1990). "The signal sequence of the p62 protein of Semliki Forest virus is involved in initiation but not in completing chain translocation." Journal of Cell Biology **111**(3): 867-876.
- Gasque, P., T. Couderc, M. Lecuit, P. Roques and L. F. Ng (2015). "Chikungunya virus pathogenesis and immunity." Vector Borne Zoonotic Dis **15**(4): 241-249.
- Gay, B., E. Bernard, M. Salignat, N. Chazal, C. Devaux and L. Briant (2012). "pH-dependent entry of chikungunya virus into *Aedes albopictus* cells." Infect Genet Evol **12**(6): 1275-1281.
- Geissler, R., R. P. Golbik and S. E. Behrens (2012). "The DEAD-box helicase DDX3 supports the assembly of functional 80S ribosomes." Nucleic Acids Research **40**(11): 4998-5011.
- George, J. and R. Raju (2000). "Alphavirus RNA genome repair and evolution: molecular characterization of infectious sindbis virus isolates lacking a known conserved motif at the 3' end of the genome." Journal of Virology **74**(20): 9776-9785.
- Gillespie, L. K., A. Hoenen, G. Morgan and J. M. Mackenzie (2010). "The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex." Journal of Virology **84**(20): 10438-10447.
- Gillian, A. L. and J. Svaren (2004). "The Ddx20/DP103 dead box protein represses transcriptional activation by Egr2/Krox-20." The Journal of Biological Chemistry **279**(10): 9056-9063.
- Gingras, A. C., B. Raught and N. Sonenberg (1999). "eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation." Annu Rev Biochem **68**: 913-963.
- Girard, Y. A., V. Popov, J. Wen, V. Han and S. Higgs (2005). "Ultrastructural study of West Nile virus pathogenesis in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)." J Med Entomol **42**(3): 429-444.
- Gitlin, L., W. Barchet, S. Gilfillan, M. Cella, B. Beutler, R. A. Flavell, M. S. Diamond and M. Colonna (2006). "Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(22): 8459-8464.

- Glanville, N. and I. Ulmanen (1976). "Biological activity of in vitro synthesised protein: binding of Semliki Forest virus capsid protein to the large ribosomal subunit." Biochem Biophys Res Commun **71**(1): 393-399.
- Goffinet, C., S. Schmidt, C. Kern, L. Oberbremer and O. T. Keppler (2010). "Endogenous CD317/Tetherin limits replication of HIV-1 and murine leukemia virus in rodent cells and is resistant to antagonists from primate viruses." Journal of Virology **84**(21): 11374-11384.
- Goh, P. Y., Y. J. Tan, S. P. Lim, Y. H. Tan, S. G. Lim, F. Fuller-Pace and W. Hong (2004). "Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication." Journal of Virology **78**(10): 5288-5298.
- Gold, M. O., X. Yang, C. H. Herrmann and A. P. Rice (1998). "PITALRE, the catalytic subunit of TAK, is required for human immunodeficiency virus Tat transactivation in vivo." Journal of Virology **72**(5): 4448-4453.
- Gomatos, P. J., L. Kaariainen, S. Keranen, M. Ranki and D. L. Sawicki (1980). "Semliki Forest virus replication complex capable of synthesizing 42S and 26S nascent RNA chains." Journal of General Virology **49**(1): 61-69.
- Gonzalez-Almela, E., M. A. Sanz, M. Garcia-Moreno, P. Northcote, J. Pelletier and L. Carrasco (2015). "Differential action of pateamine A on translation of genomic and subgenomic mRNAs from Sindbis virus." Virology **484**: 41-50.
- Gonzalez, M. E. and L. Carrasco (2001). "Human immunodeficiency virus type 1 VPU protein affects Sindbis virus glycoprotein processing and enhances membrane permeabilization." Virology **279**(1): 201-209.
- Gorchakov, R., E. Frolova, B. R. Williams, C. M. Rice and I. Frolov (2004). "PKR-dependent and -independent mechanisms are involved in translational shutoff during Sindbis virus infection." Journal of Virology **78**(16): 8455-8467.
- Goubau, D., S. Deddouche and C. Reis e Sousa (2013). "Cytosolic sensing of viruses." Immunity **38**(5): 855-869.
- Goubau, D., M. Schlee, S. Deddouche, A. J. Pruijssers, T. Zillinger, M. Goldeck, C. Schuberth, A. G. Van der Veen, T. Fujimura, J. Rehwinkel, J. A. Iskarpatyoti, W. Barchet, J. Ludwig, T. S. Dermody, G. Hartmann and C. Reis e Sousa (2014). "Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates." Nature **514**(7522): 372-375.
- Grabowski, P. J., S. R. Seiler and P. A. Sharp (1985). "A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors." Cell **42**(1): 345-353.
- Grandadam, M., V. Caro, S. Plumet, J. M. Thiberge, Y. Souares, A. B. Failloux, H. J. Tolou, M. Budelot, D. Cosserat, I. Leparac-Goffart and P. Despres (2011). "Chikungunya virus, southeastern France." Emerg Infect Dis **17**(5): 910-913.
- Gratz, N. G. (2004). "Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*." Med Vet Entomol **18**(3): 215-227.

- Grief, C., R. Galler, L. M. Cortes and O. M. Barth (1997). "Intracellular localisation of dengue-2 RNA in mosquito cell culture using electron microscopic in situ hybridisation." Archives of Virology **142**(12): 2347-2357.
- Griffin, G. E., K. Leung, T. M. Folks, S. Kunkel and G. J. Nabel (1989). "Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF-kappa B." Nature **339**(6219): 70-73.
- Grimley, P. M., I. K. Berezsky and R. M. Friedman (1968). "Cytoplasmic structures associated with an arbovirus infection: loci of viral ribonucleic acid synthesis." Journal of Virology **2**(11): 1326-1338.
- Gruter, P., C. Taberero, C. von Kobbe, C. Schmitt, C. Saavedra, A. Bachi, M. Wilm, B. K. Felber and E. Izaurralde (1998). "TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus." Molecular Cell **1**(5): 649-659.
- Gu, L., A. Fullam, R. Brennan and M. Schroder (2013). "Human DEAD box helicase 3 couples IkappaB kinase epsilon to interferon regulatory factor 3 activation." Mol Cell Biol **33**(10): 2004-2015.
- Gui, H., C. W. Lu, S. Adams, V. Stollar and M. L. Li (2010). "hnRNP A1 interacts with the genomic and subgenomic RNA promoters of Sindbis virus and is required for the synthesis of G and SG RNA." J Biomed Sci **17**: 59.
- Halaby, M. J., Y. Li, B. R. Harris, S. Jiang, W. K. Miskimins, M. P. Cleary and D. Q. Yang (2015). "Translational Control Protein 80 Stimulates IRES-Mediated Translation of p53 mRNA in Response to DNA Damage." Biomed Res Int **2015**: 708158.
- Halstead, S. B., J. E. Scanlon, P. Umpaivit and S. Udomsakdi (1969). "Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. IV. Epidemiologic studies in the Bangkok metropolitan area." Am J Trop Med Hyg **18**(6): 997-1021.
- Hamel, R., O. Dejarnac, S. Wichit, P. Ekchariyawat, A. Neyret, N. Luplertlop, M. Perera-Lecoin, P. Surasombatpattana, L. Talignani, F. Thomas, V. M. Cao-Lormeau, V. Choumet, L. Briant, P. Despres, A. Amara, H. Yssel and D. Misse (2015). "Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells." Journal of Virology **89**(17): 8880-8896.
- Han, W., X. Li and X. Fu (2011). "The macro domain protein family: structure, functions, and their potential therapeutic implications." Mutat Res **727**(3): 86-103.
- Hanson, R. P. (1957). "An epizootic of equine encephalomyelitis that occurred in Massachusetts in 1831." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **6**(5): 858-862.
- Hardy, R. W. (2006a). "The role of the 3' terminus of the Sindbis virus genome in minus-strand initiation site selection." Virology **345**(2): 520-531.
- Hardy, R. W. (2006b). "The role of the 3' terminus of the Sindbis virus genome in minus-strand initiation site selection." Virology **345**(2): 520-531.
- Hardy, R. W. and C. M. Rice (2005). "Requirements at the 3' end of the sindbis virus genome for efficient synthesis of minus-strand RNA." Journal of Virology **79**(8): 4630-4639.

- Hardy, W. R. and J. H. Strauss (1989). "Processing the nonstructural polyproteins of sindbis virus: nonstructural proteinase is in the C-terminal half of nsP2 and functions both in cis and in trans." Journal of Virology **63**(11): 4653-4664.
- Harrison, S. C. (2008). "Viral membrane fusion." Nature Structural & Molecular Biology **15**(7): 690-698.
- Hartman, T. R., S. Qian, C. Bolinger, S. Fernandez, D. R. Schoenberg and K. Boris-Lawrie (2006). "RNA helicase A is necessary for translation of selected messenger RNAs." Nature Structural & Molecular Biology **13**(6): 509-516.
- Hasson, T. (2003). "Myosin VI: two distinct roles in endocytosis." Journal of Cell Science **116**(Pt 17): 3453-3461.
- Hawman, D. W., K. A. Stoermer, S. A. Montgomery, P. Pal, L. Oko, M. S. Diamond and T. E. Morrison (2013). "Chronic joint disease caused by persistent Chikungunya virus infection is controlled by the adaptive immune response." J Virol **87**(24): 13878-13888.
- He, Q. S., H. Tang, J. Zhang, K. Truong, F. Wong-Staal and D. Zhou (2008). "Comparisons of RNAi approaches for validation of human RNA helicase A as an essential factor in hepatitis C virus replication." Journal of virological methods **154**(1-2): 216-219.
- Heaton, N. S., R. Perera, K. L. Berger, S. Khadka, D. J. Lacount, R. J. Kuhn and G. Randall (2010). "Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(40): 17345-17350.
- Helenius, A., J. Kartenbeck, K. Simons and E. Fries (1980). "On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells." The Journal of Cell Biology **84**(2): 404-420.
- Henras, A. K., C. Plisson-Chastang, M. F. O'Donohue, A. Chakraborty and P. E. Gleizes (2015). "An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes." Wiley Interdiscip Rev RNA **6**(2): 225-242.
- Her, Z., T.-S. Teng, J. J. L. Tan, T.-H. Teo, Y.-W. Kam, F.-M. Lum, W. W. L. Lee, C. Gabriel, R. Melchioti, A. K. Andiappan, V. Lulla, A. Lulla, M. K. Win, A. Chow, S. K. Biswas, Y.-S. Leo, M. Lecuit, A. Merits, L. Rénia and L. F. P. Ng (2014). "Loss of TLR3 aggravates CHIKV replication and pathology due to an altered virus-specific neutralizing antibody response." EMBO Molecular Medicine: e201404459.
- Herrmann, C. H. and A. P. Rice (1995). "Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor." J Virol **69**(3): 1612-1620.
- Hilbert, M., F. Kebbel, A. Gubaev and D. Klostermeier (2011). "eIF4G stimulates the activity of the DEAD box protein eIF4A by a conformational guidance mechanism." Nucleic Acids Research **39**(6): 2260-2270.
- Hilliker, A., Z. Gao, E. Jankowsky and R. Parker (2011). "The DEAD-box protein Ded1 modulates translation by the formation and resolution of an eIF4F-mRNA complex." Molecular Cell **43**(6): 962-972.

Hoarau, J. J., M. C. Jaffar Bandjee, P. Krejbich Trotot, T. Das, G. Li-Pat-Yuen, B. Dassa, M. Denizot, E. Guichard, A. Ribera, T. Henni, F. Tallet, M. P. Moiton, B. A. Gauzere, S. Bruniquet, Z. Jaffar Bandjee, P. Morbidelli, G. Martigny, M. Jolivet, F. Gay, M. Grandadam, H. Tolou, V. Vieillard, P. Debre, B. Autran and P. Gasque (2010). "Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response." Journal of Immunology **184**(10): 5914-5927.

Hodge, C. A., E. J. Tran, K. N. Noble, A. R. Alcazar-Roman, R. Ben-Yishay, J. J. Scarcelli, A. W. Folkmann, Y. Shav-Tal, S. R. Wentz and C. N. Cole (2011). "The Dbp5 cycle at the nuclear pore complex during mRNA export I: dbp5 mutants with defects in RNA binding and ATP hydrolysis define key steps for Nup159 and Gle1." Genes Dev **25**(10): 1052-1064.

Honig, A., D. Auboeuf, M. M. Parker, B. W. O'Malley and S. M. Berget (2002). "Regulation of alternative splicing by the ATP-dependent DEAD-box RNA helicase p72." Mol Cell Biol **22**(16): 5698-5707.

Honorio, N. A., C. Silva Wda, P. J. Leite, J. M. Goncalves, L. P. Lounibos and R. Lourenco-de-Oliveira (2003). "Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz **98**(2): 191-198.

Hoorweg, T. E., M. K. van Duijl-Richter, N. V. Ayala Nunez, I. C. Albuлесcu, M. J. van Hemert and J. M. Smit (2016). "Dynamics of Chikungunya Virus Cell Entry Unraveled by Single-Virus Tracking in Living Cells." Journal of Virology **90**(9): 4745-4756.

Hornung, V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzozka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K. K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres and G. Hartmann (2006). "5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I." Science (New York, N.Y.) **314**(5801): 994-997.

Hung, Y. F., M. Schwarten, S. Schunke, P. Thiagarajan-Rosenkranz, S. Hoffmann, E. H. Sklan, D. Willbold and B. W. Koenig (2015). "Dengue virus NS4A cytoplasmic domain binding to liposomes is sensitive to membrane curvature." Biochim Biophys Acta **1848**(5): 1119-1126.

Huo, L., Y. N. Wang, W. Xia, S. C. Hsu, C. C. Lai, L. Y. Li, W. C. Chang, Y. Wang, M. C. Hsu, Y. L. Yu, T. H. Huang, Q. Ding, C. H. Chen, C. H. Tsai and M. C. Hung (2010). "RNA helicase A is a DNA-binding partner for EGFR-mediated transcriptional activation in the nucleus." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(37): 16125-16130.

Hutten, S. and R. H. Kehlenbach (2007). "CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond." Trends Cell Biol **17**(4): 193-201.

Huys, A., P. A. Thibault and J. A. Wilson (2013). "Modulation of hepatitis C virus RNA accumulation and translation by DDX6 and miR-122 are mediated by separate mechanisms." PLoS ONE **8**(6): e67437.

Hyde, J. L., R. Chen, D. W. Trobaugh, M. S. Diamond, S. C. Weaver, W. B. Klimstra and J. Wilusz (2015). "The 5' and 3' ends of alphavirus RNAs – Non-coding is not non-functional." Virus Research.

Hyde, J. L., C. L. Gardner, T. Kimura, J. P. White, G. Liu, D. W. Trobaugh, C. Huang, M. Tonelli, S. Paessler, K. Takeda, W. B. Klimstra, G. K. Amarasinghe and M. S. Diamond

(2014). "A viral RNA structural element alters host recognition of nonself RNA." Science (New York, N.Y.) **343**(6172): 783-787.

Ibanez-Bernal, S. and C. Martinez-Campos (1994). "Aedes albopictus in Mexico." J Am Mosq Control Assoc **10**(2 Pt 1): 231-232.

Ishikawa, H. and G. N. Barber (2008). "STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling." Nature **455**(7213): 674-678.

Iwawaki, T., R. Akai and K. Kohno (2010). "IRE1alpha disruption causes histological abnormality of exocrine tissues, increase of blood glucose level, and decrease of serum immunoglobulin level." PLoS ONE **5**(9): e13052.

Iyer, R. S., S. M. Nicol, P. R. Quinlan, A. M. Thompson, D. W. Meek and F. V. Fuller-Pace (2014). "The RNA helicase/transcriptional co-regulator, p68 (DDX5), stimulates expression of oncogenic protein kinase, Polo-like kinase-1 (PLK1), and is associated with elevated PLK1 levels in human breast cancers." Cell Cycle **13**(9): 1413-1423.

Jacks, T., H. D. Madhani, F. R. Masiarz and H. E. Varmus (1988). "Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region." Cell **55**(3): 447-458.

Jacks, T. and H. E. Varmus (1985). "Expression of the Rous sarcoma virus pol gene by ribosomal frameshifting." Science (New York, N.Y.) **230**(4731): 1237-1242.

Jaffar-Bandjee, M. C., T. Das, J. J. Hoarau, P. Krejbich Trotot, M. Denizot, A. Ribera, P. Roques and P. Gasque (2009). "Chikungunya virus takes centre stage in virally induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis." Microbes Infect **11**(14-15): 1206-1218.

Jain, S., J. R. Wheeler, R. W. Walters, A. Agrawal, A. Barsic and R. Parker (2016). "ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure." Cell **164**(3): 487-498.

Jangra, R. K., M. Yi and S. M. Lemon (2010). "DDX6 (Rck/p54) is required for efficient hepatitis C virus replication but not for internal ribosome entry site-directed translation." Journal of Virology **84**(13): 6810-6824.

Jensen, S. and A. R. Thomsen (2012). "Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion." Journal of Virology **86**(6): 2900-2910.

Jin, J., W. Jing, X. X. Lei, C. Feng, S. Peng, K. Boris-Lawrie and Y. Huang (2011). "Evidence that Lin28 stimulates translation by recruiting RNA helicase A to polysomes." Nucleic Acids Research **39**(9): 3724-3734.

Jones, P. H., M. Maric, M. N. Madison, W. Maury, R. J. Roller and C. M. Okeoma (2013). "BST-2/tetherin-mediated restriction of chikungunya (CHIKV) VLP budding is counteracted by CHIKV non-structural protein 1 (nsP1)." Virology **438**(1): 37-49.

Joubert, P.-E., K. Stapleford, F. Guivel-Benhassine, M. Vignuzzi, O. Schwartz and M. L. Albert (2015). "Inhibition of mTORC1 Enhances the Translation of Chikungunya Proteins via the Activation of the MnK/eIF4E Pathway." PLoS Pathog **11**(8): e1005091.

Judith, D., S. Mostowy, M. Bourai, N. Gangneux, M. Lelek, M. Lucas-Hourani, N. Cayet, Y. Jacob, M. C. Prevost, P. Pierre, F. Tangy, C. Zimmer, P. O. Vidalain, T. Couderc and M. Lecuit (2013). "Species-specific impact of the autophagy machinery on Chikungunya virus infection." EMBO Rep **14**(6): 534-544.

Kaariainen, L. and T. Ahola (2002). "Functions of alphavirus nonstructural proteins in RNA replication." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **71**: 187-222.

Kaletsky, R. L., J. R. Francica, C. Agrawal-Gamse and P. Bates (2009). "Tetherin-mediated restriction of filovirus budding is antagonized by the Ebola glycoprotein." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(8): 2886-2891.

Kallio, K., K. Hellström, G. Balistreri, P. Spuul, E. Jokitalo and T. Ahola (2013). "Template RNA Length Determines the Size of Replication Complex Spherules for Semliki Forest Virus." Journal of Virology **87**(16): 9125-9134.

Kallio, K., K. Hellstrom, E. Jokitalo and T. Ahola (2016). "RNA Replication and Membrane Modification Require the Same Functions of Alphavirus Nonstructural Proteins." Journal of Virology **90**(3): 1687-1692.

Kamer, G. and P. Argos (1984). "Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses." Nucleic Acids Research **12**(18): 7269-7282.

Kapikian, A. Z. and R. E. Shope (1996). Rotaviruses, Reoviruses, Coltiviruses, and Orbiviruses. Medical Microbiology. S. Baron. Galveston (TX).

Kar, A., K. Fushimi, X. Zhou, P. Ray, C. Shi, X. Chen, Z. Liu, S. Chen and J. Y. Wu (2011). "RNA helicase p68 (DDX5) regulates tau exon 10 splicing by modulating a stem-loop structure at the 5' splice site." Mol Cell Biol **31**(9): 1812-1821.

Karlas, A., S. Berre, T. Couderc, M. Varjak, P. Braun, M. Meyer, N. Gangneux, L. Karo-Astover, F. Weege, M. Raftery, G. Schonrich, U. Klemm, A. Wurzlbauer, F. Bracher, A. Merits, T. F. Meyer and M. Lecuit (2016). "A human genome-wide loss-of-function screen identifies effective chikungunya antiviral drugs." Nat Commun **7**: 11320.

Karo-Astover, L., O. Sarova, A. Merits and E. Zusinaite (2010). "The infection of mammalian and insect cells with SFV bearing nsP1 palmitoylation mutations." Virus Res **153**(2): 277-287.

Karpe, Y. A., P. P. Aher and K. S. Lole (2011). "NTPase and 5'-RNA Triphosphatase Activities of Chikungunya Virus nsP2 Protein." PLoS ONE **6**(7): 1-8.

Karpe, Y. A., K. D. Pingale and G. D. Kanade (2016). "Activities of proteasome and m-calpain are essential for Chikungunya virus replication." Virus Genes.

Kast, D. J., C. Yang, A. Disanza, M. Boczkowska, Y. Madasu, G. Scita, T. Svitkina and R. Dominguez (2014). "Mechanism of IRSp53 inhibition and combinatorial activation by Cdc42 and downstream effectors." Nature Structural & Molecular Biology **21**(4): 413-422.

Kato, H., O. Takeuchi, E. Mikamo-Satoh, R. Hirai, T. Kawai, K. Matsushita, A. Hiiragi, T. S. Dermody, T. Fujita and S. Akira (2008). "Length-dependent recognition of double-stranded

ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5." The Journal of Experimental Medicine **205**(7): 1601-1610.

Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. S. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita and S. Akira (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." Nature **441**(7089): 101-105.

Kedersha, N. and P. Anderson (2002). "Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability." Biochem Soc Trans **30**(Pt 6): 963-969.

Kedersha, N., M. R. Cho, W. Li, P. W. Yacono, S. Chen, N. Gilks, D. E. Golan and P. Anderson (2000). "Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules." The Journal of Cell Biology **151**(6): 1257-1268.

Kedersha, N. L., M. Gupta, W. Li, I. Miller and P. Anderson (1999). "RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules." The Journal of Cell Biology **147**(7): 1431-1442.

Keene, K. M., B. D. Foy, I. Sanchez-Vargas, B. J. Beaty, C. D. Blair and K. E. Olson (2004). "RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17240-17245.

Kelvin, A. A., D. Banner, G. Silvi, M. L. Moro, N. Spataro, P. Gaibani, F. Cavrini, A. Pierro, G. Rossini, M. J. Cameron, J. F. Bermejo-Martin, S. G. Paquette, L. Xu, A. Danesh, A. Farooqui, I. Borghetto, D. J. Kelvin, V. Sambri and S. Rubino (2011). "Inflammatory Cytokine Expression Is Associated with Chikungunya Virus Resolution and Symptom Severity." PLoS Negl Trop Dis **5**(8): e1279.

Khan, M. A. and D. J. Goss (2004). "Phosphorylation states of translational initiation factors affect mRNA cap binding in wheat." Biochemistry **43**(28): 9092-9097.

Kieft, J. S., K. Zhou, R. Jubin and J. A. Doudna (2001). "Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA." RNA **7**(2): 194-206.

Kielian, M. (2014). "Mechanisms of Virus Membrane Fusion Proteins." Annu Rev Virol **1**(1): 171-189.

Kielian, M., C. Chanel-Vos and M. Liao (2010). "Alphavirus Entry and Membrane Fusion." Viruses **2**(4): 796-825.

Kim, D. Y., A. E. Firth, S. Atasheva, E. I. Frolova and I. Frolov (2011a). "Conservation of a packaging signal and the viral genome RNA packaging mechanism in alphavirus evolution." Journal of Virology **85**(16): 8022-8036.

Kim, J. H., S. M. Park, J. H. Park, S. J. Keum and S. K. Jang (2011b). "eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions." EMBO J **30**(12): 2454-2464.

Kim, S. Y., R. Byrn, J. Groopman and D. Baltimore (1989). "Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression." Journal of Virology **63**(9): 3708-3713.

- Kim, T., S. Pazhoor, M. Bao, Z. Zhang, S. Hanabuchi, V. Facchinetti, L. Bover, J. Plumas, L. Chaperot, J. Qin and Y.-J. Liu (2010). "Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human plasmacytoid dendritic cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(34): 15181-15186.
- Kimball, S. R., R. L. Horetsky, D. Ron, L. S. Jefferson and H. P. Harding (2003). "Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes." Am J Physiol Cell Physiol **284**(2): C273-284.
- Klimstra, W. B., E. M. Nangle, M. S. Smith, A. D. Yurochko and K. D. Ryman (2003). "DC-SIGN and L-SIGN can act as attachment receptors for alphaviruses and distinguish between mosquito cell- and mammalian cell-derived viruses." Journal of Virology **77**(22): 12022-12032.
- Knipe, D. M. and P. M. Howley (2007). Fields Virology, Fifth Edition. Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Knoops, K., M. Kikkert, S. H. Worm, J. C. Zevenhoven-Dobbe, Y. van der Meer, A. J. Koster, A. M. Mommaas and E. J. Snijder (2008). "SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum." PLoS Biol **6**(9): e226.
- Kolakofsky, D. (1976). "Isolation and characterization of Sendai virus DI-RNAs." Cell **8**(4): 547-555.
- Koonin, E. V. (1991). "The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses." Journal of General Virology **72** ( Pt 9): 2197-2206.
- Koonin, E. V. (1993). "A common set of conserved motifs in a vast variety of putative nucleic acid-dependent ATPases including MCM proteins involved in the initiation of eukaryotic DNA replication." Nucleic Acids Research **21**(11): 2541-2547.
- Kopecky, J. and M. Kuthejlova (1998). "Suppressive effect of Ixodes ricinus salivary gland extract on mechanisms of natural immunity in vitro." Parasite Immunol **20**(4): 169-174.
- Kopek, B. G., G. Perkins, D. J. Miller, M. H. Ellisman and P. Ahlquist (2007). "Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle." PLoS Biol **5**(9): e220.
- Kopek, B. G., E. W. Settles, P. D. Friesen and P. Ahlquist (2010). "Nodavirus-induced membrane rearrangement in replication complex assembly requires replicase protein a, RNA templates, and polymerase activity." Journal of Virology **84**(24): 12492-12503.
- Kozak, M. (1981). "Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes." Nucleic Acids Research **9**(20): 5233-5252.
- Kraljacic, B. C., M. Arguello, A. Amri, G. Cormack and K. Borden (2011). "Inhibition of eIF4E with ribavirin cooperates with common chemotherapies in primary acute myeloid leukemia specimens." Leukemia **25**(7): 1197-1200.
- Kropelin, S., D. Verschuren, A. M. Lezine, H. Eggermont, C. Cocquyt, P. Francus, J. P. Cazet, M. Fagot, B. Rumes, J. M. Russell, F. Darius, D. J. Conley, M. Schuster, H. von

- Suchodoletz and D. R. Engstrom (2008). "Climate-driven ecosystem succession in the Sahara: the past 6000 years." Science (New York, N.Y.) **320**(5877): 765-768.
- Krugmann, S., I. Jordens, K. Gevaert, M. Driessens, J. Vandekerckhove and A. Hall (2001). "Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex." Curr Biol **11**(21): 1645-1655.
- Kubes, M., N. Fuchsberger, M. Labuda, E. Zuffova and P. A. Nuttall (1994). "Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity in vitro." Immunology **82**(1): 113-116.
- Kuge, O., Y. Akamatsu and M. Nishijima (1989). "Abortive infection with Sindbis virus of a Chinese hamster ovary cell mutant defective in phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine biosynthesis." Biochim Biophys Acta **986**(1): 61-69.
- Kujala, P., A. Ikäheimonen, N. Ehsani, H. Vihinen, P. Auvinen and L. Kaariainen (2001). "Biogenesis of the Semliki Forest Virus RNA Replication Complex." Journal of Virology **75**(8): 3873-3884.
- Kumar, H., T. Kawai and S. Akira (2011). "Pathogen recognition by the innate immune system." Int Rev Immunol **30**(1): 16-34.
- Kumar, P., T. R. Sweeney, M. A. Skabkin, O. V. Skabkina, C. U. Hellen and T. V. Pestova (2014). "Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1- and 5'ppp- mRNAs." Nucleic Acids Research **42**(5): 3228-3245.
- Kummerer, B. M., K. Grywna, S. Glasker, J. Wieseler and C. Drosten (2012). "Construction of an infectious Chikungunya virus cDNA clone and stable insertion of mCherry reporter genes at two different sites." Journal of General Virology **93**(Pt 9): 1991-1995.
- Laakkonen, P., T. Ahola and L. Kaariainen (1996). "The effects of palmitoylation on membrane association of Semliki forest virus RNA capping enzyme." The Journal of Biological Chemistry **271**(45): 28567-28571.
- Laakkonen, P., P. Auvinen, P. Kujala and L. Kaariainen (1998a). "Alphavirus replicase protein NSP1 induces filopodia and rearrangement of actin filaments." Journal of Virology **72**(12): 10265-10269.
- Laakkonen, P., P. Auvinen, P. Kujala and L. Kaariainen (1998b). "Alphavirus Replicase Protein NSP1 Induces Filopodia and Rearrangement of Actin Filaments." Journal of Virology **72**(12): 10265-10269.
- Laakkonen, P., M. Hyvonen, J. Peranen and L. Kaariainen (1994). "Expression of Semliki Forest virus nsP1-specific methyltransferase in insect cells and in *Escherichia coli*." Journal of Virology **68**(11): 7418-7425.
- Labadie, K., T. Larcher, C. Joubert, A. Mannioui, B. Delache, P. Brochard, L. Guigand, L. Dubreil, P. Lebon, B. Verrier, X. de Lamballerie, A. Suhrbier, Y. Cherel, R. Le Grand and P. Roques (2010). "Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages." Journal of Clinical Investigation **120**(3): 894-906.

- Lampio, A., I. Kilpelainen, S. Pesonen, K. Karhi, P. Auvinen, P. Somerharju and L. Kaariainen (2000). "Membrane binding mechanism of an RNA virus-capping enzyme." The Journal of Biological Chemistry **275**(48): 37853-37859.
- Lanciotti, R. S. and A. M. Valadere (2014). "Transcontinental movement of Asian genotype chikungunya virus." Emerg Infect Dis **20**(8): 1400-1402.
- Lanman, J., J. Crum, T. J. Deerinck, G. M. Gaietta, A. Schneemann, G. E. Sosinsky, M. H. Ellisman and J. E. Johnson (2008). "Visualizing flock house virus infection in Drosophila cells with correlated fluorescence and electron microscopy." J Struct Biol **161**(3): 439-446.
- Lawrence, P. and E. Rieder (2009). "Identification of RNA helicase A as a new host factor in the replication cycle of foot-and-mouth disease virus." Journal of Virology **83**(21): 11356-11366.
- Le Coupanec, A., D. Babin, L. Fiette, G. Jouvion, P. Ave, D. Misse, M. Bouloy and V. Choumet (2013). "Aedes mosquito saliva modulates Rift Valley fever virus pathogenicity." PLoS Negl Trop Dis **7**(6): e2237.
- Lee, C. G. (2002). "RH70, a bidirectional RNA helicase, co-purifies with U1snRNP." The Journal of Biological Chemistry **277**(42): 39679-39683.
- Lee, C. M., X. Xie, J. Zou, S. H. Li, M. Y. Lee, H. Dong, C. F. Qin, C. Kang and P. Y. Shi (2015). "Determinants of Dengue Virus NS4A Protein Oligomerization." Journal of Virology **89**(12): 6171-6183.
- Lee, C. S., A. P. Dias, M. Jedrychowski, A. H. Patel, J. L. Hsu and R. Reed (2008). "Human DDX3 functions in translation and interacts with the translation initiation factor eIF3." Nucleic Acids Research **36**(14): 4708-4718.
- Lee, M. H., P. Lalwani, M. J. Raftery, M. Matthaei, N. Lutteke, S. Kirsanovs, M. Binder, R. G. Ulrich, T. Giese, T. Wolff, D. H. Kruger and G. Schonrich (2011). "RNA helicase retinoic acid-inducible gene I as a sensor of Hantaan virus replication." Journal of General Virology **92**(Pt 9): 2191-2200.
- Lee, R. C. H., H. C. Hapuarachchi, K. C. Chen, K. M. Hussain, H. Chen, S. L. Low, L. C. Ng, R. Lin, M. M.-L. Ng and J. J. H. Chu (2013). "Mosquito Cellular Factors and Functions in Mediating the Infectious entry of Chikungunya Virus." PLoS Negl Trop Dis **7**(2): e2050.
- Lee, T. and J. Pelletier (2016). "The biology of DHX9 and its potential as a therapeutic target." Oncotarget.
- Lemant, J., V. Boisson, A. Winer, L. Thibault, H. Andre, F. Tixier, M. Lemercier, E. Antok, M. P. Cresta, P. Grivard, M. Besnard, O. Rollot, F. Favier, M. Huerre, J. L. Campinos and A. Michault (2008). "Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the Reunion Island outbreak in 2005-2006." Crit Care Med **36**(9): 2536-2541.
- Lemay, J. F., C. Lemieux, O. St-Andre and F. Bachand (2010). "Crossing the borders: poly(A)-binding proteins working on both sides of the fence." RNA Biology **7**(3): 291-295.

- Lemm, J. A., T. Rumenapf, E. G. Strauss, J. H. Strauss and C. M. Rice (1994). "Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis." EMBO J **13**(12): 2925-2934.
- Levis, R., S. Schlesinger and H. V. Huang (1990). "Promoter for Sindbis virus RNA-dependent subgenomic RNA transcription." Journal of Virology **64**(4): 1726-1733.
- Li, C., J. Guillen, N. Rabah, A. Blanjoie, F. Debart, J. J. Vasseur, B. Canard, E. Decroly and B. Coutard (2015). "mRNA Capping by Venezuelan Equine Encephalitis Virus nsP1: Functional Characterization and Implications for Antiviral Research." Journal of Virology **89**(16): 8292-8303.
- Li, G. P., M. W. La Starza, W. R. Hardy, J. H. Strauss and C. M. Rice (1990). "Phosphorylation of Sindbis virus nsP3 in vivo and in vitro." Virology **179**(1): 416-427.
- Li, M. L. and V. Stollar (2004). "Identification of the amino acid sequence in Sindbis virus nsP4 that binds to the promoter for the synthesis of the subgenomic RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(25): 9429-9434.
- Liljestrom, P., S. Lusa, D. Huylebroeck and H. Garoff (1991). "In vitro mutagenesis of a full-length cDNA clone of Semliki Forest virus: the small 6,000-molecular-weight membrane protein modulates virus release." Journal of Virology **65**(8): 4107-4113.
- Lin, L., Y. Li, H. M. Pyo, X. Lu, S. N. Raman, Q. Liu, E. G. Brown and Y. Zhou (2012). "Identification of RNA helicase A as a cellular factor that interacts with influenza A virus NS1 protein and its role in the virus life cycle." Journal of Virology **86**(4): 1942-1954.
- Linares, E. M., C. S. Pannuti, L. T. Kubota and S. Thalhammer (2013). "Immunospot assay based on fluorescent nanoparticles for Dengue fever detection." Biosens Bioelectron **41**: 180-185.
- Linder, P. and E. Jankowsky (2011). "From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(8): 505-516.
- Lindqvist, L., H. Imataka and J. Pelletier (2008). "Cap-dependent eukaryotic initiation factor-mRNA interactions probed by cross-linking." RNA **14**(5): 960-969.
- Linger, R. M., A. K. Keating, H. S. Earp and D. K. Graham (2008). "TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer." Adv Cancer Res **100**: 35-83.
- Liu, L., J. Tian, H. Nan, M. Tian, Y. Li, X. Xu, B. Huang, E. Zhou, J. A. Hiscox and H. Chen (2016). "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nucleocapsid Protein Interacts with Nsp9 and Cellular DHX9 To Regulate Viral RNA Synthesis." Journal of Virology **90**(11): 5384-5398.
- Liu, Z. R. (2002). "p68 RNA helicase is an essential human splicing factor that acts at the U1 snRNA-5' splice site duplex." Mol Cell Biol **22**(15): 5443-5450.
- Loo, Y. M. and M. Gale, Jr. (2011). "Immune signaling by RIG-I-like receptors." Immunity **34**(5): 680-692.

- Lopez-Ramirez, V., L. D. Alcaraz, G. Moreno-Hagelsieb and G. Olmedo-Alvarez (2011). "Phylogenetic distribution and evolutionary history of bacterial DEAD-Box proteins." J Mol Evol **72**(4): 413-431.
- Lu, C., H. Xu, C. T. Ranjith-Kumar, M. T. Brooks, T. Y. Hou, F. Hu, A. B. Herr, R. K. Strong, C. C. Kao and P. Li (2010). "The structural basis of 5' triphosphate double-stranded RNA recognition by RIG-I C-terminal domain." Structure **18**(8): 1032-1043.
- Lusa, S., H. Garoff and P. Liljestrom (1991). "Fate of the 6K membrane protein of Semliki Forest virus during virus assembly." Virology **185**(2): 843-846.
- Ma, J., L. Rong, Y. Zhou, B. B. Roy, J. Lu, L. Abrahamyan, A. J. Mouland, Q. Pan and C. Liang (2008). "The requirement of the DEAD-box protein DDX24 for the packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA." Virology **375**(1): 253-264.
- Mahboobi, S. H., A. A. Javanpour and M. R. Mofrad (2015). "The interaction of RNA helicase DDX3 with HIV-1 Rev-CRM1-RanGTP complex during the HIV replication cycle." PLoS ONE **10**(2): e0112969.
- Malet, H., B. Coutard, S. Jamal, H. Dutartre, N. Papageorgiou, M. Neuvonen, T. Ahola, N. Forrester, E. A. Gould, D. Lafitte, F. Ferron, J. Lescar, A. E. Gorbalenya, X. d. Lamballerie and B. Canard (2009). "The Crystal Structures of Chikungunya and Venezuelan Equine Encephalitis Virus nsP3 Macro Domains Define a Conserved Adenosine Binding Pocket." Journal of Virology **83**(13): 6534-6545.
- Malygin, A. A., E. I. Bondarenko, V. A. Ivanisenko, E. V. Protopopova, G. G. Karpova and V. B. Loktev (2009). "C-terminal fragment of human laminin-binding protein contains a receptor domain for venezuelan equine encephalitis and tick-borne encephalitis viruses." Biochemistry (Mosc) **74**(12): 1328-1336.
- Manojlovic, Z. and B. Stefanovic (2012). "A novel role of RNA helicase A in regulation of translation of type I collagen mRNAs." RNA **18**(2): 321-334.
- Marintchev, A., K. A. Edmonds, B. Marintcheva, E. Hendrickson, M. Oberer, C. Suzuki, B. Herdy, N. Sonenberg and G. Wagner (2009). "Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation." Cell **136**(3): 447-460.
- Martin-Acebes, M. A., A. B. Blazquez, N. Jimenez de Oya, E. Escribano-Romero and J. C. Saiz (2011). "West Nile virus replication requires fatty acid synthesis but is independent on phosphatidylinositol-4-phosphate lipids." PLoS ONE **6**(9): e24970.
- Masumi, A., H. Aizaki, T. Suzuki, J. B. DuHadaway, G. C. Prendergast, K. Komuro and H. Fukazawa (2005). "Reduction of hepatitis C virus NS5A phosphorylation through its interaction with amphiphysin II." Biochemical and Biophysical Research Communications **336**(2): 572-578.
- Mattila, P. K. and P. Lappalainen (2008). "Filopodia: molecular architecture and cellular functions." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(6): 446-454.
- Mavalankar, D., P. Shastri, T. Bandyopadhyay, J. Parmar and K. V. Ramani (2008). "Increased mortality rate associated with chikungunya epidemic, Ahmedabad, India." Emerg Infect Dis **14**(3): 412-415.

- Mazroui, R., R. Sukarieh, M. E. Bordeleau, R. J. Kaufman, P. Northcote, J. Tanaka, I. Gallouzi and J. Pelletier (2006). "Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation." Molecular Biology of the Cell **17**(10): 4212-4219.
- McCartney, S. A., L. B. Thackray, L. Gitlin, S. Gilfillan, H. W. Virgin and M. Colonna (2008). "MDA-5 recognition of a murine norovirus." PLoS Pathog **4**(7): e1000108.
- McInerney, G. M., N. L. Kedersha, R. J. Kaufman, P. Anderson and P. Liljestrom (2005). "Importance of eIF2alpha phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation." Molecular Biology of the Cell **16**(8): 3753-3763.
- McInerney, G. M., J. M. Smit, P. Liljestrom and J. Wilschut (2004). "Semliki Forest virus produced in the absence of the 6K protein has an altered spike structure as revealed by decreased membrane fusion capacity." Virology **325**(2): 200-206.
- Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immune recognition: mechanisms and pathways." Immunol Rev **173**: 89-97.
- Meertens, L., X. Carnec, M. P. Lecoin, R. Ramdasi, F. Guivel-Benhassine, E. Lew, G. Lemke, O. Schwartz and A. Amara (2012). "The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry." Cell host & microbe **12**(4): 544-557.
- Mehdi, H., E. Ono and K. C. Gupta (1990). "Initiation of translation at CUG, GUG, and ACG codons in mammalian cells." Gene **91**(2): 173-178.
- Melancon, P. and H. Garoff (1986). "Reinitiation of translocation in the Semliki Forest virus structural polyprotein: identification of the signal for the E1 glycoprotein." EMBO J **5**(7): 1551-1560.
- Melton, J. V., G. D. Ewart, R. C. Weir, P. G. Board, E. Lee and P. W. Gage (2002). "Alphavirus 6K proteins form ion channels." The Journal of Biological Chemistry **277**(49): 46923-46931.
- Mercer, J. (2011). "Viral apoptotic mimicry party: P.S. Bring your own Gas6." Cell host & microbe **9**(4): 255-257.
- Metivier, R., G. Penot, M. R. Hubner, G. Reid, H. Brand, M. Kos and F. Gannon (2003). "Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter." Cell **115**(6): 751-763.
- Meyer, K. F., C. M. Haring and B. Howitt (1931). "The Etiology of Epizootic Encephalomyelitis of Horses in the San Joaquin Valley, 1930." Science (New York, N.Y.) **74**(1913): 227-228.
- Mi, S. and V. Stollar (1991). "Expression of Sindbis virus nsP1 and methyltransferase activity in Escherichia coli." Virology **184**(1): 423-427.
- Michel, G., O. Petrakova, S. Atasheva and I. Frolov (2007). "Adaptation of Venezuelan equine encephalitis virus lacking 51-nt conserved sequence element to replication in mammalian and mosquito cells." Virology **362**(2): 475-487.

- Miki, H. and T. Takenawa (2002). "WAVE2 serves a functional partner of IRSp53 by regulating its interaction with Rac." Biochem Biophys Res Commun **293**(1): 93-99.
- Miller, D. J. and P. Ahlquist (2002). "Flock house virus RNA polymerase is a transmembrane protein with amino-terminal sequences sufficient for mitochondrial localization and membrane insertion." Journal of Virology **76**(19): 9856-9867.
- Miller, S., S. Kastner, J. Krijnse-Locker, S. Buhler and R. Bartenschlager (2007). "The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner." The Journal of Biological Chemistry **282**(12): 8873-8882.
- Mims, C. A., M. F. Day and I. D. Marshall (1966). "Cytopathic effect of Semliki Forest virus in the mosquito *Aedes aegypti*." Am J Trop Med Hyg **15**(5): 775-784.
- Minskaia, E., T. Hertzog, A. E. Gorbalenya, V. Campanacci, C. Cambillau, B. Canard and J. Ziebuhr (2006). "Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(13): 5108-5113.
- Mishra, B., M. Sharma, S. K. Pujhari, S. B. Appannanavar and R. K. Ratho (2011). "Clinical applicability of single-tube multiplex reverse-transcriptase PCR in dengue virus diagnosis and serotyping." J Clin Lab Anal **25**(2): 76-78.
- Mitoma, H., S. Hanabuchi, T. Kim, M. Bao, Z. Zhang, N. Sugimoto and Y. J. Liu (2013). "The DHX33 RNA helicase senses cytosolic RNA and activates the NLRP3 inflammasome." Immunity **39**(1): 123-135.
- Miyashita, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto and T. Seya (2011). "DDX60, a DEXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling." Mol Cell Biol **31**(18): 3802-3819.
- Montgomery, S. A., P. Berglund, C. W. Beard and R. E. Johnston (2006). "Ribosomal Protein S6 Associates with Alphavirus Nonstructural Protein 2 and Mediates Expression from Alphavirus Messages." Journal of Virology **80**(15): 7729-7739.
- Montpetit, B., N. D. Thomsen, K. J. Helmke, M. A. Seeliger, J. M. Berger and K. Weis (2011). "A conserved mechanism of DEAD-box ATPase activation by nucleoporins and InsP6 in mRNA export." Nature **472**(7342): 238-242.
- Morrow, A. G., R. R. Baker, H. E. Hanson and T. W. Mattingly (1957). "Successful surgical repair of a ruptured aneurysm of the sinus of Valsalva." Circulation **16**(4): 533-538.
- Moy, R. H., B. S. Cole, A. Yasunaga, B. Gold, G. Shankarling, A. Varble, J. M. Molleston, B. R. tenOever, K. W. Lynch and S. Cherry (2014). "Stem-loop recognition by DDX17 facilitates miRNA processing and antiviral defense." Cell **158**(4): 764-777.
- Muesing, M. A., D. H. Smith, C. D. Cabradilla, C. V. Benton, L. A. Lasky and D. J. Capon (1985). "Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus." Nature **313**(6002): 450-458.
- Mullan, P. B., J. E. Quinn and D. P. Harkin (2006). "The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control." Oncogene **25**(43): 5854-5863.

- Mullineux, S. T. and D. L. Lafontaine (2012). "Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: where do we stand?" Biochimie **94**(7): 1521-1532.
- Musso, D., C. Roche, E. Robin, T. Nhan, A. Teissier and V. M. Cao-Lormeau (2015). "Potential sexual transmission of Zika virus." Emerg Infect Dis **21**(2): 359-361.
- Myles, K. M., C. L. Kelly, J. P. Ledermann and A. M. Powers (2006). "Effects of an opal termination codon preceding the nsP4 gene sequence in the O'Nyong-Nyong virus genome on *Anopheles gambiae* infectivity." Journal of Virology **80**(10): 4992-4997.
- Myohanen, S. and S. B. Baylin (2001). "Sequence-specific DNA binding activity of RNA helicase A to the p16INK4a promoter." The Journal of Biological Chemistry **276**(2): 1634-1642.
- Myong, S., S. Cui, P. V. Cornish, A. Kirchhofer, M. U. Gack, J. U. Jung, K. P. Hopfner and T. Ha (2009). "Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA." Science (New York, N.Y.) **323**(5917): 1070-1074.
- Nabel, G. and D. Baltimore (1987). "An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells." Nature **326**(6114): 711-713.
- Nakajima, T., C. Uchida, S. F. Anderson, C. G. Lee, J. Hurwitz, J. D. Parvin and M. Montminy (1997). "RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II." Cell **90**(6): 1107-1112.
- Naphtine, S., C. Yek, M. L. Powell, T. D. Brown and I. Brierley (2012). "Characterization of the stop codon readthrough signal of Colorado tick fever virus segment 9 RNA." RNA **18**(2): 241-252.
- Nargi-Aizenman, J. L., C. M. Simbulan-Rosenthal, T. A. Kelly, M. E. Smulson and D. E. Griffin (2002). "Rapid activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to Sindbis virus and staurosporine-induced apoptotic cell death." Virology **293**(1): 164-171.
- Neddermann, P., M. Quintavalle, C. Di Pietro, A. Clementi, M. Cerretani, S. Altamura, L. Bartholomew and R. De Francesco (2004). "Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture." Journal of Virology **78**(23): 13306-13314.
- Neil, S. J., V. Sandrin, W. I. Sundquist and P. D. Bieniasz (2007). "An interferon-alpha-induced tethering mechanism inhibits HIV-1 and Ebola virus particle release but is counteracted by the HIV-1 Vpu protein." Cell host & microbe **2**(3): 193-203.
- Neuvonen, Kazlauskas, Martikainen, Hinkkanen, Ahola and Saksela (2011). "SH3 Domain-Mediated Recruitment of Host Cell Amphiphysins by Alphavirus nsP3 Promotes Viral RNA Replication." PLoS Pathogens **Vol. 7**(Issue 11): p1-15.
- Ng, L. F., A. Chow, Y. J. Sun, D. J. Kwek, P. L. Lim, F. Dimatatac, L. C. Ng, E. E. Ooi, K. H. Choo, Z. Her, P. Kourilsky and Y. S. Leo (2009). "IL-1beta, IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity." PLoS ONE **4**(1): e4261.
- Nickens, D. G. and R. W. Hardy (2008). "Structural and functional analyses of stem-loop 1 of the Sindbis virus genome." Virology **370**(1): 158-172.

- Niesters, H. G. and J. H. Strauss (1990). "Mutagenesis of the conserved 51-nucleotide region of Sindbis virus." Journal of Virology **64**(4): 1639-1647.
- Nigg, E. A. (1997). "Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation." Nature **386**(6627): 779-787.
- Nitsch, L., D. Tramontano, F. S. Ambesi-Impiombato, N. Quarto and S. Bonatti (1985). "Morphological and functional polarity of an epithelial thyroid cell line." Eur J Cell Biol **38**(1): 57-66.
- Noble, K. N., E. J. Tran, A. R. Alcazar-Roman, C. A. Hodge, C. N. Cole and S. R. Wentz (2011). "The Dbp5 cycle at the nuclear pore complex during mRNA export II: nucleotide cycling and mRNP remodeling by Dbp5 are controlled by Nup159 and Gle1." Genes Dev **25**(10): 1065-1077.
- Oehler, E., E. Fournier, I. Leparac-Goffart, P. Larre, S. Cubizolle, C. Sookhareea, S. Lastere and F. Ghawche (2015). "Increase in cases of Guillain-Barre syndrome during a Chikungunya outbreak, French Polynesia, 2014 to 2015." Euro Surveill **20**(48): 30079.
- Onishi, H., Y. Kino, T. Morita, E. Futai, N. Sasagawa and S. Ishiura (2008). "MBNL1 associates with YB-1 in cytoplasmic stress granules." J Neurosci Res **86**(9): 1994-2002.
- Onomoto, K., M. Jogi, J. S. Yoo, R. Narita, S. Morimoto, A. Takemura, S. Sambhara, A. Kawaguchi, S. Osari, K. Nagata, T. Matsumiya, H. Namiki, M. Yoneyama and T. Fujita (2012). "Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity." PLoS ONE **7**(8): e43031.
- Onomoto, K., M. Yoneyama, G. Fung, H. Kato and T. Fujita (2014). "Antiviral innate immunity and stress granule responses." Trends Immunol **35**(9): 420-428.
- Ooi, Y. S., K. M. Stiles, C. Y. Liu, G. M. Taylor and M. Kielian (2013). "Genome-wide RNAi screen identifies novel host proteins required for alphavirus entry." PLoS Pathog **9**(12): e1003835.
- Oshiumi, H., M. Ikeda, M. Matsumoto, A. Watanabe, O. Takeuchi, S. Akira, N. Kato, K. Shimotohno and T. Seya (2010). "Hepatitis C Virus Core Protein Abrogates the DDX3 Function That Enhances IPS-1-Mediated IFN- $\beta$  Induction." PLoS ONE **5**(12): e14258.
- Oshiumi, H., M. Miyashita, M. Okamoto, Y. Morioka, M. Okabe, M. Matsumoto and T. Seya (2015). "DDX60 Is Involved in RIG-I-Dependent and Independent Antiviral Responses, and Its Function Is Attenuated by Virus-Induced EGFR Activation." Cell Rep **11**(8): 1193-1207.
- Ou, J. H., C. M. Rice, L. Dalgarno, E. G. Strauss and J. H. Strauss (1982). "Sequence studies of several alphavirus genomic RNAs in the region containing the start of the subgenomic RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(17): 5235-5239.
- Ou, J. H., E. G. Strauss and J. H. Strauss (1981). "Comparative studies of the 3'-terminal sequences of several alpha virus RNAs." Virology **109**(2): 281-289.
- Ou, J. H., E. G. Strauss and J. H. Strauss (1983). "The 5'-terminal sequences of the genomic RNAs of several alphaviruses." J Mol Biol **168**(1): 1-15.

Owen, K. E. and R. J. Kuhn (1997). "Alphavirus budding is dependent on the interaction between the nucleocapsid and hydrophobic amino acids on the cytoplasmic domain of the E2 envelope glycoprotein." Virology **230**(2): 187-196.

Ozden, S., M. Huerre, J.-P. Riviere, L. L. Coffey, P. V. Afonso, V. Mouly, J. de Monredon, J.-C. Roger, M. El Amrani, J.-L. Yvin, M.-C. Jaffar, M.-P. Frenkiel, M. Sourisseau, O. Schwartz, G. Butler-Browne, P. Desprès, A. Gessain and P.-E. Ceccaldi (2007). "Human Muscle Satellite Cells as Targets of Chikungunya Virus Infection." PLoS ONE **2**(6): e527.

Padbidri, V. S. and T. T. Gnaneswar (1979). "Epidemiological investigations of chikungunya epidemic at Barsi, Maharashtra state, India." J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol **23**(4): 445-451.

Panas, M. D., T. Ahola and G. M. McInerney (2014). "The C-terminal repeat domains of nsP3 from the Old World alphaviruses bind directly to G3BP." J Virol **88**(10): 5888-5893.

Panas, M. D., T. Schulte, B. Thaa, T. Sandalova, N. Kedersha, A. Achour and G. M. McInerney (2015). "Viral and Cellular Proteins Containing FGDF Motifs Bind G3BP to Block Stress Granule Formation." PLoS Pathogens **11**(2): e1004659.

Panas, M. D., M. Varjak, A. Lulla, K. E. Eng, A. Merits, G. B. Karlsson Hedestam and G. M. McInerney (2012). "Sequestration of G3BP coupled with efficient translation inhibits stress granules in Semliki Forest virus infection." Molecular Biology of the Cell **23**(24): 4701-4712.

Panning, M., K. Grywna, M. van Esbroeck, P. Emmerich and C. Drosten (2008). "Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006." Emerg Infect Dis **14**(3): 416-422.

Paradkar, P. N., L. Trinidad, R. Voysey, J. B. Duchemin and P. J. Walker (2012). "Secreted Vago restricts West Nile virus infection in Culex mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(46): 18915-18920.

Pardigon, N., E. Lenches and J. H. Strauss (1993). "Multiple binding sites for cellular proteins in the 3' end of Sindbis alphavirus minus-sense RNA." Journal of Virology **67**(8): 5003-5011.

Pardigon, N. and J. H. Strauss (1992). "Cellular proteins bind to the 3' end of Sindbis virus minus-strand RNA." Journal of Virology **66**(2): 1007-1015.

Park, C. Y., H. J. Jun, T. Wakita, J. H. Cheong and S. B. Hwang (2009). "Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway." The Journal of Biological Chemistry **284**(14): 9237-9246.

Parrott, M. M., S. A. Sitariski, R. J. Arnold, L. K. Picton, R. B. Hill and S. Mukhopadhyay (2009). "Role of conserved cysteines in the alphavirus E3 protein." Journal of Virology **83**(6): 2584-2591.

Pastorino, B. A., C. N. Peyrefitte, L. Almeras, M. Grandadam, D. Rolland, H. J. Tolou and M. Bessaud (2008). "Expression and biochemical characterization of nsP2 cysteine protease of Chikungunya virus." Virus Res **131**(2): 293-298.

Peranen, J. and L. Kaariainen (1991). "Biogenesis of type I cytopathic vacuoles in Semliki Forest virus-infected BHK cells." Journal of Virology **65**(3): 1623-1627.

- Perera, R., K. E. Owen, T. L. Tellinghuisen, A. E. Gorbalenya and R. J. Kuhn (2001). "Alphavirus nucleocapsid protein contains a putative coiled coil alpha-helix important for core assembly." Journal of Virology **75**(1): 1-10.
- Perera, R., C. Riley, G. Isaac, A. S. Hopf-Jannasch, R. J. Moore, K. W. Weitz, L. Pasa-Tolic, T. O. Metz, J. Adamec and R. J. Kuhn (2012). "Dengue virus infection perturbs lipid homeostasis in infected mosquito cells." PLoS Pathog **8**(3): e1002584.
- Perez, L., R. Guinea and L. Carrasco (1991). "Synthesis of Semliki Forest virus RNA requires continuous lipid synthesis." Virology **183**(1): 74-82.
- Pestova, T. V., I. N. Shatsky, S. P. Fletcher, R. J. Jackson and C. U. Hellen (1998). "A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs." Genes Dev **12**(1): 67-83.
- Petersen, L. R. and A. M. Powers (2016). "Chikungunya: epidemiology." F1000Res **5**.
- Petitdemange, C., P. Becquart, N. Wauquier, V. Beziat, P. Debre, E. M. Leroy and V. Vieillard (2011). "Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity." PLoS Pathog **7**(9): e1002268.
- Phuklia, W., J. Kasisith, N. Modhiran, E. Rodpai, M. Thannagith, T. Thongsakulprasert, D. R. Smith and S. Ubol (2013). "Osteoclastogenesis induced by CHIKV-infected fibroblast-like synoviocytes: A possible interplay between synoviocytes and monocytes/macrophages in CHIKV-induced arthralgia/arthritis." Virus Research **177**(2): 179-188.
- Pichlmair, A., O. Schulz, C. P. Tan, T. I. Naslund, P. Liljestrom, F. Weber and C. Reis e Sousa (2006). "RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates." Science (New York, N.Y.) **314**(5801): 997-1001.
- Pichlmair, A., O. Schulz, C. P. Tan, J. Rehwinkel, H. Kato, O. Takeuchi, S. Akira, M. Way, G. Schiavo and C. Reis e Sousa (2009). "Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection." Journal of Virology **83**(20): 10761-10769.
- Pinol-Roma, S. and G. Dreyfuss (1992). "Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm." Nature **355**(6362): 730-732.
- Piotrowska, J., S. J. Hansen, N. Park, K. Jamka, P. Sarnow and K. E. Gustin (2010). "Stable formation of compositionally unique stress granules in virus-infected cells." Journal of Virology **84**(7): 3654-3665.
- Pippig, D. A., J. C. Hellmuth, S. Cui, A. Kirchhofer, K. Lammens, A. Lammens, A. Schmidt, S. Rothenfusser and K. P. Hopfner (2009). "The regulatory domain of the RIG-I family ATPase LGP2 senses double-stranded RNA." Nucleic Acids Research **37**(6): 2014-2025.
- Pisareva, V. P., A. V. Pisarev, A. A. Komar, C. U. Hellen and T. V. Pestova (2008). "Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29." Cell **135**(7): 1237-1250.

- Plumet, S., F. Herschke, J. M. Bourhis, H. Valentin, S. Longhi and D. Gerlier (2007). "Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response." PLoS ONE **2**(3): e279.
- Poeck, H., M. Bscheider, O. Gross, K. Finger, S. Roth, M. Rebsamen, N. Hanneschlager, M. Schlee, S. Rothenfusser, W. Barchet, H. Kato, S. Akira, S. Inoue, S. Endres, C. Peschel, G. Hartmann, V. Hornung and J. Ruland (2010). "Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production." Nat Immunol **11**(1): 63-69.
- Polesskaya, A., S. Cuvellier, I. Naguibneva, A. Duquet, E. G. Moss and A. Harel-Bellan (2007). "Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency." Genes Dev **21**(9): 1125-1138.
- Powell, J. R. and W. J. Tabachnick (2013). "History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review." Mem Inst Oswaldo Cruz **108 Suppl 1**: 11-17.
- Powers, A. M., A. C. Brault, Y. Shirako, E. G. Strauss, W. Kang, J. H. Strauss and S. C. Weaver (2001). "Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses." Journal of Virology **75**(21): 10118-10131.
- Prashant, S., A. S. Kumar, D. D. Basheeruddin, T. N. Chowdhary and B. Madhu (2009). "Cutaneous manifestations in patients suspected of chikungunya disease." Indian J Dermatol **54**(2): 128-131.
- Priya, R., I. K. Patro and M. M. Parida (2014). "TLR3 mediated innate immune response in mice brain following infection with Chikungunya virus." Virus Res **189**: 194-205.
- Protter, D. S. and R. Parker (2016). "Principles and Properties of Stress Granules." Trends Cell Biol.
- Qiu, C., Y. Ma, J. Wang, S. Peng and Y. Huang (2010). "Lin28-mediated post-transcriptional regulation of Oct4 expression in human embryonic stem cells." Nucleic Acids Research **38**(4): 1240-1248.
- Rajendran, R. R., A. C. Nye, J. Frasor, R. D. Balsara, P. G. Martini and B. S. Katzenellenbogen (2003). "Regulation of nuclear receptor transcriptional activity by a novel DEAD box RNA helicase (DP97)." The Journal of Biological Chemistry **278**(7): 4628-4638.
- Raju, R., M. Hajjou, K. R. Hill, V. Botta and S. Botta (1999). "In vivo addition of poly(A) tail and AU-rich sequences to the 3' terminus of the Sindbis virus RNA genome: a novel 3'-end repair pathway." Journal of Virology **73**(3): 2410-2419.
- Ramachandra, R. N. and S. K. Wikel (1992). "Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production." J Med Entomol **29**(5): 818-826.
- Rana, J., S. Rajasekharan, S. Gulati, N. Dudha, A. Gupta, V. K. Chaudhary and S. Gupta (2014). "Network mapping among the functional domains of Chikungunya virus nonstructural proteins." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **82**(10): 2403-2411.

- Rana, J., R. Sreejith, S. Gulati, I. Bharti, S. Jain and S. Gupta (2013). "Deciphering the host-pathogen protein interface in chikungunya virus-mediated sickness." Archives of Virology **158**(6): 1159-1172.
- Randall, G., M. Panis, J. D. Cooper, T. L. Tellinghuisen, K. E. Sukhodolets, S. Pfeffer, M. Landthaler, P. Landgraf, S. Kan, B. D. Lindenbach, M. Chien, D. B. Weir, J. J. Russo, J. Ju, M. J. Brownstein, R. Sheridan, C. Sander, M. Zavolan, T. Tuschl and C. M. Rice (2007). "Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(31): 12884-12889.
- Ranji, A., N. Shkriabai, M. Kvaratskhelia, K. Musier-Forsyth and K. Boris-Lawrie (2011). "Features of double-stranded RNA-binding domains of RNA helicase A are necessary for selective recognition and translation of complex mRNAs." The Journal of Biological Chemistry **286**(7): 5328-5337.
- Rao, Y. and V. Haucke (2011). "Membrane shaping by the Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain protein superfamily." Cell Mol Life Sci **68**(24): 3983-3993.
- Rathore, A. P., M. L. Ng and S. G. Vasudevan (2013). "Differential unfolded protein response during Chikungunya and Sindbis virus infection: CHIKV nsP4 suppresses eIF2 $\alpha$  phosphorylation." Virology Journal **Vol. 10**: pp.-36.
- Reddy, T. R., H. Tang, W. Xu and F. Wong-Staal (2000). "Sam68, RNA helicase A and Tap cooperate in the post-transcriptional regulation of human immunodeficiency virus and type D retroviral mRNA." Oncogene **19**(32): 3570-3575.
- Reineke, L. C. and R. E. Lloyd (2015). "The Stress Granule Protein G3BP1 Recruits Protein Kinase R To Promote Multiple Innate Immune Antiviral Responses." Journal of Virology **89**(5): 2575-2589.
- Reiss, S., C. Harak, I. Romero-Brey, D. Radujkovic, R. Klein, A. Ruggieri, I. Rebhan, R. Bartenschlager and V. Lohmann (2013). "The lipid kinase phosphatidylinositol-4 kinase III alpha regulates the phosphorylation status of hepatitis C virus NS5A." PLoS Pathog **9**(5): e1003359.
- Renault, P., J. L. Solet, D. Sissoko, E. Balleydier, S. Larrieu, L. Filleul, C. Lassalle, J. Thiria, E. Rachou, H. de Valk, D. Ilef, M. Ledrans, I. Quatresous, P. Quenel and V. Pierre (2007). "A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006." Am J Trop Med Hyg **77**(4): 727-731.
- Reynaud, J. M., D. Y. Kim, S. Atasheva, A. Rasaloukaya, J. P. White, M. S. Diamond, S. C. Weaver, E. I. Frolova and I. Frolov (2015). "IFIT1 Differentially Interferes with Translation and Replication of Alphavirus Genomes and Promotes Induction of Type I Interferon." PLoS Pathog **11**(4): e1004863.
- Rezza, G., L. Nicoletti, R. Angelini, R. Romi, A. C. Finarelli, M. Panning, P. Cordioli, C. Fortuna, S. Boros, F. Magurano, G. Silvi, P. Angelini, M. Dottori, M. G. Ciufolini, G. C. Majori, A. Cassone and C. s. group (2007). "Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region." Lancet **370**(9602): 1840-1846.

- Ribeiro, J. M., G. T. Makoul, J. Levine, D. R. Robinson and A. Spielman (1985). "Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*." The Journal of Experimental Medicine **161**(2): 332-344.
- Ribeiro, J. M., J. J. Weis and S. R. Telford, 3rd (1990). "Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function." Exp Parasitol **70**(4): 382-388.
- Rikkonen, M., J. Peranen and L. Kaariainen (1992). "Nuclear and nucleolar targeting signals of Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2." Virology **189**(2): 462-473.
- Robens, J. M., L. Yeow-Fong, E. Ng, C. Hall and E. Manser (2010). "Regulation of IRSp53-dependent filopodial dynamics by antagonism between 14-3-3 binding and SH3-mediated localization." Mol Cell Biol **30**(3): 829-844.
- Roberts, T. M. and K. Boris-Lawrie (2003). "Primary sequence and secondary structure motifs in spleen necrosis virus RU5 confer translational utilization of unspliced human immunodeficiency virus type 1 reporter RNA." Journal of Virology **77**(22): 11973-11984.
- Robertson-Anderson, R. M., J. Wang, S. P. Edgcomb, A. B. Carmel, J. R. Williamson and D. P. Millar (2011). "Single-molecule studies reveal that DEAD box protein DDX1 promotes oligomerization of HIV-1 Rev on the Rev response element." J Mol Biol **410**(5): 959-971.
- Robinson, M. C. (1955). "An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features." Trans R Soc Trop Med Hyg **49**(1): 28-32.
- Rogers, G. W., Jr., W. F. Lima and W. C. Merrick (2001). "Further characterization of the helicase activity of eIF4A. Substrate specificity." The Journal of Biological Chemistry **276**(16): 12598-12608.
- Romero-Brey, I. and R. Bartenschlager (2014). "Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses." Viruses **6**(7): 2826-2857.
- Romero-Brey, I., A. Merz, A. Chiramel, J. Y. Lee, P. Chlanda, U. Haselman, R. Santarella-Mellwig, A. Habermann, S. Hoppe, S. Kallis, P. Walther, C. Antony, J. Krijnse-Locker and R. Bartenschlager (2012). "Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication." PLoS Pathog **8**(12): e1003056.
- Ron, D. and P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 519-529.
- Roosendaal, J., E. G. Westaway, A. Khromykh and J. M. Mackenzie (2006). "Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein." Journal of Virology **80**(9): 4623-4632.
- Rossi, A. L. (1967). "Rural epidemic encephalitis in Venezuela caused by a group A arbovirus (VEE)." Prog Med Virol **9**: 176-203.
- Rossow, K. L. and R. Janknecht (2003). "Synergism between p68 RNA helicase and the transcriptional coactivators CBP and p300." Oncogene **22**(1): 151-156.

- Roy, B. B., J. Hu, X. Guo, R. S. Russell, F. Guo, L. Kleiman and C. Liang (2006). "Association of RNA Helicase A with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Particles." Journal of Biological Chemistry **281**(18): 12625-12635.
- Rumenapf, T., E. G. Strauss and J. H. Strauss (1995). "Aura virus is a New World representative of Sindbis-like viruses." Virology **208**(2): 621-633.
- Runge, S., K. M. Sparrer, C. Lassig, K. Hembach, A. Baum, A. Garcia-Sastre, J. Soding, K. K. Conzelmann and K. P. Hopfner (2014). "In vivo ligands of MDA5 and RIG-I in measles virus-infected cells." PLoS Pathogens **10**(4): e1004081.
- Saarikangas, J., H. Zhao, A. Pykalainen, P. Laurinmaki, P. K. Mattila, P. K. J. Kinnunen, S. J. Butcher and P. Lappalainen (2009). "Molecular Mechanisms of Membrane Deformation by I-BAR Domain Proteins." Current Biology **19**(2): 95-107.
- Saisawang, C., S. Saitornuang, P. Sillapee, S. Ubol, D. R. Smith and A. J. Ketterman (2015). "Chikungunya nsP2 protease is not a papain-like cysteine protease and the catalytic dyad cysteine is interchangeable with a proximal serine." Sci Rep **5**: 17125.
- Saito, T., D. M. Owen, F. Jiang, J. Marcotrigiano and M. Gale, Jr. (2008). "Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA." Nature **454**(7203): 523-527.
- Salonen, A., L. Vasiljeva, A. Merits, J. Magden, E. Jokitalo and L. Kaariainen (2003). "Properly Folded Nonstructural Polyprotein Directs the Semliki Forest Virus Replication Complex to the Endosomal Compartment." Journal of Virology **77**(3): 1691-1702.
- Salvador, B., Y. Zhou, A. Michault, M. O. Muench and G. Simmons (2009). "Characterization of Chikungunya pseudotyped viruses: Identification of refractory cell lines and demonstration of cellular tropism differences mediated by mutations in E1 glycoprotein." Virology **393**(1): 33-41.
- Sanchez David, R. Y., C. Combredet, O. Sismeiro, M. A. Dillies, B. Jagla, J. Y. Coppee, M. Mura, M. Guerbois Galla, P. Despres, F. Tangy and A. V. Komarova (2016). "Comparative analysis of viral RNA signatures on different RIG-I-like receptors." Elife **5**.
- Sanders, H. R., B. D. Foy, A. M. Evans, L. S. Ross, B. J. Beaty, K. E. Olson and S. S. Gill (2005). "Sindbis virus induces transport processes and alters expression of innate immunity pathway genes in the midgut of the disease vector, *Aedes aegypti*." Insect Biochem Mol Biol **35**(11): 1293-1307.
- Sanmartin-Barberi, C., H. Groot and E. Osorno-Mesa (1954). "Human epidemic in Colombia caused by the Venezuelan equine encephalomyelitis virus." Am J Trop Med Hyg **3**(2): 283-293.
- Sanz, M. A., A. Castello, I. Ventoso, J. J. Berlanga and L. Carrasco (2009). "Dual mechanism for the translation of subgenomic mRNA from Sindbis virus in infected and uninfected cells." PLoS ONE **4**(3): e4772.
- Sanz, M. A., L. Perez and L. Carrasco (1994). "Semliki Forest virus 6K protein modifies membrane permeability after inducible expression in *Escherichia coli* cells." The Journal of Biological Chemistry **269**(16): 12106-12110.

- Scheffzek, K., M. R. Ahmadian, W. Kabsch, L. Wiesmuller, A. Lautwein, F. Schmitz and A. Wittinghofer (1997). "The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants." Science (New York, N.Y.) **277**(5324): 333-338.
- Scheper, G. C. and C. G. Proud (2002). "Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation?" Eur J Biochem **269**(22): 5350-5359.
- Scherl, A., Y. Coute, C. Deon, A. Calle, K. Kindbeiter, J. C. Sanchez, A. Greco, D. Hochstrasser and J. J. Diaz (2002). "Functional proteomic analysis of human nucleolus." Molecular Biology of the Cell **13**(11): 4100-4109.
- Schilte, C., T. Couderc, F. Chretien, M. Sourisseau, N. Gangneux, F. Guivel-Benhassine, A. Kraxner, J. Tschopp, S. Higgs, A. Michault, F. Arenzana-Seisdedos, M. Colonna, L. Peduto, O. Schwartz, M. Lecuit and M. L. Albert (2010). "Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells." The Journal of Experimental Medicine **207**(2): 429-442.
- Schlegel, A., T. H. Giddings, Jr., M. S. Ladinsky and K. Kirkegaard (1996). "Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection." Journal of Virology **70**(10): 6576-6588.
- Schmaljohn, A. L. and D. McClain (1996). Alphaviruses (Togaviridae) and Flaviviruses (Flaviviridae). Medical Microbiology. S. Baron. Galveston (TX).
- Schmidt, A., T. Schwerd, W. Hamm, J. C. Hellmuth, S. Cui, M. Wenzel, F. S. Hoffmann, M. C. Michallet, R. Besch, K. P. Hopfner, S. Endres and S. Rothenfusser (2009). "5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(29): 12067-12072.
- Schnell, G., Y. M. Loo, J. Marcotrigiano and M. Gale, Jr. (2012). "Uridine composition of the poly-U/UC tract of HCV RNA defines non-self recognition by RIG-I." PLoS Pathog **8**(8): e1002839.
- Schoggins, J. W., S. J. Wilson, M. Panis, M. Y. Murphy, C. T. Jones, P. Bieniasz and C. M. Rice (2011). "A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response." Nature **472**(7344): 481-485.
- Scholte, F. E. M., A. Tas, I. C. Albulescu, E. Žusinaite, A. Merits, E. J. Snijder and M. J. v. Hemert (2015). "Stress granule components G3BP1 and G3BP2 play a proviral role early in chikungunya virus replication." Journal of Virology: JVI.03612-03614.
- Schroder, M., M. Baran and A. G. Bowie (2008). "Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation." EMBO J **27**(15): 2147-2157.
- Schuffenecker, I., I. Itean, A. Michault, S. Murri, L. Frangeul, M.-C. Vaney, R. Lavenir, N. Pardigon, J.-M. Reynes, F. Pettinelli, L. Biscornet, L. Diancourt, S. Michel, S. Duquerroy, G. Guigon, M.-P. Frenkiel, A.-C. Bréhin, N. Cubito, P. Desprès and F. Kunst (2006). "Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak." PLoS Medicine **3**(6): e263-1070.

Schutz, P., M. Bumann, A. E. Oberholzer, C. Bieniossek, H. Trachsel, M. Altmann and U. Baumann (2008). "Crystal structure of the yeast eIF4A-eIF4G complex: an RNA-helicase controlled by protein-protein interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(28): 9564-9569.

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

Scott, T. W. and T. G. Burrage (1984). "Rapid infection of salivary glands in *Culiseta melanura* with eastern equine encephalitis virus: an electron microscopic study." Am J Trop Med Hyg **33**(5): 961-964.

Scott, T. W. and S. C. Weaver (1989). "Eastern equine encephalomyelitis virus: epidemiology and evolution of mosquito transmission." Advances in Virus Research **37**: 277-328.

Sefton, B. M. (1977). "Immediate glycosylation of Sindbis virus membrane proteins." Cell **10**(4): 659-668.

Sergon, K., A. A. Yahaya, J. Brown, S. A. Bedja, M. Mlindasse, N. Agata, Y. Allaranger, M. D. Ball, A. M. Powers, V. Ofula, C. Onyango, L. S. Konongoi, R. Sang, M. K. Njenga and R. F. Breiman (2007). "Seroprevalence of Chikungunya virus infection on Grande Comore Island, union of the Comoros, 2005." Am J Trop Med Hyg **76**(6): 1189-1193.

Sharma, M., Z. Sasvari and P. D. Nagy (2011). "Inhibition of phospholipid biosynthesis decreases the activity of the tombusvirus replicase and alters the subcellular localization of replication proteins." Virology **415**(2): 141-152.

Shi, F., Y. Len, Y. Gong, R. Shi, X. Yang, D. Naren and T. Yan (2015). "Ribavirin Inhibits the Activity of mTOR/eIF4E, ERK/Mnk1/eIF4E Signaling Pathway and Synergizes with Tyrosine Kinase Inhibitor Imatinib to Impair Bcr-Abl Mediated Proliferation and Apoptosis in Ph<sup>+</sup> Leukemia." PLoS ONE **10**(8): e0136746.

Shih, J. W. and Y. H. Lee (2014). "Human DExD/H RNA helicases: emerging roles in stress survival regulation." Clin Chim Acta **436**: 45-58.

Shih, J. W., T. Y. Tsai, C. H. Chao and Y. H. Wu Lee (2008). "Candidate tumor suppressor DDX3 RNA helicase specifically represses cap-dependent translation by acting as an eIF4E inhibitory protein." Oncogene **27**(5): 700-714.

Shih, J. W., W. T. Wang, T. Y. Tsai, C. Y. Kuo, H. K. Li and Y. H. Wu Lee (2012). "Critical roles of RNA helicase DDX3 and its interactions with eIF4E/PABP1 in stress granule assembly and stress response." Biochem J **441**(1): 119-129.

Shin, G., S. A. Yost, M. T. Miller, E. J. Elrod, A. Grakoui and J. Marcotrigiano (2012). "Structural and functional insights into alphavirus polyprotein processing and pathogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(41): 16534-16539.

Shirako, Y. and J. H. Strauss (1994). "Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis." Journal of Virology **68**(3): 1874-1885.

Shirako, Y. and J. H. Strauss (1998). "Requirement for an aromatic amino acid or histidine at the N terminus of Sindbis virus RNA polymerase." Journal of Virology **72**(3): 2310-2315.

- Short, J. R., J. A. Speir, R. Gopal, L. M. Pankratz, J. Lanman and A. Schneemann (2016). "Role of Mitochondrial Membrane Spherules in Flock House Virus Replication." Journal of Virology **90**(7): 3676-3683.
- Silva, L. A., S. Khomandiak, A. W. Ashbrook, R. Weller, M. T. Heise, T. E. Morrison and T. S. Dermody (2014). "A single-amino-acid polymorphism in Chikungunya virus E2 glycoprotein influences glycosaminoglycan utilization." Journal of Virology **88**(5): 2385-2397.
- Sim, S., N. Jupatanakul, J. L. Ramirez, S. Kang, C. M. Romero-Vivas, H. Mohammed and G. Dimopoulos (2013). "Transcriptomic profiling of diverse Aedes aegypti strains reveals increased basal-level immune activation in dengue virus-refractory populations and identifies novel virus-vector molecular interactions." PLoS Negl Trop Dis **7**(7): e2295.
- Simmons, J. D., L. J. White, T. E. Morrison, S. A. Montgomery, A. C. Whitmore, R. E. Johnston and M. T. Heise (2009). "Venezuelan equine encephalitis virus disrupts STAT1 signaling by distinct mechanisms independent of host shutoff." Journal of Virology **83**(20): 10571-10581.
- Singh, I. and A. Helenius (1992). "Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating." Journal of Virology **66**(12): 7049-7058.
- Smith, W. A., B. T. Schurter, F. Wong-Staal and M. David (2004). "Arginine methylation of RNA helicase a determines its subcellular localization." The Journal of Biological Chemistry **279**(22): 22795-22798.
- Smithburn, K. C. H., A. (1944). "Semliki Forest virus. I. Isolation and pathogenic properties." Journal of Immunology(49): 141-157.
- Snijder, E. J., Y. van der Meer, J. Zevenhoven-Dobbe, J. J. Onderwater, J. van der Meulen, H. K. Koerten and A. M. Mommaas (2006). "Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex." Journal of Virology **80**(12): 5927-5940.
- Soderlund, H. and I. Ulmanen (1977). "Transient association of Semliki Forest virus capsid protein with ribosomes." Journal of Virology **24**(3): 907-909.
- Sokoloski, K. J., A. M. Dickson, E. L. Chaskey, N. L. Garneau, C. J. Wilusz and J. Wilusz (2010). "Sindbis virus usurps the cellular HuR protein to stabilize its transcripts and promote productive infections in mammalian and mosquito cells." Cell host & microbe **8**(2): 196-207.
- Solignat, M., B. Gay, S. Higgs, L. Briant and C. Devaux (2009). "Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus." Virology **393**(2): 183-197.
- Soto-Rifo, R., P. S. Rubilar, T. Limousin, S. de Breyne, D. Decimo and T. Ohlmann (2012). "DEAD-box protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs." EMBO J **31**(18): 3745-3756.
- Soto-Rifo, R., P. S. Rubilar and T. Ohlmann (2013). "The DEAD-box helicase DDX3 substitutes for the cap-binding protein eIF4E to promote compartmentalized translation initiation of the HIV-1 genomic RNA." Nucleic Acids Research **41**(12): 6286-6299.

Soulat, D., T. Burckstummer, S. Westermayer, A. Goncalves, A. Bauch, A. Stefanovic, O. Hantschel, K. L. Bennett, T. Decker and G. Superti-Furga (2008). "The DEAD-box helicase DDX3X is a critical component of the TANK-binding kinase 1-dependent innate immune response." *EMBO J* **27**(15): 2135-2146.

Soumahoro, M. K., P. Y. Boelle, B. A. Gauzere, K. Atsou, C. Pelat, B. Lambert, G. La Ruche, M. Gastellu-Etchegorry, P. Renault, M. Sarazin, Y. Yazdanpanah, A. Flahault, D. Malvy and T. Hanslik (2011). "The Chikungunya epidemic on La Reunion Island in 2005-2006: a cost-of-illness study." *PLoS Negl Trop Dis* **5**(6): e1197.

Sourisseau, M., C. Schilte, N. Casartelli, C. Trouillet, F. Guivel-Benhassine, D. Rudnicka, N. Sol-Foulon, K. Le Roux, M. C. Prevost, H. Fsihi, M. P. Frenkiel, F. Blanchet, P. V. Afonso, P. E. Ceccaldi, S. Ozden, A. Gessain, I. Schuffenecker, B. Verhasselt, A. Zamborlini, A. Saib, F. A. Rey, F. Arenzana-Seisdedos, P. Despres, A. Michault, M. L. Albert and O. Schwartz (2007). "Characterization of reemerging chikungunya virus." *PLoS Pathog* **3**(6): e89.

Souza-Neto, J. A., S. Sim and G. Dimopoulos (2009). "An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(42): 17841-17846.

Sprenger, D. and T. Wuithiranyagool (1986). "The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas." *J Am Mosq Control Assoc* **2**(2): 217-219.

Spuul, P., G. Balistreri, K. Hellström, A. V. Golubtsov, E. Jokitalo and T. Ahola (2011). "Assembly of Alphavirus Replication Complexes from RNA and Protein Components in a Novel trans-Replication System in Mammalian Cells." *Journal of Virology* **85**(10): 4739-4751.

Spuul, P., G. Balistreri, L. Kääriäinen and T. Ahola (2010). "Phosphatidylinositol 3-Kinase-, Actin-, and Microtubule-Dependent Transport of Semliki Forest Virus Replication Complexes from the Plasma Membrane to Modified Lysosomes." *Journal of Virology* **84**(15): 7543-7557.

Spuul, P., A. Salonen, A. Merits, E. Jokitalo, L. Kaariainen and T. Ahola (2007). "Role of the amphipathic peptide of Semliki forest virus replicase protein nsP1 in membrane association and virus replication." *Journal of Virology* **81**(2): 872-883.

Sreejith, R., J. Rana, N. Dudha, K. Kumar, R. Gabrani, S. K. Sharma, A. Gupta, S. Vrati, V. K. Chaudhary and S. Gupta (2012). "Mapping interactions of Chikungunya virus nonstructural proteins." *Virus Research* **169**(1): 231-236.

Srivastava, L., Y. R. Lapik, M. Wang and D. G. Pestov (2010). "Mammalian DEAD box protein Ddx51 acts in 3' end maturation of 28S rRNA by promoting the release of U8 snoRNA." *Mol Cell Biol* **30**(12): 2947-2956.

Stapleford, K. A., D. Rapaport and D. J. Miller (2009). "Mitochondrion-enriched anionic phospholipids facilitate flock house virus RNA polymerase membrane association." *Journal of Virology* **83**(9): 4498-4507.

Starck, S. R., V. Jiang, M. Pavon-Eternod, S. Prasad, B. McCarthy, T. Pan and N. Shastri (2012). "Leucine-tRNA initiates at CUG start codons for protein synthesis and presentation by MHC class I." *Science (New York, N.Y.)* **336**(6089): 1719-1723.

- Stefanovic, L., L. Longo, Y. Zhang and B. Stefanovic (2014). "Characterization of binding of LARP6 to the 5' stem-loop of collagen mRNAs: implications for synthesis of type I collagen." RNA Biology **11**(11): 1386-1401.
- Stiles, K. M. and M. Kielian (2016). "Role of TSPAN9 in Alphavirus Entry and Early Endosomes." Journal of Virology **90**(9): 4289-4297.
- Strauss, E. G., R. J. De Groot, R. Levinson and J. H. Strauss (1992). "Identification of the active site residues in the nsP2 proteinase of Sindbis virus." Virology **191**(2): 932-940.
- Strauss, J. H. and E. G. Strauss (1977). Togaviruses. The Molecular Biology of Animal Viruses. D. P. Nayak. New-York, Marcel Dekker. **1**: 111-166.
- Styer, L. M., P. Y. Lim, K. L. Louie, R. G. Albright, L. D. Kramer and K. A. Bernard (2011). "Mosquito saliva causes enhancement of West Nile virus infection in mice." Journal of Virology **85**(4): 1517-1527.
- Sudhaharan, T., K. P. Sem, H. F. Liew, Y. H. Yu, W. I. Goh, A. M. Chou and S. Ahmed (2016). "Rho GTPase Rif signals through IRTKS, Eps8 and WAVE2 to generate dorsal membrane ruffles and filopodia." Journal of Cell Science.
- Sugiura, T., Y. Nagano and Y. Noguchi (2007). "DDX39, upregulated in lung squamous cell cancer, displays RNA helicase activities and promotes cancer cell growth." Cancer Biol Ther **6**(6): 957-964.
- Sumathy, K. and K. M. Ella (2012). "Genetic diversity of Chikungunya virus, India 2006-2010: evolutionary dynamics and serotype analyses." J Med Virol **84**(3): 462-470.
- Sunden, Y., S. Semba, T. Suzuki, Y. Okada, Y. Orba, K. Nagashima, T. Umemura and H. Sawa (2007). "DDX1 promotes proliferation of the JC virus through transactivation of its promoter." Microbiol Immunol **51**(3): 339-347.
- Svitkin, Y. V., A. Pause, A. Haghighat, S. Pyronnet, G. Witherell, G. J. Belsham and N. Sonenberg (2001). "The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure." RNA **7**(3): 382-394.
- Takahasi, K., H. Kumeta, N. Tsuduki, R. Narita, T. Shigemoto, R. Hirai, M. Yoneyama, M. Horiuchi, K. Ogura, T. Fujita and F. Inagaki (2009). "Solution structures of cytosolic RNA sensor MDA5 and LGP2 C-terminal domains: identification of the RNA recognition loop in RIG-I-like receptors." The Journal of Biological Chemistry **284**(26): 17465-17474.
- Takei, K., V. I. Slepnev, V. Haucke and P. De Camilli (1999). "Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis." Nature Cell Biology **1**(1): 33-39.
- Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." Cell **140**(6): 805-820.
- Takkinen, K., J. Peranen and L. Kaariainen (1991). "Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein." Journal of General Virology **72** ( Pt 7): 1627-1633.

- Tamm, K., A. Merits and I. Sarand (2008). "Mutations in the nuclear localization signal of nsP2 influencing RNA synthesis, protein expression and cytotoxicity of Semliki Forest virus." Journal of General Virology **89**(Pt 3): 676-686.
- Tanaka, N. and B. Schwer (2005). "Characterization of the NTPase, RNA-binding, and RNA helicase activities of the DEAH-box splicing factor Prp22." Biochemistry **44**(28): 9795-9803.
- Tang, H. and F. Wong-Staal (2000). "Specific interaction between RNA helicase A and Tap, two cellular proteins that bind to the constitutive transport element of type D retrovirus." The Journal of Biological Chemistry **275**(42): 32694-32700.
- Tanner, N. K. (2003). "The newly identified Q motif of DEAD box helicases is involved in adenine recognition." Cell Cycle **2**(1): 18-19.
- Tardif, K. D., G. Waris and A. Siddiqui (2005). "Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress." Trends Microbiol **13**(4): 159-163.
- Tarn, W. Y., C. H. Hsu, K. T. Huang, H. R. Chen, H. Y. Kao, K. R. Lee and S. C. Cheng (1994). "Functional association of essential splicing factor(s) with PRP19 in a protein complex." EMBO J **13**(10): 2421-2431.
- Taylor, A., J. V. Melton, L. J. Herrero, B. Thaa, L. Karo-Astover, P. W. Gage, M. A. Nelson, K. C. Sheng, B. A. Lidbury, G. D. Ewart, G. M. McInerney, A. Merits and S. Mahalingam (2016). "Effects of an In-Frame Deletion of the 6k Gene Locus from the Genome of Ross River Virus." Journal of Virology **90**(8): 4150-4159.
- Taylor, R. M., H. S. Hurlbut, T. H. Work, J. R. Kingston and T. E. Frothingham (1955). "Sindbis virus: a newly recognized arthropodtransmitted virus." Am J Trop Med Hyg **4**(5): 844-862.
- TenBroeck C, M. M. (1933). "A serological difference between eastern and western equine encephalomyelitis virus." Proc. Soc. Exp. Biol. Med.(31): 217-220.
- Tetsuka, T., H. Uranishi, T. Sanda, K. Asamitsu, J.-P. Yang, F. Wong-Staal and T. Okamoto (2004). "RNA helicase A interacts with nuclear factor kappaB p65 and functions as a transcriptional coactivator." European journal of biochemistry / FEBS **271**(18): 3741-3751.
- Thaa, B., R. Biasiotto, K. Eng, M. Neuvonen, B. Gotte, L. Rheinemann, M. Mutso, A. Utt, F. Varghese, G. Balistreri, A. Merits, T. Ahola and G. M. McInerney (2015). "Differential Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt-mTOR Activation by Semliki Forest and Chikungunya Viruses Is Dependent on nsP3 and Connected to Replication Complex Internalization." Journal of Virology **89**(22): 11420-11437.
- Thakor, N. and M. Holcik (2012). "IRES-mediated translation of cellular messenger RNA operates in eIF2alpha- independent manner during stress." Nucleic Acids Research **40**(2): 541-552.
- Thomas, S., J. Rai, L. John, S. Schaefer, B. M. Pützer and O. Herchenröder (2013). "Chikungunya virus capsid protein contains nuclear import and export signals." Virology Journal **10**(1): 269-269.

- Thulasi Raman, S. N., G. Liu, H. M. Pyo, Y. C. Cui, F. Xu, L. E. Ayalew, S. K. Tikoo and Y. Zhou (2016). "DDX3 Interacts with Influenza A Virus NS1 and NP Proteins and Exerts Antiviral Function through Regulation of Stress Granule Formation." Journal of Virology **90**(7): 3661-3675.
- Tingting, P., F. Caiyun, Y. Zhigang, Y. Pengyuan and Y. Zhenghong (2006). "Subproteomic analysis of the cellular proteins associated with the 3' untranslated region of the hepatitis C virus genome in human liver cells." Biochem Biophys Res Commun **347**(3): 683-691.
- Tomar, S., R. W. Hardy, J. L. Smith and R. J. Kuhn (2006). "Catalytic core of alphavirus nonstructural protein nsP4 possesses terminal adenylyltransferase activity." Journal of Virology **80**(20): 9962-9969.
- Tossavainen, H., O. Aitio, M. Hellman, K. Saksela and P. Permi (2016). "Structural Basis of the High-Affinity Interaction Between the Alphavirus Nonstructural Protein-3 (nsP3) and the SH3 Domain of Amphiphysin-2." The Journal of Biological Chemistry.
- Tourriere, H., K. Chebli, L. Zekri, B. Courselaud, J. M. Blanchard, E. Bertrand and J. Tazi (2003). "The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules." The Journal of Cell Biology **160**(6): 823-831.
- Trobaugh, D. W., C. L. Gardner, C. Sun, A. D. Haddow, E. Wang, E. Chapnik, A. Mildner, S. C. Weaver, K. D. Ryman and W. B. Klimstra (2014). "RNA viruses can hijack vertebrate microRNAs to suppress innate immunity." Nature **506**(7487): 245-248.
- Tsai, N. P. and L. N. Wei (2010). "RhoA/ROCK1 signaling regulates stress granule formation and apoptosis." Cell Signal **22**(4): 668-675.
- Tsetsarkin, K., S. Higgs, C. E. McGee, X. De Lamballerie, R. N. Charrel and D. L. Vanlandingham (2006). "Infectious clones of Chikungunya virus (La Reunion isolate) for vector competence studies." Vector Borne Zoonotic Dis **6**(4): 325-337.
- Tsetsarkin, K. A., R. Chen, G. Leal, N. Forrester, S. Higgs, J. Huang and S. C. Weaver (2011). "Chikungunya virus emergence is constrained in Asia by lineage-specific adaptive landscapes." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(19): 7872-7877.
- Tsetsarkin, K. A., D. L. Vanlandingham, C. E. McGee and S. Higgs (2007). "A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential." PLoS Pathog **3**(12): e201.
- Tsetsarkin, K. A. and S. C. Weaver (2011). "Sequential adaptive mutations enhance efficient vector switching by Chikungunya virus and its epidemic emergence." PLoS Pathog **7**(12): e1002412.
- Tuittila, M. T., M. G. Santagati, M. Roytta, J. A. Maatta and A. E. Hinkkanen (2000). "Replicase complex genes of Semliki Forest virus confer lethal neurovirulence." Journal of Virology **74**(10): 4579-4589.
- Ullrich, O., T. Reinheckel, N. Sitte, R. Hass, T. Grune and K. J. Davies (1999). "Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6223-6228.

- Umate, P., N. Tuteja and R. Tuteja (2011). "Genome-wide comprehensive analysis of human helicases." Commun Integr Biol **4**(1): 118-137.
- Vabret, N. and J. M. Blander (2013). "Sensing microbial RNA in the cytosol." Front Immunol **4**: 468.
- van den Bergh, R. C., N. J. van Casteren, T. van den Broeck, E. R. Fordyce, W. K. Gietzmann, F. Stewart, S. MacLennan, S. Dabestani, J. Bellmunt, M. Bolla, E. Briers, P. Cornford, S. Joniau, M. D. Mason, V. Matveev, H. G. van der Poel, T. H. van der Kwast, O. Rouviere, T. Wiegel, T. B. Lam and N. Mottet (2015). "Role of Hormonal Treatment in Prostate Cancer Patients with Nonmetastatic Disease Recurrence After Local Curative Treatment: A Systematic Review." Eur Urol.
- Varjak, M., S. Saul, L. Arike, A. Lulla, L. Peil and A. Merits (2013). "Magnetic Fractionation and Proteomic Dissection of Cellular Organelles Occupied by the Late Replication Complexes of Semliki Forest Virus." Journal of Virology **87**(18): 10295-10312.
- Vasiljeva, L., A. Merits, P. Auvinen and L. Kaariainen (2000). "Identification of a novel function of the alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2." The Journal of Biological Chemistry **275**(23): 17281-17287.
- Vazeille, M., S. Moutailler, D. Coudrier, C. Rousseaux, H. Khun, M. Huerre, J. Thiria, J. S. Dehecq, D. Fontenille, I. Schuffenecker, P. Despres and A. B. Failloux (2007). "Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*." PLoS ONE **2**(11): e1168.
- Vega-Rua, A., C. Schmitt, I. Bonne, J. Krijnse Locker and A. B. Failloux (2015). "Chikungunya Virus Replication in Salivary Glands of the Mosquito *Aedes albopictus*." Viruses **7**(11): 5902-5907.
- Ventoso, I., M. A. Sanz, S. Molina, J. J. Berlanga, L. Carrasco and M. Esteban (2006). "Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR." Genes Dev **20**(1): 87-100.
- Vihinen, H., T. Ahola, M. Tuittila, A. Merits and L. Kaariainen (2001). "Elimination of phosphorylation sites of Semliki Forest virus replicase protein nsP3." Journal of Biological Chemistry **276**(8): 5745-5752.
- Vihinen, H. and J. Saarinen (2000). "Phosphorylation site analysis of Semliki forest virus nonstructural protein 3." The Journal of Biological Chemistry **275**(36): 27775-27783.
- Vogelstein, B., D. Lane and A. J. Levine (2000). "Surfing the p53 network." Nature **408**(6810): 307-310.
- Volk, S. M., R. Chen, K. A. Tsetsarkin, A. P. Adams, T. I. Garcia, A. A. Sall, F. Nasar, A. J. Schuh, E. C. Holmes, S. Higgs, P. D. Maharaj, A. C. Brault and S. C. Weaver (2010). "Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates." Journal of Virology **84**(13): 6497-6504.
- von Heijne, G. (1985). "Signal sequences. The limits of variation." J Mol Biol **184**(1): 99-105.

- Voss, J. E., M. C. Vaney, S. Duquerroy, C. Vornrhein, C. Girard-Blanc, E. Crublet, A. Thompson, G. Bricogne and F. A. Rey (2010). "Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography." Nature **468**(7324): 709-712.
- Voss, K., M. Amaya, C. Mueller, B. Roberts, K. Kehn-Hall, C. Bailey, E. Petricoin and A. Narayanan (2014). "Inhibition of host extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation decreases new world alphavirus multiplication in infected cells." Virology **468-470C**: 490-503.
- Wahl, M. C., C. L. Will and R. Luhrmann (2009). "The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine." Cell **136**(4): 701-718.
- Wahlberg, J. M., W. A. Boere and H. Garoff (1989). "The heterodimeric association between the membrane proteins of Semliki Forest virus changes its sensitivity to low pH during virus maturation." Journal of Virology **63**(12): 4991-4997.
- Wahlberg, J. M. and H. Garoff (1992). "Membrane fusion process of Semliki Forest virus. I: Low pH-induced rearrangement in spike protein quaternary structure precedes virus penetration into cells." The Journal of Cell Biology **116**(2): 339-348.
- Wang, K. S., R. J. Kuhn, E. G. Strauss, S. Ou and J. H. Strauss (1992). "High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells." Journal of Virology **66**(8): 4992-5001.
- Wang, K. S., A. L. Schmaljohn, R. J. Kuhn and J. H. Strauss (1991). "Antiidiotypic antibodies as probes for the Sindbis virus receptor." Virology **181**(2): 694-702.
- Ward, A. M., K. Bidet, A. Yinglin, S. G. Ler, K. Hogue, W. Blackstock, J. Gunaratne and M. A. Garcia-Blanco (2011). "Quantitative mass spectrometry of DENV-2 RNA-interacting proteins reveals that the DEAD-box RNA helicase DDX6 binds the DB1 and DB2 3' UTR structures." RNA Biology **8**(6): 1173-1186.
- Watanabe, N., T. Kato, A. Fujita, T. Ishizaki and S. Narumiya (1999). "Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization." Nature Cell Biology **1**(3): 136-143.
- Wauquier, N., P. Becquart, D. Nkoghe, C. Padilla, A. Ndjoyi-Mbiguino 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**(1): 115-123.
- Weaver, S. C., L. H. Lorenz and T. W. Scott (1992). "Pathologic changes in the midgut of *Culex tarsalis* following infection with Western equine encephalomyelitis virus." Am J Trop Med Hyg **47**(5): 691-701.
- Weaver, S. C., T. W. Scott, L. H. Lorenz, K. Lerthusnee and W. S. Romoser (1988). "Togavirus-associated pathologic changes in the midgut of a natural mosquito vector." Journal of Virology **62**(6): 2083-2090.
- Weiss, B., U. Geigenmuller-Gnirke and S. Schlesinger (1994). "Interactions between Sindbis virus RNAs and a 68 amino acid derivative of the viral capsid protein further defines the capsid binding site." Nucleic Acids Research **22**(5): 780-786.

- Welsch, S., S. Miller, I. Romero-Brey, A. Merz, C. K. Bleck, P. Walther, S. D. Fuller, C. Antony, J. Krijnse-Locker and R. Bartenschlager (2009). "Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites." Cell host & microbe **5**(4): 365-375.
- Wen, D. Z. and M. J. Schlesinger (1986). "Regulated expression of Sindbis and vesicular stomatitis virus glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(11): 3639-3643.
- Wengler, G. and G. Wengler (1984). "Identification of a transfer of viral core protein to cellular ribosomes during the early stages of alphavirus infection." Virology **134**(2): 435-442.
- Wengler, G., G. Wengler and H. S. Gross (1979). "Replicative form of Semliki Forest virus RNA contains an unpaired guanosine." Nature **282**(5740): 754-756.
- Westberg, C., J. P. Yang, H. Tang, T. R. Reddy and F. Wong-Staal (2000). "A novel shuttle protein binds to RNA helicase A and activates the retroviral constitutive transport element." The Journal of Biological Chemistry **275**(28): 21396-21401.
- Westermarck, J., C. Weiss, R. Saffrich, J. Kast, A. M. Musti, M. Wessely, W. Ansorge, B. Seraphin, M. Wilm, B. C. Valdez and D. Bohmann (2002). "The DEXD/H-box RNA helicase RHII/Gu is a co-factor for c-Jun-activated transcription." EMBO J **21**(3): 451-460.
- Wikel, S. K., R. N. Ramachandra and D. K. Bergman (1994). "Tick-induced modulation of the host immune response." Int J Parasitol **24**(1): 59-66.
- Wild, T., P. Horvath, E. Wyler, B. Widmann, L. Badertscher, I. Zemp, K. Kozak, G. Csucs, E. Lund and U. Kutay (2010). "A protein inventory of human ribosome biogenesis reveals an essential function of exportin 5 in 60S subunit export." PLoS Biol **8**(10): e1000522.
- Wilkins, C. and M. Gale, Jr. (2010). "Recognition of viruses by cytoplasmic sensors." Curr Opin Immunol **22**(1): 41-47.
- Wilson, B. J., G. J. Bates, S. M. Nicol, D. J. Gregory, N. D. Perkins and F. V. Fuller-Pace (2004). "The p68 and p72 DEAD box RNA helicases interact with HDAC1 and repress transcription in a promoter-specific manner." BMC Mol Biol **5**: 11.
- Wintachai, P., N. Wikan, A. Kuadkitkan, T. Jaimipuk, S. Ubol, R. Pulmanusahakul, P. Auewarakul, W. Kasinrerak, W.-Y. Weng, M. Panyasrivanit, A. Paemane, S. Kittisenachai, S. Roytrakul and D. R. Smith (2012). "Identification of Prohibitin as a Chikungunya Virus Receptor Protein (English)." J. med. virol. **84**(11): 1757-1770.
- Xi, Z., J. L. Ramirez and G. Dimopoulos (2008). "The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection." PLoS Pathog **4**(7): e1000098.
- Xing, L., M. Niu and L. Kleiman (2014). "Role of the OB-fold of RNA helicase A in the synthesis of HIV-1 RNA." Biochimica Et Biophysica Acta **1839**(11): 1069-1078.
- Xu, B. and Y. Huang (2009). "Histone H2a mRNA interacts with Lin28 and contains a Lin28-dependent posttranscriptional regulatory element." Nucleic Acids Research **37**(13): 4256-4263.

- Xu, B., K. Zhang and Y. Huang (2009). "Lin28 modulates cell growth and associates with a subset of cell cycle regulator mRNAs in mouse embryonic stem cells." RNA **15**(3): 357-361.
- Xu, J., K. Hopkins, L. Sabin, A. Yasunaga, H. Subramanian, I. Lamborn, B. Gordesky-Gold and S. Cherry (2013). "ERK signaling couples nutrient status to antiviral defense in the insect gut." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(37): 15025-15030.
- Xu, L., S. Khadijah, S. Fang, L. Wang, F. P. Tay and D. X. Liu (2010). "The cellular RNA helicase DDX1 interacts with coronavirus nonstructural protein 14 and enhances viral replication." Journal of Virology **84**(17): 8571-8583.
- Ye, J., A. R. Osborne, M. Groll and T. A. Rapoport (2004). "RecA-like motor ATPases--lessons from structures." Biochim Biophys Acta **1659**(1): 1-18.
- Yedavalli, V. S., C. Neuveut, Y. H. Chi, L. Kleiman and K. T. Jeang (2004). "Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function." Cell **119**(3): 381-392.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira and T. Fujita (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." Nat Immunol **5**(7): 730-737.
- Yoo, J. S., K. Takahasi, C. S. Ng, R. Ouda, K. Onomoto, M. Yoneyama, J. C. Lai, S. Lattmann, Y. Nagamine, T. Matsui, K. Iwabuchi, H. Kato and T. Fujita (2014). "DHX36 enhances RIG-I signaling by facilitating PKR-mediated antiviral stress granule formation." PLoS Pathog **10**(3): e1004012.
- Yu, S., J. Chen, M. Wu, H. Chen, N. Kato and Z. Yuan (2010). "Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKKepsilon and DDX3." Journal of General Virology **91**(Pt 8): 2080-2090.
- Zech, B., A. Kurtenbach, N. Krieger, D. Strand, S. Blencke, M. Morbitzer, K. Salassidis, M. Cotten, J. Wissing, S. Obert, R. Bartenschlager, T. Herget and H. Daub (2003). "Identification and characterization of amphiphysin II as a novel cellular interaction partner of the hepatitis C virus NS5A protein." Journal of General Virology **84**(Pt 3): 555-560.
- Zeidner, N. S., S. Higgs, C. M. Happ, B. J. Beaty and B. R. Miller (1999). "Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice." Parasite Immunol **21**(1): 35-44.
- Zhang, K. and R. J. Kaufman (2008). "Identification and characterization of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in vivo." Methods Enzymol **442**: 395-419.
- Zhang, P., Y. Li, J. Xia, J. He, J. Pu, J. Xie, S. Wu, L. Feng, X. Huang and P. Zhang (2014). "IPS-1 plays an essential role in dsRNA-induced stress granule formation by interacting with PKR and promoting its activation." Journal of Cell Science **127**(Pt 11): 2471-2482.
- Zhang, Y., J. T. Forys, A. P. Miceli, A. S. Gwinn and J. D. Weber (2011a). "Identification of DHX33 as a mediator of rRNA synthesis and cell growth." Molecular and Cellular Biology **31**(23): 4676-4691.

- Zhang, Y. and B. Stefanovic (2016). "LARP6 Meets Collagen mRNA: Specific Regulation of Type I Collagen Expression." Int J Mol Sci **17**(3).
- Zhang, Z., T. Kim, M. Bao, V. Facchinetti, S. Y. Jung, A. A. Ghaffari, J. Qin, G. Cheng and Y. J. Liu (2011b). "DDX1, DDX21, and DHX36 helicases form a complex with the adaptor molecule TRIF to sense dsRNA in dendritic cells." Immunity **34**(6): 866-878.
- Zhang, Z., B. Yuan, M. Bao, N. Lu, T. Kim and Y. J. Liu (2011c). "The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells." Nature Immunology **12**(10): 959-965.
- Zhang, Z., B. Yuan, N. Lu, V. Facchinetti and Y.-J. Liu (2011d). "DHX9 Pairs with IPS-1 To Sense Double-Stranded RNA in Myeloid Dendritic Cells." The Journal of Immunology **187**(9): 4501-4508.
- Zhong, B., Y. Yang, S. Li, Y. Y. Wang, Y. Li, F. Diao, C. Lei, X. He, L. Zhang, P. Tien and H. B. Shu (2008). "The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation." Immunity **29**(4): 538-550.
- Zirwes, R. F., J. Eilbracht, S. Kneissel and M. S. Schmidt-Zachmann (2000). "A novel helicase-type protein in the nucleolus: protein NOH61." Molecular Biology of the Cell **11**(4): 1153-1167.
- Zurek, B., I. Schoultz, A. Neerincx, L. M. Napolitano, K. Birkner, E. Bennek, G. Sellge, M. Lerm, G. Meroni, J. D. Soderholm and T. A. Kufer (2012). "TRIM27 negatively regulates NOD2 by ubiquitination and proteasomal degradation." PLoS ONE **7**(7): e41255.
- Zurzolo, C., C. Polistina, M. Saini, R. Gentile, L. Aloj, G. Migliaccio, S. Bonatti and L. Nitsch (1992). "Opposite polarity of virus budding and of viral envelope glycoprotein distribution in epithelial cells derived from different tissues." The Journal of Cell Biology **117**(3): 551-564.
- Zusinaite, E., K. Tints, K. Kiiver, P. Spuul, L. Karo-Astover, A. Merits and I. Sarand (2007). "Mutations at the palmitoylation site of non-structural protein nsP1 of Semliki Forest virus attenuate virus replication and cause accumulation of compensatory mutations." Journal of General Virology **88**(Pt 7): 1977-1985.

## **Résumé:**

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires recrutant des cofacteurs cellulaires afin de détourner les différents processus biologiques leur permettant notamment de répliquer leur génome et de former d'autres particules virales. Si des cofacteurs cellulaires de la réplication du virus Semliki Forest ont été récemment identifiés, très peu d'études ont permis de révéler des partenaires de la réplication du proche Alphavirus Chikungunya (CHIKV). Nous avons découvert, au cours de cette étude, un recrutement d'Hélicases à domaine DExD/H au niveau de sites de réplication du CHIKV. Parmi elles, DHX9 ou RNA Helicase A (RHA), grâce à ses propriétés de liaison et de modulation de structures des ARNs ou de complexes de Ribonucléoprotéines, est impliquée dans diverses fonctions depuis la transcription, la traduction, la réplication de génomes et jusqu'à la production de particules infectieuses de nombreux virus. Dans le cas du virus Chikungunya, nous avons caractérisé une fonction provirale dans la traduction de protéines non-structurales et une fonction antivirale dans la réplication du génome. Cette double fonction opposée est manipulée par le CHIKV afin d'assurer une production de protéines non-structurales composant le complexe de réplication tout en maintenant sa réplication. Ces travaux révèlent un nouveau mécanisme de régulation de la traduction de l'ARN génomique de CHIKV et apportent des éléments de compréhension dans la dynamique de passage du phénomène de traduction à l'étape de réplication du génome CHIKV.

## **Abstract :**

Viruses are obligate intracellular parasites recruiting cellular cofactors to divert different biological processes enabling them to replicate their genome and to form other viral particles. If cellular cofactors of Semliki Forest virus replication have recently been identified, very few studies have revealed the replication partners of the very close Alphavirus Chikungunya (CHIKV). During this study, we have discovered recruitments of several DExD/H Box Helicases at the CHIKV replication sites. Among them, DHX9 or RNA Helicase A (RHA) through its RNA binding properties and in modulating RNA secondary structures or Ribonucleoproteins complexes, is involved in various functions from transcription, translation, replication of genomes and up to production of infectious particles of many viruses. In the case of Chikungunya virus, we have characterized a proviral function in the translation of non-structural proteins and an antiviral function in the genome replication. These opposite functions are manipulated by CHIKV to ensure production nonstructural proteins, components of the CHIKV replication complex while maintaining its replication. These works reveal a new translation regulation mechanism of CHIKV genomic RNA and bring some knowledge on the passage from the translation stage to the replication step of CHIKV genome.