



**HAL**  
open science

# Cofacteurs cellulaires de la méthyl-guanylyltransférase nsP1 du virus Chikungunya et mécanismes de remodelage membranaire

Olivier Aïqui-Reboul-Paviet

► **To cite this version:**

Olivier Aïqui-Reboul-Paviet. Cofacteurs cellulaires de la méthyl-guanylyltransférase nsP1 du virus Chikungunya et mécanismes de remodelage membranaire. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Montpellier, 2023. Français. NNT: . tel-04958595

**HAL Id: tel-04958595**

**<https://hal.science/tel-04958595v1>**

Submitted on 20 Feb 2025

**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 DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

UMR 9004 - Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier

## Cofacteurs cellulaires de la méthyl-guanylyl- transférase nsP1 du virus Chikungunya et mécanismes de remodelage membranaire

Présentée par Olivier Aïqui-Reboul-Paviet

Le 15 Novembre 2023

Sous la direction de Laurence Briant

Devant le jury composé de

Nadia Rabah, Chargée de Recherche et Maître de Conférences, AFMB - UMR7257 / Université de Toulon

Pierre-Yves Lozach, Directeur de Recherche, IVPC - UMR754 INRAE, Lyon

Yannick Simonin, Professeur des Universités, PCCEI - UMR1058 / Université de Montpellier

Laurence Briant, Directrice de Recherche, IRIM - UMR 9004, Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directrice de thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER



# Remerciements

Je veux tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse. Je vous remercie Nadia Rabah, Pierre-Yves Lozach, et Yannick Simonin pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je voudrais également remercier Sara Salinas et Julien Pompon, qui ont fait partie de mon comité de suivis de thèse. Les conseils bienveillants que j'ai reçu de votre part ont été d'une aide considérable au cours de ces quatre années.

Je veux également remercier tout particulièrement ma directrice de thèse Laurence Briant. Tu m'as accordé une confiance incroyable en m'accueillant dans ton laboratoire et en me donnant accès à toutes ses ressources. C'était un honneur de travailler sous ta supervision. Tu m'as toujours montré l'exemple en étant constamment persévérante, exigeante envers toi-même et bienveillante envers les autres. Sans cette exemplarité que j'ai vu en toi, je ne suis pas sûr que je serais là où j'en suis aujourd'hui. Pendant cette thèse, j'ai essayé de donner le meilleur de moi-même en me disant régulièrement « Est-ce que je suis à la hauteur ? ». Tu as toujours été là pour m'encourager quand j'étais sur la bonne voie, et me rassurer quand cette question devenait trop oppressante. J'espère travailler à l'avenir avec d'autres personnes de ta trempe, et pouvoir emporter un peu de tes qualités avec moi pour les années à venir.

L'équipe JL<sup>2</sup>B<sup>2</sup> « Virus à ARN et métabolisme » a été pour moi un cadre de travail extrêmement privilégié. Travailler au côté des personnes toujours prêtes à donner un coup de main et dans une ambiance chaleureuse a été une chance extraordinaire. Merci à Éric, pour toute l'aide et les conseils que tu m'as apportés. Sans toi, j'aurais été incapable de trouver le moindre réactif au labo. Merci également à « petite » Lise sans l'aide de qui la finalisation de ma thèse aurait été bien difficile. Et désolé de t'avoir volé ton créneau de réunion avec Laurence de trop nombreuses fois. Merci à Aymeric pour toute l'aide technique que tu m'as apporté face aux énigmatiques machines du labo. Merci à Arnaud, mon camarade de thèse, sans qui je me serais fait dévorer par les démarches administratives. Merci, à tous les autres membres de l'équipe passé et présents : Camille, Jean-Luc, « grande » Lise, Patrick, Sandrine et Valérie pour vos conseils et votre bienveillance toutes ces années. Enfin, je veux remercier William, mon senpai, sans qui ce projet n'aurait pas vu le jour. J'ai appris énormément à tes côtés, et ce que tu as accompli en tant que doctorant a été une source d'inspiration et d'admiration pendant tout ce temps. Merci à toi !

Un grand remerciement également à Julie et Abla, nous avons traversé ces années doctorales côte à côte et vous avez toujours su me faire une place parmi vous. Merci pour vos conseils, vos petites attentions, et pour toutes les démarches que j'aurais manquées sans vous. Promis, je lirai (un peu plus) mes mails à l'avenir.

Je veux également remercier mes proches, ceux qui comptent le plus pour moi. Ceux que pendant ces quatre ans, j'ai trop souvent négligé. C'est sans doute la leçon la plus importante que je retire de cette expérience doctorale. Ne pas perdre bêtement les occasions qui se présentent de passer du temps avec ceux qu'on aime.

Je veux tout d'abord remercier mes parents, qui ont toujours crus en moi et qui m'ont fait confiance jusqu'au bout. Sans tout ce que vous m'avez transmis, je n'aurais jamais imaginé arriver jusqu'ici. Merci à toi maman pour toute l'aide que tu m'as apportée, et de m'avoir même proposé de relire ce manuscrit pour en corriger les fautes d'orthographe. Merci à toi papa, pour avoir toujours été là pour me remonter le moral, tu as su me faire reprendre mes esprits quand le stress m'embrouillait les idées. J'espère que vous serez fier de ce travail, car c'est aussi le vôtre. Je veux remercier également ma marraine Sylviane, pour être toujours de bon conseil face à mes râleries permanentes. Merci, à ma grand-mère Violette, pour être constamment enthousiaste face à mon travail. Enfin, je veux remercier ma (petite) sœur Clémentine, avec qui je partage bien plus qu'un bout de génome. Tu as, à chaque fois, été présente pour me changer les idées en discutant de tout et de rien et j'espère que j'ai pu te soutenir autant que tu l'as fait pour moi. J'ai hâte de pouvoir reprendre nos conversations interminables sur la narratologie et tous les tropes cinématographiques possible et imaginable. Je suis fier de toi et de la personne que tu es devenue (encore meilleure que Clint Eastwood).

Merci à mes amis du Lycée, « les Zikos », Clément, Mathieu et Paul-Malo, malgré les années, on n'a pas vraiment changé, et vous restez toujours dans mon cœur. Je ne ferais plus l'erreur de passer trop de temps sans vous voir.

Merci à mes amis historiens, Jeffrey, Dorian, Déborah, Christel et Mael. Notre rencontre a été un hasard, mais je garderai un souvenir mémorable de toutes nos soirées passées ensemble. Mael, merci de m'avoir poussé à enfin peindre mes figurines Warhammer, je te promets qu'elles seront prêtes un jour. J'espère qu'on pourra se revoir tous très vite.

Merci à mes amis Parisiens : Ash, Jamsie, Johanna, Saéros/Laurent, malgré la distance qui me sépare de votre ville de \*\*\*\*\*, vous avez toujours su prendre le temps pour qu'on puisse se voir. Merci Ash pour m'avoir toujours soutenu dans mes galères et encouragé à ne jamais me laisser faire. Tu es la personne la plus combative que je connaisse et je suis heureux que nous soyons amis depuis toutes ces années. Merci Johanna, ma camarade préférée pour tous ces moments d'échange politique passionnants. Je sais que tu emportes avec toi ta ferveur révolutionnaire à Prague. Merci Saéros pour toutes nos discussions où j'ai pu découvrir tes meilleures citations de Tolkien et Sénèque. Qui pourrait croire que derrière ce cadre au-delà de tout soupçon se cache le plus nerd des nerds ?

Merci à mes amis Montpellierains. Merci à Stan et Sarah, les parents les plus cool que je connaisse pour toujours m'avoir remonté le moral et incité à passer vous voir n'importe quand. J'ai toujours l'impression que nous nous sommes rencontrés hier, mais vous occupez une place gigantesque dans mon cœur. Merci, à Morgane, je n'oublierais pas de sitôt nos repas de midi à râler, à jouer aux Magic et à rire comme des baleines. Merci à Thomas, toujours sur les bons tuyaux, et prêt à se regarder un bon gros navet après une journée bien casse-pied.

Merci à Thibault, mon meilleur ami, mon presque frère. Je me souviens de l'époque où nous étions de simples collégiens aux blagues douteuses. Je suis heureux qu'après toutes ces années nous soyons devenus des adultes parfaitement responsables à l'humour encore plus douteux. Tu es l'une des personnes qui compte le plus à mes yeux et je sais que notre amitié va durer encore longtemps. Peut être assez longtemps pour contempler des horreurs au-delà de toute compréhension qui sais ?

Enfin merci Noémie, ma moitié. Tu sais déjà tout ce que je pourrai écrire ici. Ton soutien indéfectible a été la clé de voute de tout ce que j'ai entrepris depuis des années. Je garde dans mon cœur nos discussions interminables sur discord à parler de tout et de rien et à partager les pires liens de nos historiques pourris. Alors que toi aussi, tu te prépares à la même épreuve, je crois en ta réussite et nous sortirons victorieux ensemble. Je ne sais pas ce que l'avenir nous réserve, mais être à tes côté fait que je l'envisage de manière plus sereine.

Me voilà arrivé à la fin d'un long voyage. Un périple qui a commencé alors que je n'étais qu'un jeune morveux les yeux écarquillés devant des VHS. La voie que j'ai empruntée n'a pas été la plus directe, mais sans doute la plus intéressante. Je suis heureux de ne pas m'être perdu en chemin et je vois enfin la ligne d'arrivée. Merci à tous ceux que j'ai rencontrés sur la route et qui ont cru en moi et bonne lecture aux plus courageux d'entre vous.

# Table des matières

Remerciements .....	2
Table des matières .....	5
Table des figures .....	10
Table des abréviations.....	12
Chapitre 1. Introduction .....	16
1. CHIKV une menace ré-émergente .....	16
1.1. Histoire épidémiologique de CHIKV .....	16
a. Découverte .....	16
b. Epidémiologie historique de CHIKV de 1770 à nos jours.....	17
1.2. Vecteurs de CHIKV .....	19
a. Les arbovirus .....	19
b. Complexités de l'étude des vecteurs .....	19
c. Cycles infectieux .....	20
d. Vecteurs Principaux.....	21
1.3. Diversité Génétique du virus CHIKV .....	23
a. Les lignages de CHIKV et leurs répartitions géographiques.....	23
b. Différences de pathogénèses .....	25
c. Adaptations Vectorielles.....	26
1.4. Symptômes Cliniques .....	27
a. Premières phases de l'infection chez l'homme et tropisme cellulaire .....	27
b. Phase Aigue.....	29
c. Phase Chronique .....	31
1.5. Impact sur la santé publique et l'économie. ....	31
1.6. Perspectives thérapeutiques : vaccin, traitement ? .....	33
a. Modèles Animaux .....	33
b. Vaccins .....	35
Vaccin par virus inactivé.....	35
Vaccin par virus atténué .....	35
Vaccin par vecteur viral .....	36
Vaccin par particule pseudo-virale.....	36
Vaccin à ADN.....	36
Vaccin à ARNm.....	37

Vaccin sous unitaire .....	37
c. Traitements antiviraux.....	37
Inhibiteurs des étapes précoces de l'infection .....	38
Protéines non structurales .....	39
Enzymes cellulaires.....	40
1.7. Evolutions futures.....	41
2. Taxonomie et classifications.....	43
2.1. Virus à ARN positif.....	43
2.2. Togaviridae-Alphavirus .....	44
2.3. Classification Alternatives .....	45
a. Classification Antigénique.....	45
b. Alphavirus du vieux ou du nouveau monde .....	46
3. Structure et Génome .....	49
3.1. Virion .....	49
3.2. Organisation génomique .....	50
4. Cycle Infectieux.....	53
4.1. Facteurs d'attachement et récepteurs.....	54
4.2. Entrée et fusion .....	57
4.3. Décapsidation et traduction initiale.....	59
4.4. Formation du complexe de réplication .....	60
4.5. Assemblage et bourgeonnement .....	61
4.6. Et chez les vecteurs ? .....	64
5. Protéines Virales .....	67
5.1. Protéines structurales .....	67
a. Protéine C .....	67
b. 6K et TF .....	67
c. Protéines d'enveloppes.....	70
5.2. Protéines non-structurales .....	71
a. nsP1 .....	71
Coiffage des ARN viraux .....	72
Ancrage Membranaire.....	74
Interaction avec la réponse interféron .....	75
b. nsP2.....	76
Activité protéase de nsP2.....	76



Activité hélicase de nsP2.....	77
Activité ARN triphosphatase.....	77
Évitement immunitaire.....	77
c. nsP3.....	78
Activation de la voie PI3K-Akt-mTOR.....	79
Association avec les facteurs de granules de stress.....	80
ADP ribosylation des ARN viraux.....	81
d. nsP4.....	82
6. Déformations membranaires et infections virales.....	84
6.1. Protrusions membranaires dans la cellule eucaryote.....	84
a. Principaux types de protrusions membranaires.....	85
b. Polymères d'actine et déformations membranaires.....	86
c. Rôle des lipides membranaires.....	89
d. Réorganisation par les protéines cellulaires.....	92
Les voies des Rho GTPases.....	92
Protéines de Coupe.....	98
Protéines nucléatrices.....	99
e. Lamellipodes et BCPs.....	101
f. Filopodes et FLPs.....	104
Structure.....	104
TNTs, des FLPs particuliers.....	107
6.2. Protrusions membranaires et infections virales.....	108
a. Protrusions induites viralement.....	109
Lamellipodes ou BCPs.....	109
Filopodes ou FLPs.....	111
b. Usages viraux des protrusions membranaires.....	112
Entrée virale.....	113
Sites de bourgeonnement.....	115
Rapprochements membranaires.....	115
Fusion cytosolique.....	117
Contrôle de la motilité cellulaire.....	117
c. Chez CHIKV et les Alphavirus.....	118
7. Organelles de Réplication.....	124
7.1. Types d'organelles de réplication.....	124
a. Vésicules à doubles membranes.....	125

b. Vésicules à simples membranes ou sphérules .....	129
7.2. Chez CHIKV et les Alphavirus.....	131
a. Biogénèse et morphologie .....	131
b. Structure du complexe de réplication.....	133
c. Modèle fonctionnel .....	137
d. Intéreactants cellulaires du complexe de réplication viral .....	139
Protéines de liaison à l'ARN .....	140
Remodelage membranaire .....	142
Interaction avec le cytosquelette .....	142
Facteurs cytoplasmiques.....	143
8. Revue bibliographique.....	145
Objectifs de la Thèse .....	167
Chapitre 2. Résultats.....	168
1. Identification du rôle de l'axe de signalisation Rac1-PAK1-Arp2 dans la formation des filopodes par nsP1 de CHIKV .....	168
1.1. Sommaire de l'article.....	168
1.2. Article .....	170
2. Etude Protéomique de la protéine nsP1 de CHIKV .....	203
2.1. Introduction et objectifs .....	203
2.2. Résultats .....	205
a. Méthodologie de l'analyse protéomique de nsP1 .....	205
b. Interactome de la protéine nsP1 dans les cellules épithéliales humaines.....	206
c. Confirmation des données de l'interactome, le cas de HAX1 et SCRIB... ..	209
d. Interaction de SCRIB et HAX1 avec les Alphavirus .....	215
e. HAX1 et SCRIB sont nécessaires à la formation de protrusions cellulaires induites par nsP1 .....	219
f. Effets de l'inactivation de HAX1 et SCRIB sur la réplication des Alphavirus .....	220
g. Confirmation des données protéomiques et caractérisation d'IPO4 .....	222
2.3. Discussion.....	224
2.4. Matériel et méthode .....	229
3. Ciblage thérapeutique de nsP1 .....	233
3.1. Introduction et objectifs .....	233
a. Contexte de l'étude .....	233

b. Composés MADTPs et ciblage du coiffage viral .....	234
c. Imipramine et ciblage des voies du cholestérol.....	235
d. Objectifs .....	236
3.2. Résultats et discussion .....	237
3.3. Méthodes .....	238
Chapitre 3. Discussion Générale et Résultats complémentaires.....	240
1. L'importance de la voie Rac1 dans le remodelage membranaire.....	240
2. Rôle fonctionnel des protrusions induites par nsP1.....	243
3. Modèle d'interaction avec les facteurs cellulaires.....	247
4. nsP1 une cible thérapeutique à l'avenir.....	251
Bibliographie.....	254
Annexe .....	308
Résumé .....	325

# Table des figures

Fig. 1 Répartition mondiale des cas de Chikungunya.....	18
Fig. 2 Carte mondiale de la distribution estimée d' <i>Ae. aegypti</i> .....	22
Fig. 3 Carte mondiale de la distribution estimée d' <i>Ae. albopictus</i> .....	23
Fig. 4 Arbre phylogénétique de différents lignages et isolats de CHIKV.....	24
Fig. 5 Répartition et apparition des lignages majeurs de CHIKV.....	25
Fig. 6 Dissémination du virus du chikungunya chez les vertébrés.....	28
Fig. 7 Evaluation des différentes phases de l'infection par CHIKV et méthodes de diagnostics.....	30
Fig. 8 Carte de la prédiction des zones à risque de transmission virale par <i>Ae. Aegypti</i> et <i>Ae. Albopictus</i> suivant les trajectoires climatiques d'ici 2080. ....	42
Fig. 9 Complexes phylogénique des Alphavirus.....	46
Fig. 10 Arbre phylogénétique des Alphavirus.....	48
Fig. 11 Structure de la particule virale de CHIKV.....	50
Fig. 12 Organisation génomique de CHIKV.....	51
Fig. 13 Cycle viral de CHIKV au sein de cellules mammifères.....	53
Fig. 14 Récepteurs d'entrée et facteurs d'attachement des Alphavirus.....	55
Fig. 15 Principaux mécanismes d'internalisation des particules virales.....	57
Fig. 16 Modèle de fusion membranaire des Alphavirus.....	59
Fig. 17 Sphérules de réplication de CHIKV à ma membrane plasmique.....	61
Fig. 18 Modèle de biogénèse des CPV-II.....	63
Fig. 19 Modèle comparatif de la réplication des Alphavirus chez les cellules mammifères et les cellules d'insectes.....	65
Fig. 20 Maturation de la polyprotéine des Alphavirus.....	69
Fig. 21 Structure de l'hétérodimère p62-E1.....	70
Fig. 22 Organisation de la protéine nsP1.....	71
Fig. 23 Réactions de coiffage cellulaire et chez les Alphavirus.....	73
Fig. 24 Organisation de la protéine nsP2.....	76
Fig. 25 Organisation de la protéine nsP3.....	79
Fig. 26 Organisation de la protéine nsP4.....	82
Fig. 27 Mécanismes de déformation des membranes.....	85
Fig. 28 Types de protrusions cellulaires.....	86
Fig. 29 Structure de l'actine-G monomérique.....	87
Fig. 30 Dynamique des filaments d'actine.....	88
Fig. 31 Distribution des espèces lipidiques au sein des membranes cellulaires.....	90
Fig. 32 Protéines effectrices en aval des principales Rho GTPases, Rac1, Cdc42 et RhoA.....	93
Fig. 33 Cycle d'activation des Rho-GTPase.....	95
Fig. 34 GEFs spécifiques de Rac1 et Cdc42.....	96
Fig. 35 Complexes GAP impliqués dans la migration et l'invasion.....	97
Fig. 36 Complexe Arp2/3.....	100
Fig. 37 Formation de lamellipodes et nucléation d'actine.....	102

Fig. 38 Architecture moléculaire des filopodes.....	105
Fig. 39 Modèles de formation des filopodes.....	107
Fig. 40 Propagation virale et déformations membranaires.....	114
Fig. 41 Synapses virologiques établies par HIV.....	116
Fig. 42 Protrusions cellulaires induites par les Alphavirus.....	121
Fig. 43 Types d'organelles de réplication.....	125
Fig. 44 Diversité des DMVs chez les virus à ARN(+)......	126
Fig. 45 Voies de la biogenèse des vésicules à double membrane (VDM)......	127
Fig. 46 Structure cryo-électro-microscopique du complexe sphérule-pore de CHIKV. .....	133
Fig. 47 Structure de complexe de réplication mature in cellulo.....	135
Fig. 48 Structure de complexes nsPs membranaires non réplicatifs in cellulo.....	137
Fig. 49 Modèle de structuration de l'évagination des sphérules.....	139
Fig. 50 Modèle d'assemblage du complexe de réplication du CHIKV.....	144
Fig. 51 Méthodologie de l'analyse protéomique de nsP1.....	206
Fig. 52 Interactome de la protéine nsP1.....	208
Fig. 53 Interactions entre nsP1 et le cofacteurs cellulaires HAX1.....	213
Fig. 54 Interactions entre nsP1 et le cofacteurs cellulaires SCRIB.....	215
Fig. 55 Interaction de HAX1 et SCRIB avec les nsP1 des Alphavirus.....	217
Fig. 56 Localisation subcellulaire de SCRIB avec les nsP1 des Alphavirus.....	218
Fig. 57 Implication de HAX1 et SCRIB dans la formation de filopodes induits par nsP1.....	219
Fig. 58 Etude fonctionnelle de HAX1 et SCRIB au cours de l'infection par les Alphavirus.....	221
Fig. 59 Confirmation des données protéomiques et caractérisation d'IPO4.....	223
Fig. 60 Combinaison de traitements MADTP-410 et Imipramine sur l'infection par CHIKV.....	237
Fig. 61 Activation de la Rho-GTPase par CHIKV.....	242
Fig. 62 Effets de la surexpression de la protéine nsP1 sur l'infection par CHIKV...	245
Fig. 63 Modèle d'interaction de nsP1 avec ses cofacteurs cellulaires.....	250

## Table des abréviations

Abréviations	Nom Complet
<b>ABD</b>	Actin binding domain
<b>Abi1</b>	Abelson interactor 1
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADP</b>	Adenosine diphosphate
<b>Akt</b>	Protein kinase B
<b>ANKRD13A</b>	Ankyrin repeat domain 13A
<b>Arf</b>	Adenosine diphosphate-Ribosylation Factor (famille)
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>Arp2/3</b>	Actin Related Protein 2/3 (complexe)
<b>As</b>	Asian (CHIKV lineage)
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate
<b>AUD</b>	Alphavirus unique domain (nsP3)
<b>BAR</b>	Bin/Amphiphysin/RV (domaine)
<b>BHK</b>	Baby hamster kidney cell
<b>BLP</b>	Broad Cellular Protrusion
<b>CD2AP</b>	CD2 Associated Protein
<b>Cdc42</b>	Cell division cycle 42
<b>CHIKF</b>	Chikungunya Fever
<b>CHIKV</b>	Chikungunya Virus
<b>CPV-I</b>	Cytopathic vacuoles type I
<b>CPV-II</b>	Cytopathic vacuoles type II
<b>CREC</b>	Cab45 and ERC-55
<b>CRIB</b>	Cdc42/Rac Interactive Binding (motif)
<b>DAG</b>	Diglycérides
<b>DALY</b>	Disability-adjusted life year
<b>DbI</b>	Diffuse B-cell lymphoma (famille)
<b>DENV</b>	Dengue Virus
<b>DHX9</b>	DExH-Box Helicase 9
<b>Dia2</b>	Diaphanous Related Formin 2
<b>Dlg</b>	Discs large
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DMV</b>	Double membrane vesicle
<b>DNAJA1</b>	DnaJ Heat Shock Protein Family Member A1
<b>DOCK</b>	Dedicator of cytokinesis (famille)
<b>EBOV</b>	Ebola virus
<b>ECSA</b>	East/Central/South African (CHIKV lineage)
<b>EEEV</b>	Eastern Equine Encephalitis Virus
<b>eIF4E</b>	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E

<b>EILV</b>	Eilat Virus
<b>Ena</b>	Drosophila Enabled
<b>Eps15</b>	Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Substrate 15
<b>ESCRT</b>	endosomal sorting complexes required for transport
<b>FH2</b>	Formin-like protein 2
<b>FHL1</b>	Four And A Half LIM Domains 1
<b>FHV</b>	Flock house virus
<b>FLP</b>	Finger like protrusions
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycane
<b>GAP</b>	GTPase Activating proteins
<b>GDI</b>	Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors
<b>GEF</b>	Guanine nucleotide exchange factors
<b>GIT</b>	G-protein-coupled receptor (GPCR)-kinase-interacting proteins (famille)
<b>Gtase</b>	Guanylyl transferase
<b>HAX1</b>	HCLS1 Associated Protein X-1
<b>HEK293T</b>	Human embryonic kidney 293 cells expressing the SV40 large T antigen.
<b>HeLa</b>	Henrietta Lacks cell line
<b>HIV</b>	human immunodeficiency viruses
<b>hnRNP</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
<b>HPV</b>	Human papilloma virus
<b>HS</b>	Heparan sulfate
<b>HSPC300</b>	Haematopoietic stem/progenitor cell protein 300
<b>HSV</b>	Herpes simplex virus
<b>HTLV</b>	Virus T-lymphotrope humain
<b>HTS</b>	High-throughput screening
<b>HVD</b>	Hypervariable domain (nsP3)
<b>IFIT1</b>	Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 1
<b>IFN</b>	Interferon
<b>InV</b>	Influenza virus
<b>IOL</b>	Indian Ocean (CHIKV lineage)
<b>IPO4</b>	Importin 4
<b>IQGAP</b>	Ras GTPase-activating-like protein
<b>IRS4</b>	Insulin Receptor Substrate 4
<b>IRSP53</b>	Insulin receptor substrate of 53 kDa
<b>JAK</b>	Janus Kinases
<b>KSHV</b>	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
<b>LC-MS/MS</b>	Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry
<b>LDLRAD3</b>	low density lipoprotein receptor class A domain containing 3
<b>LFQ</b>	label-free quantification
<b>Lgl</b>	Lethal giant larvae
<b>LIMK</b>	LIM Motif-Containing Protein Kinase

<b>LPA</b>	Lisophosphatidic Acid
<b>LRR</b>	Leucine-rich repeat (domain)
<b>MARV</b>	Marburg virus
<b>MAYV</b>	Mayaro Virus
<b>MD</b>	N-terminal Macrodomein (nsP3)
<b>MIDV</b>	Middelburg Virus
<b>MLV</b>	Murine Leukemia Virus
<b>MMTV</b>	Mouse Mammary Tumour Virus
<b>MNKS</b>	MAP kinase-activated protein kinase
<b>Mtase</b>	Méthyl-transferase
<b>mTOR</b>	Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase
<b>Mxra8</b>	Matrix Remodeling Associated 8
<b>Nap1</b>	Nucleosome assembly protein 1
<b>NES</b>	Nuclear export signal
<b>NHP</b>	Primate non humain
<b>NK-1R</b>	Neurokinin Receptor 1
<b>NLS</b>	Nuclear localization signal
<b>NRAMP2</b>	Natural resistance-associated macrophage protein 2
<b>nsPs</b>	Non structural proteins
<b>NW</b>	New World (Alphavirus)
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la santé
<b>ONNV</b>	O'nyong-nyong Virus
<b>ORF</b>	Open reading frame
<b>OW</b>	Old World (Alphavirus)
<b>PA</b>	Phosphatidic Acid
<b>PAK1</b>	Serine/threonine-protein kinase 1
<b>PDZ</b>	PSD95-Dlg1-Zo1 (Domain)
<b>PE</b>	Phosphatidylethanolamin
<b>PFU</b>	Plaque forming unit
<b>PHB</b>	Prohibitin 1
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PRV</b>	Pseudorabies virus
<b>PS</b>	Packaging signal
<b>PSTPIP2</b>	Proline-Serine-Threonine Phosphatase Interacting Protein 2
<b>Rab5</b>	Ras-related protein Rab-5
<b>Rab7</b>	Ras-related protein Rab-7
<b>Rac1</b>	Ras homologous member
<b>RCN2</b>	Reticulocalbin 2
<b>RdRp</b>	ARN polymérase ARN-dépendante
<b>RE</b>	Reticulum endoplasmique
<b>RhoA</b>	Ras homologous member
<b>RIOK3</b>	Serine/threonine-protein kinase RIO3



<b>ROCK</b>	Rho-associated protein kinase
<b>RRV</b>	Ross River Virus
<b>RTPase</b>	RNA triphosphatase
<b>SAV</b>	Salmonid Alphavirus
<b>SCAR</b>	Suppressor of cAR
<b>SCRIB</b>	Scribble Planar Cell Polarity Protein
<b>SFV</b>	Semliki Forest Virus
<b>SG</b>	Stress Granule
<b>SINV</b>	Sindbis Virus
<b>SMV</b>	Single membrane vesicle
<b>sPs</b>	Structural Proteins
<b>Sra-1</b>	Steroid Receptor RNA Activator 1
<b>STAT</b>	Signal transducer and activator of transcription proteins
<b>STING</b>	Stimulator of interferon genes
<b>TBSV</b>	Tomato bushy stunt virus
<b>Tiam1</b>	T-Lymphoma Invasion And Metastasis-Inducing Protein 1
<b>TIMM50</b>	Translocase Of Inner Mitochondrial Membrane 50
<b>TMEM-192</b>	Transmembrane protein 192
<b>TNT</b>	Tunelling nanotube
<b>UTR</b>	Untranslated region (mRNA)
<b>VACV</b>	Vaccinia virus
<b>VASP</b>	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
<b>VEEV</b>	Venezuelan equine encephalitis virus
<b>VLDR</b>	Very low-density lipoprotein receptor
<b>VSV</b>	Vesicular stomatitis Indiana virus
<b>Waf</b>	West African (CHIKV lineage)
<b>WASP</b>	Wiskott–Aldrich syndrome protein
<b>WAVE</b>	WASP-family verprolin-homologous protein (famille)
<b>WEEV</b>	Western Equine Encephalitis Virus
<b>WRC</b>	WAVE regulatory complex
<b>ZDHHC2</b>	Zinc Finger DHHC-Type Palmitoyltransferase 2
<b>ZDHHC9</b>	Zinc Finger DHHC-Type Palmitoyltransferase 9
<b>ZIKV</b>	Zika virus
<b>β-PIX</b>	P21-activated protein kinase exchange factor beta

# Chapitre 1. Introduction

## 1. CHIKV une menace ré-émergente

### 1.1. Histoire épidémiologique de CHIKV

#### a. Découverte

La fièvre Chikungunya (CHIKF) est une pathologie qui est identifiée comme une maladie fébrile aiguë généralement accompagnée d'une éruption cutanée et d'une arthralgie grave, débilitante et souvent chronique. Elle est due à l'infection par le virus chikungunya (CHIKV) transmis par la piqûre d'un moustique infecté.

Cette pathologie a été décrite dans la période moderne pour la première fois lorsque son agent étiologique le virus chikungunya (CHIKV) a été isolé de patients infectés en 1953 dans la région du plateau Makondé (ou plateau de Newala) au sud-est de Zanzibar, qui correspond à la Tanzanie actuelle (Lumsden 1955, Robinson 1955). L'identification aurait été facilitée par la faible incidence du paludisme dans la région (Ross 1956). La région ayant un sol très perméable, les habitants stockent au sein de leurs villages de grandes quantités d'eau, entraînant la forte présence de moustiques *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) (Lumsden 1955). Les chercheurs observent qu'en moyenne 40 à 50% des habitants sont touchés par l'infection dans chaque village. De plus, ils font la démonstration qu'après un repas sanguin infecté, ces moustiques induisent une infection létale sur des modèles murins (Ross 1956).

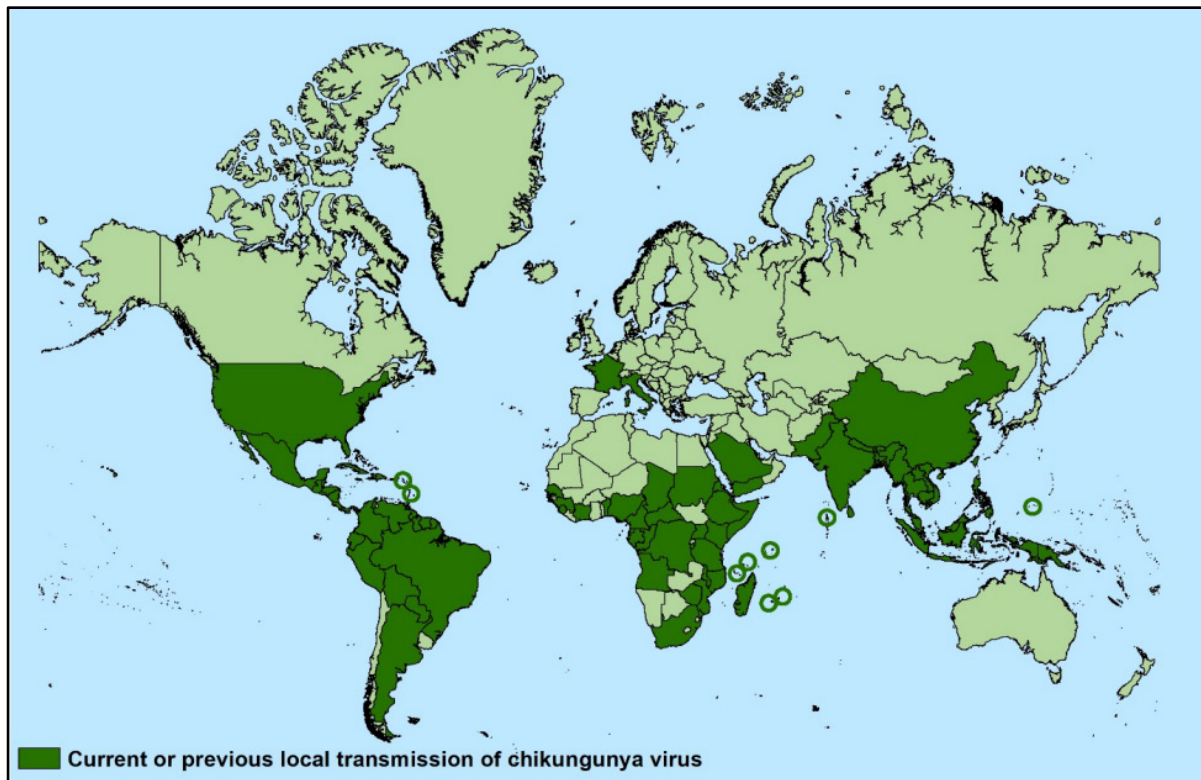
Les chercheurs décident de nommer ce virus « *chikungunya* », qui dans la langue Makonde des populations infectées signifie « le mal qui plie en deux » en référence aux fortes douleurs articulaires chez les individus touchés. Le virus est toutefois identifié comme une souche particulière du virus de la Dengue (DENV), il faudra 1988 pour que le séquençage de son génome le place comme étant un virus à part entière au sein de son génus (Calisher and Karabatsos 1988). Des épidémies dues à CHIKV ont probablement eu lieu à des dates antérieures à 1952, mais auraient été associées par erreur à DENV (Carey 1971, Halstead 2015).

## **b. Epidémiologie historique de CHIKF de 1770 à nos jours**

Ainsi, il est probable que CHIKV circulait de manière importante bien avant 1950. En effet, certains de ses symptômes sont communs à d'autres infections médiées par les moustiques comme la Dengue et il est fort possible que ces deux pathologies aient été pendant des décennies considérées comme une seule et même maladie (Carey 1971, Halstead 2015). Par exemple en 1827, Henry Dickson, Professeur de Médecine au Medical College of South Carolina décrit l'apparition d'une fièvre arthritique avec des exanthèmes cutanés, sur les îles vierges des États unis puis à la Havane et à la Nouvelle Orléans (Dickson 1859). La maladie avait été alors considérée comme un cas de Dengue même si l'arthralgie et l'invalidité post-maladie (caractéristique de CHIKF) avaient été remarquées à l'époque (Dumaresq 1828). De même en 1870 James Christie médecin à la cour du sultan de Zanzibar témoigne de l'apparition d'une épidémie présentant les symptômes de CHIKF. Il indique également que de vieux patients rapportent l'existence d'une épidémie similaire 48 ans plus tôt qu'ils nomment « kidinga pepo » (Christie 1872). Christie émet l'hypothèse que l'épidémie est liée à celle de la Nouvelle Orléans de 1828 mais également à d'autres épidémies similaires comme celle de Calcutta et de Rangoon en 1827. Selon lui la maladie aurait été disséminée depuis l'Afrique par la traite négrière à travers ces territoires (Christie 1881). Le médecin découvre également des écrits évoquant des épidémies comparables au kidinga pepo entre 1770 et 1772 en Egypte, en Inde, en Afrique subsaharienne et dans le sud-est asiatique.

Plus tard en 1901 une épidémie de Dengue à forte arthralgie est décrite à Hong Kong, puis en 1902 en Birmanie et à Madras en Inde (Carey 1971). Il est intéressant de noter que certains Birmans se disaient familiers avec la maladie, et qu'elle les frapperait à peu près tous les trente ans. Entre 1963 et 1964, une épidémie de grande échelle a touché le sud de l'Inde et le Sri Lanka. Cet événement a permis de pointer avec plus de précision les différences symptomatologiques et sérologiques entre le Chikungunya et la Dengue, et ainsi leurs phylogénies distinctes (Rao et al. 1965, Sarkar et al. 1965). Après cette vague épidémique, la circulation du virus a très fortement diminuée, le dernier prélèvement datant de 1972 (Pavri 1986, Arankalle et al. 2007). En 2004, une nouvelle épidémie ayant commencé avec pour origine le Kenya a touché l'île de la Réunion mais aussi l'île Maurice, Madagascar, Mayotte et les Seychelles (Chretien et

al. 2007, Renault et al. 2007). L'épidémie s'est ensuite propagée en Inde, en Malaisie, en Thaïlande et au Sri Lanka faisant plusieurs millions de cas (Lahariya and Pradhan 2006, Pulmanusahakul et al. 2011). Il est à noter que, durant cette période, plusieurs petits phénomènes épidémiques en Italie et en France ont eu pour origine des cas importés depuis ces régions (Rezza et al. 2007, Grandadam et al. 2011).



**Fig. 1 Répartition mondiale des cas de Chikungunya**

*Pays et Territoires où des cas de Chikungunya autochtones ont été enregistrés (Mars 2022). Source (<https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>)*

Entre 2011 et 2014 des événements épidémiques ont été observés dans les territoires du Pacifique comme la Nouvelle Calédonie, la Micronésie, les îles Tonga et les îles Samoa (Zeller et al. 2016). En parallèle en 2013, plusieurs épidémies ont été enregistrées dans les Caraïbes, en particulier en République Dominicaine, en Martinique, en Guadeloupe, à Haïti et à S<sup>t</sup> Martin (Fischer and Staples 2014). Enfin en parallèle de cette situation, plusieurs épidémies ont touchés les pays continentaux de l'Amérique du Sud, avec plus de 100 000 cas autochtones confirmés entre 2013 et 2017 principalement au Brésil, au Venezuela et en Guyane Française (PAHO/WHO

2022). En 2022 on considère que le virus circule désormais dans une grande partie de l'hémisphère sud, principalement en Afrique, Amérique centrale et du Sud et en Asie du Sud (CDC 2023) (Fig. 1).

## **1.2. Vecteurs de CHIKV**

### **a. Les arbovirus**

Comme mentionné précédemment CHIKV est principalement transmis par la pique de moustiques infectés. On le classe donc dans la catégorie des arbovirus (**Arthropod-borne-virus**) qui désigne les virus transmis par des arthropodes. Ce mode de transmission a été découvert pour la première fois dans le cadre d'une commission d'étude de l'US Army en 1900 à Camp Colombia. A l'époque la transmission de la fièvre jaune était totalement inconnue, mais en 1881 Carlos Finlay, émettait l'hypothèse que la pique d'un moustique en était responsable. C'est dans le cadre de cette commission que Jesse William Lazear, se fit piquer volontairement par un moustique ayant précédemment été en contact avec un individu infecté. Il contracta la fièvre jaune et décéda peu après. Par la suite d'autres travaux ont permis à l'OMS en 1985 d'arriver à la définition suivante des arbovirus: « virus qui partagent la caractéristique d'être naturellement maintenus par la transmission biologique entre des hôtes vertébrés sensibles par des arthropodes hématophages ou par la transmission transovarienne d'arthropodes femelles infectées à leur progéniture » (Vasilakis et al. 2019). Depuis, plus de 500 arbovirus ont été identifiés, et plus d'une centaine sont responsables de pathologies chez l'homme (Artsob et al. 2017).

### **b. Complexités de l'étude des vecteurs**

Il existe plus de 3000 espèces de moustiques à travers le monde répartis dans 111 genres différents, et leurs capacités à transmettre par leur pique des arbovirus dépendent de facteurs extrinsèques et intrinsèques, en particulier la génétique du moustique et du virus, les conditions de température et hygrométriques, la densité géographique, la régularité des repas sanguins, l'espérance de vie du moustique (Weaver et al. 2020).

Un des indicateurs modélisés pour prendre en compte cette diversité est le facteur  $R_0$  issu du modèle Ross-McDonald (Macdonald 1957). Cet indicateur mathématique se calcule comme suit :

$$R_0 = \frac{ma^2bcp^n}{(-\ln(p))r}$$

Dans cette équation,  $m$  est le ratio moustiques/humains,  $a$  est la fréquence de pique (sur l'humain),  $b$  et  $c$  l'efficacité de transmission du pathogène,  $p$  l'espérance de vie du moustique,  $r$  le taux de récupération chez l'Homme et  $n$  la durée d'incubation.

Dans ce modèle, plus la fréquence de piqûre sur l'homme est élevée, plus le  $R_0$  est élevé. Ainsi les espèces de moustiques préfèrent piquer l'homme plutôt que les animaux (anthropophiliques) ont un indice  $R_0$  associé élevé. A l'inverse, les espèces de moustiques ayant une affinité supérieure pour les animaux par rapports à l'Homme (zoophiliques), ont un indice  $R_0$  plus faible pour le même pathogène. Le modèle Ross-McDonald a servi de base à l'établissement de dizaines de modèles essayant de prendre en compte des complexités supplémentaires. Cependant des facteurs comme les piqûres par différentes espèces de moustiques en simultanément, l'hétérogénéité spatiale et les variations saisonnières sont peu considérés.

### **c. Cycles infectieux**

Lors de la prise d'un repas sanguin infecté, CHIKV infecte d'abord l'intestin moyen du vecteur moustique avant d'atteindre l'hémolymphe et enfin de coloniser les glandes salivaires (Dong et al. 2017) Il a été également montré qu'il existait une transmission verticale, de la femelle vers ses œufs via l'infection des ovaires (Agarwal et al. 2014). Le déroulement rapide de ces étapes est absolument nécessaire au virus pour infecter un autre individu vertébré avant la mort de son vecteur.

La circulation de CHIKV se déroule en deux cycles :

Le premier est un cycle enzootique, c'est-à-dire une situation où le virus est transmis de mammifères à moustiques sans présence humaine. Dans cette situation, les primates non humains sont considérés comme le réservoir principal. En Afrique, des isolats ont été prélevés chez des chimpanzés (*Pan troglodytes*), des babouins (*Papio dogueri*) ou des vervets (*Cercopithecus miti*) (Paul and Singh 1968, Inoue et al. 2003,

Diallo et al. 2012, Broeckel et al. 2015). Cependant des isolats ont également été identifiés dans plusieurs espèces de chauves-souris, de rongeurs, d'oiseaux et de reptiles. Dans ce contexte, les vecteurs associés à ce cycle enzootique sont *Ae. aegypti*, *Aedes africanus*, *Aedes furcifer*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes opok*, *Aedes vittatus*, *Aedes argenteopunctatus*, *Anopheles funestus*, *Mansonia africana*, et *Mansonia uniformis* (Chevillon et al. 2008, Weaver et al. 2020). Beaucoup de ces espèces ont un comportement zoophilique.

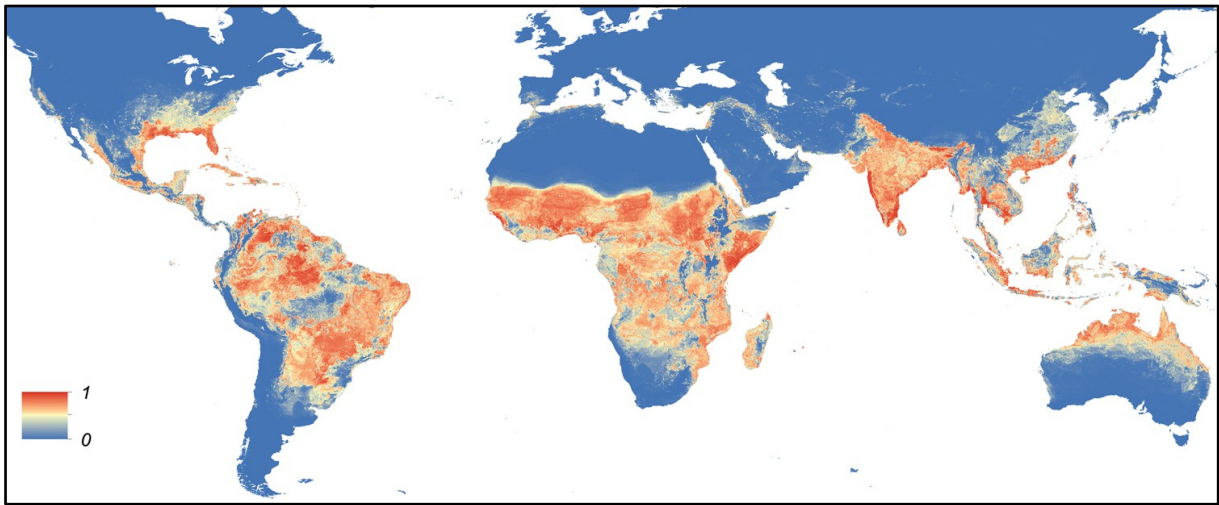
Le second cycle est un cycle urbain épidémique, où des humains infectés sont les réservoirs principaux avec une circulation via des espèces de moustiques domestiqués. Dans ce cadre les espèces de moustiques incriminées sont *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* deux espèces ayant de grandes aires de répartitions mondiales et au comportement anthropophilique (Ryan et al. 2019).

Les deux cycles enzootique et épidémique sont connectés par des phénomènes de déversement enzootique. En effet, au Sénégal, il a été observé que plusieurs espèces enzootiques sont capables d'une plasticité écologique, étant présentes aux abords de villages et dans les zones forestières (*Ae. vittatus*, *Ae. dalzieli*, *Ae. furcifer*) (Diallo et al. 2012). Néanmoins, il a été montré que les cas d'infections rurales n'étaient pas répartis de manière égale entre les âges et les genres. Ainsi les infections touchaient significativement plus les individus qui se rendent dans les zones forestières (les hommes adultes) en comparaison de ceux qui restent dans les zones domestiques (femmes, enfants et personnes âgées).

#### **d. Vecteurs Principaux**

L'espèce *Ae. aegypti* est présente dans les zones tropicales et subtropicales à l'échelle du monde (Kraemer et al. 2015) (Fig. 2). Elle contient deux sous espèces : Une population ancestrale, *Ae. aegypti formosus* originaire des zones boisées d'Afrique et au comportement zoophilique. La sous espèce *Ae. aegypti aegypti* est, quant à elle, considérée comme domestiquée et anthropophilique. Ces deux sous espèces ont des aires de répartitions géographiques bien distinctes, *Ae. ae. aegypti* étant présent à l'échelle mondiale dans toutes les zones tropicales et subtropicales à l'exception de l'Afrique et *Ae. ae. formosus* étant présent uniquement en Afrique (Brown et al. 2014). Une hypothèse qui expliquerait la séparation de ces deux sous populations serait

qu'une population d'*Ae. aegypti* au nord de l'Afrique aurait été isolée suite à une grande sécheresse ayant eu lieu il y a 4000 ans (Tabachnick 1991).

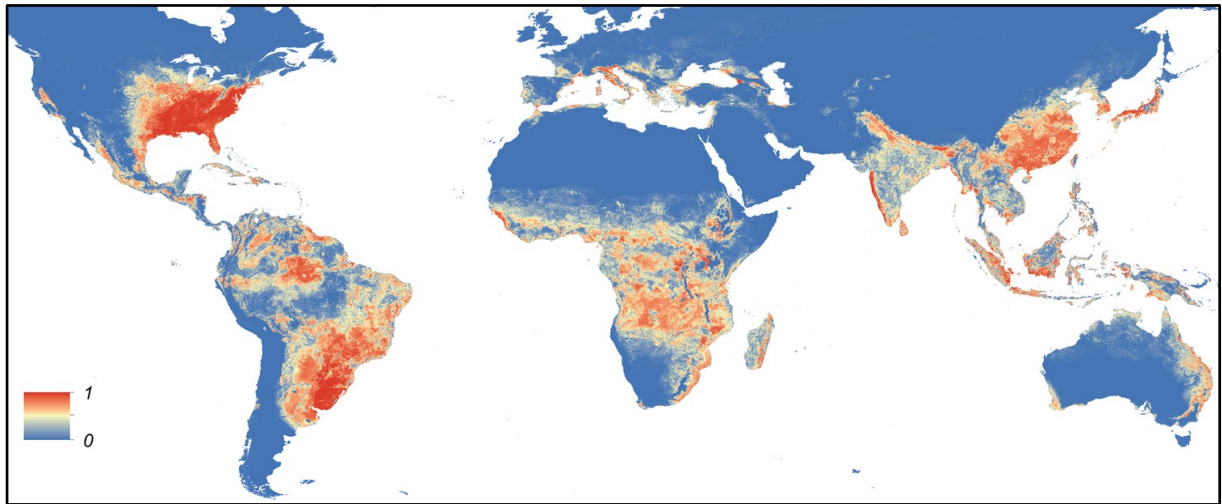


**Fig. 2 Carte mondiale de la distribution estimée d'*Ae. aegypti*.**

Carte représentant la probabilité d'occurrence (de 0 bleu à 1 rouge) à une résolution spatiale de 5 km × 5 km. D'après (Kraemer et al. 2015).

*Ae. albopictus* est originaire des régions forestières d'Asie du sud-est, mais est présent sur les cinq continents (Fig. 3). En effet cette espèce peut se développer à des températures plus froides, lui permettant de coloniser des niches écologiques inaccessibles à *Ae. aegypti* comme en Europe ou en Amérique du Nord qu'elle a colonisée depuis les années 1980 (Medlock et al. 2012, Garcia-Rejon et al. 2021). Cette espèce a pendant longtemps été considérée comme un vecteur secondaire, car, ayant un comportement opportuniste, elle préfère se nourrir sur d'autres mammifères avant l'homme. Cependant le cas de l'épidémie de l'Île de la Réunion, a illustré le cas d'un profil clairement anthropophile, suggérant un bouleversement de ces comportements (Delatte et al. 2010).





**Fig. 3 Carte mondiale de la distribution estimée d'*Ae. albopictus*.**

Carte représentant la probabilité d'occurrence (de 0 bleu à 1 rouge) à une résolution spatiale de 5 km × 5 km. D'après (Kraemer et al. 2015).

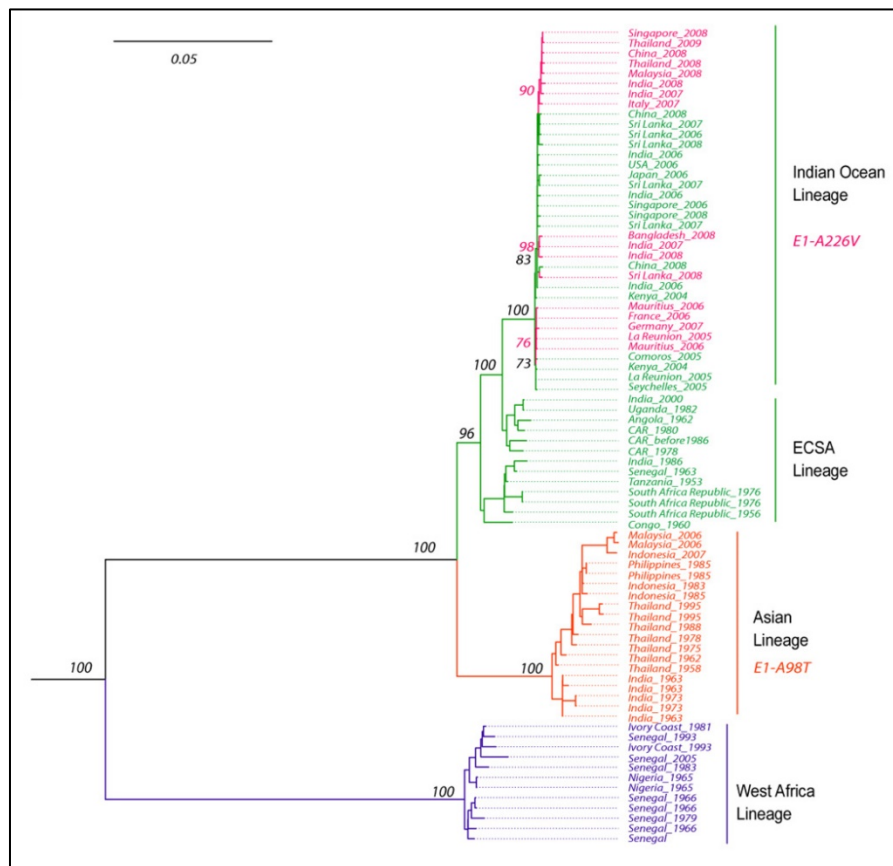
## 1.3. Diversité Génétique du virus CHIKV

### a. Les lignages de CHIKV et leurs répartitions géographiques

CHIKV étant présent à l'échelle du globe, des distinctions génétiques sont discernables entre les différentes populations virales disséminées sur la planète résultant dans l'identification de trois génotypes distincts mais remarquablement conservés (Volk et al. 2010) : les lignages d'Afrique de l'Ouest (Waf), d'Afrique de l'Est/Centrale/du Sud (ECSA) et Asiatique (As) (Powers et al. 2000) (Fig. 4).

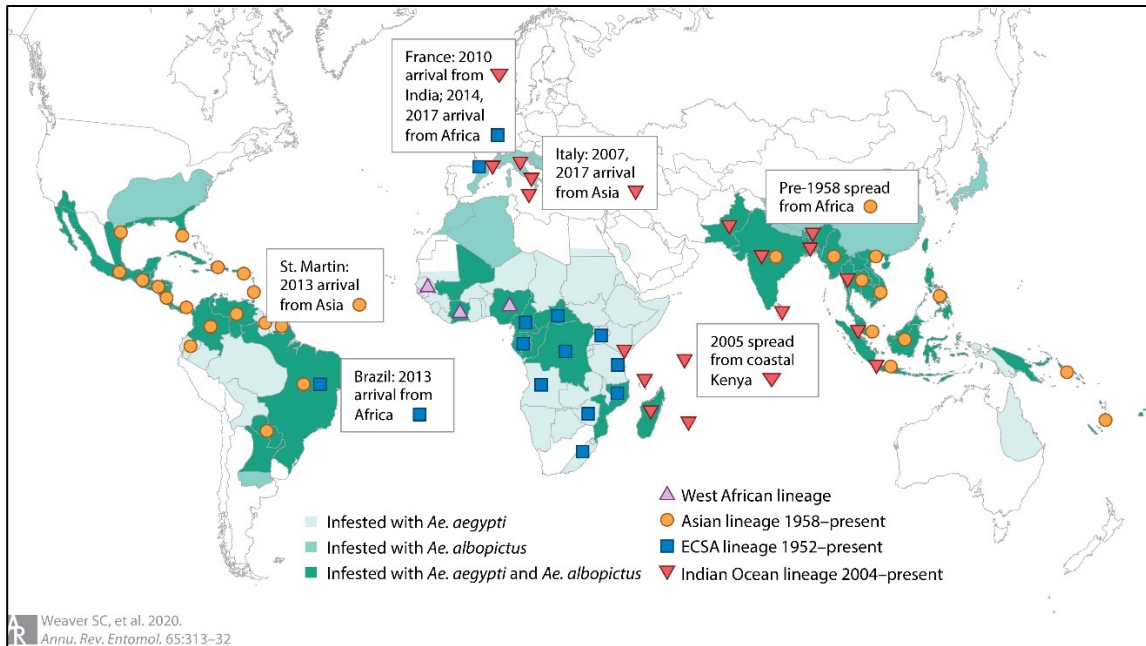
Les lignages Africains sont considérés comme ancestraux, principalement enzootiques, circulant dans les forêts d'Afrique sub-saharienne (Fig. 5). Le lignage Waf semble contraint dans sa répartition géographique et touche peu l'homme. A l'inverse le lignage ECSA est responsable de plusieurs épidémies de faible ampleur en Afrique centrale (Fourié et al. 2021, Nyamwaya et al. 2021). De plus le lignage ECSA a été importé au Brésil en 2013 où il co-circule avec le lignage As (Nunes et al. 2015, de Oliveira et al. 2021). A l'inverse des deux premiers lignages, le lignage As est associé majoritairement avec des cycles épidémiques urbains. Celui-ci aurait divergé du lignage ECSA il y a environ 150 ans et colonisé l'Inde et l'Asie du sud-Est (Volk et al. 2010). On pense que la souche Indienne aurait disparu à l'heure actuelle et que la souche du Sud-Est Asiatique serait encore en circulation (Arankalle et al. 2007). C'est cette souche qui se serait propagée dans les îles indopacifiques avant

d'être introduite dans les Caraïbes en 2013 (Lanciotti and Valadere 2014). Elle a par la suite atteint l'Amérique continentale et s'est depuis répandue en Amérique centrale, en Amérique du Sud et en Amérique du nord (Sahadeo et al. 2017). Un quatrième lignage, le lignage de l'Océan Indien (IOL) a émergé en 2004 depuis les zones côtières du Kenya vers les îles de l'Océan Indien (La Réunion, Madagascar, Comores etc.) puis le continent Asiatique (Powers and Logue 2007, Kariuki Njenga et al. 2008). Depuis 2005, il est la source de la majorité des cas des épidémies en Asie du Sud (Wimalasiri-Yapa et al. 2019).



**Fig. 4** Arbre phylogénétique de différents lignages et isolats de CHIKV

Arbre phylogénétique issu de séquences génomiques complètes du CHIKV disponibles dans la bibliothèque GenBank. D'après (Tsetsarkin et al. 2011b).



**Fig. 5 Répartition et apparition des lignages majeurs de CHIKV**

Carte montrant la distribution temporelle et géographique des lignages majeurs de CHIKV. D'après (Weaver et al. 2020)

## b. Différences de pathogénèses

Les différences de pathogénèse entre ces différents lignages n'ont pas été étudiées extensivement. Les quelques études qui ont tenté de comparer la pathogénèse des différents lignages *in vivo* sont pour l'instant parcellaires et contradictoires.

En 2015, une étude comparant la neuro-virulence de deux lignées (As et IOL) prélevées en Malaisie a révélé que lors d'injections dans un modèle murin, la souche asiatique, induisait une mortalité plus élevée et une up-régulation de gènes pro-apoptotiques. A l'inverse la souche IOL induisait une mortalité plus faible associée à une up-régulation de gènes anti-apoptotiques, anti-viraux et de protection du système nerveux central (Wei Chiam et al. 2015). Cependant, ces résultats sont contradictoires avec les travaux de (Teo et al. 2015) comparant la souche IOL de la Réunion et une souche Caraïbienne (issue du lignage As). Cette étude montre que la souris, la souche IOL était plus inflammatoire et causait plus de dommages physiologiques articulaires.

Dans le modèle simien (Macaques Rhésus), une étude similaire mesurant les différences de virulences entre les souches WAF et ECSA n'a toutefois montré aucune

différence majeure que ce soit au niveau de la virémie, du gonflement articulaire ou des observations histologiques (Chen et al. 2010).

Enfin une étude publiée en 2018 par Langsjoen et ses collaborateurs a eu pour objectif de comparer les virulences de l'ensemble des lignages connus (Langsjoen et al. 2018). Dans des modèles murins immuno-compromis de souris, l'infection de souris A129 mutées pour le récepteur de l'interféron de type I par les souches As, IOL, ECSA, WAf et Américaine de CHIKV a montré que la souche WAf était la plus létale, avec la virémie la plus haute au début de l'infection. A l'opposé la souche IOL était associée à une létalité et une virémie moindre mais engendrait un gonflement articulaire bien supérieur.

### **c. Adaptations Vectorielles**

Comme nous l'avons décrit précédemment, la transmission d'un pathogène par un moustique dépend de nombreux facteurs. La question de l'adaptation vectorielle des différents lignages de CHIKV a été posée lors des épidémies de 2005. Ainsi le cas de l'adaptation du lignage IOL à *Ae. albopictus* représente un cas d'école.

Jusqu'à l'épidémie de l'Océan indien de 2005, le principal vecteur épidémique de CHIKV était considéré comme étant *Ae. Aegypti*. Cependant, dans certains territoires touchés par cette épidémie les populations sauvages d'*Ae. Aegypti* étaient en déclin, comme par exemple à la Réunion où leur population a diminué de manière significative dans les environnements urbanisés (Bagny et al. 2009). Dans cette région, c'est l'espèce *Ae. albopictus* qui a vectorisé une part majeure des infections (Vazeille et al. 2007).

De façon intéressante, le séquençage de la souche circulante à la Réunion a déterminé que celle-ci avait acquis une mutation sur sa protéine d'enveloppe E1, la substitution E1-A226V (Schuffenecker et al. 2006). Il a été montré par la suite que cette mutation ponctuelle était associée à une propagation plus rapide du virus dans les organes secondaires du moustique *Ae. Albopictus* et ainsi est associée à une meilleure dissémination au cours du repas sanguin. Cette mutation est sans effet chez *Ae. aegypti* (Tsetsarkin et al. 2007). Cette même mutation était apparue en Asie, dans deux isolats indiens, de manière indépendante, suggérant une convergence évolutive (de Lamballerie et al. 2008). A l'inverse il a été montré que cette mutation était absente

dans les régions touchées par l'épidémie IOL où *Ae. aegypti* est dominant (Agarwal et al. 2016). Une question cependant s'est posée : Pourquoi la mutation E1-A226V n'est-elle pas apparue plus tôt dans les lignages As de CHIKV déjà en contact avec *Ae. albopictus* ? Il semblerait qu'une autre mutation E1-98A présente uniquement dans les lignages africains et IOL soit nécessaire à l'efficacité de E1-A226V (Tsetsarkin et al. 2011a). On peut donc supposer que l'absence de cette mutation E1-98A chez les lignages As est due à l'absence de pression évolutive. Néanmoins aucune réponse claire n'a été apportée à l'heure actuelle.

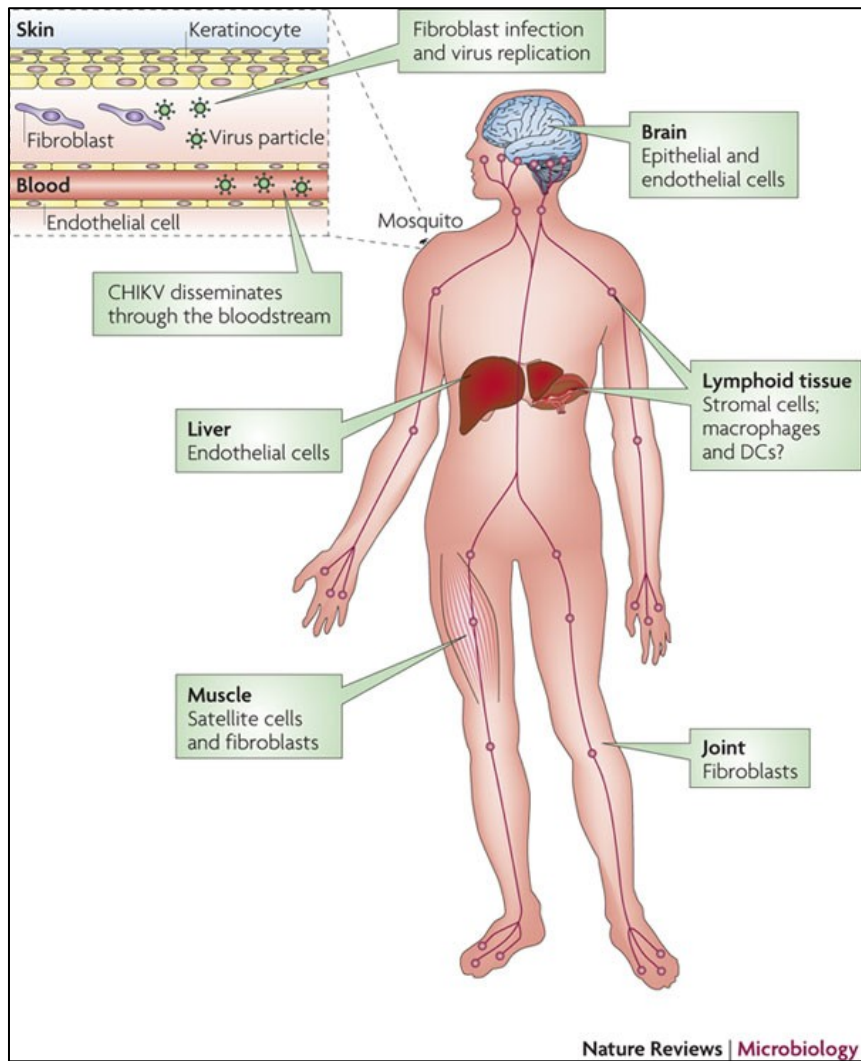
L'adaptation vectorielle de la souche As ne s'arrête pas à cette seule mutation ponctuelle. Ainsi, l'acquisition de la mutation L210Q sur la protéine d'enveloppe E2 (E2-L210Q), détectée dans des isolats circulant en 2009 dans la région de Kerala en Inde facilite l'infection de cellules intestinales chez *Ae. albopictus*, permettant à nouveau une dissémination plus efficace du CHIKV dans l'organisme du vecteur et une dissémination accrue à l'hôte vertébré (Niyas et al. 2010, Tsetsarkin and Weaver 2011). À nouveau cette mutation favorable pour l'infection d'*Ae. albopictus*, n'a pas d'effet sur l'infection de cellules humaines ou d'*Ae. Aegypti*.

Ces mutations déjà observées, permettent de supposer l'apparitions de nouvelles mutations au niveau du dimère E1-E2 qui pourraient renforcer d'avantage l'infectiosité des vecteurs. C'est la démonstration qu'on fait en 2014 Tsetsarkin *et al* en réalisant des mutations artificielles de ces deux protéines (Tsetsarkin et al. 2014).

## **1.4. Symptômes Cliniques**

### **a. Premières phases de l'infection chez l'homme et tropisme cellulaire**

Le virus est inoculé dans le compartiment cutané de l'hôte vertébré au cours du repas sanguin du vecteur moustique infecté. Délivré en même temps que le contenu des glandes salivaires, le virus se réplique tout d'abord sur le site d'inoculation avant de se répandre dans le système circulatoire (Fig. 6). Le tropisme de CHIKV est très large. In vitro, il est capable d'infecter une grande variété de lignées cellulaires ou de cellules primaires (Wikan et al. 2012, Roberts et al. 2017). Toutefois, il est apparu dans un premier temps que CHIKV ne se fixe et n'infecte pas ou peu les cellules



**Fig. 6 Dissémination du virus du chikungunya chez les vertébrés**

La transmission de CHIKV se produit à la suite d'une piqûre de moustique. Le CHIKV se réplique ensuite dans la peau, dans les fibroblastes, et se dissémine dans le foie, les muscles, les articulations, les tissus lymphoïdes (ganglions lymphatiques et rate) et le cerveau. Les cellules cibles sont indiquées pour chaque tissu. D'après (Schwartz and Albert 2010).

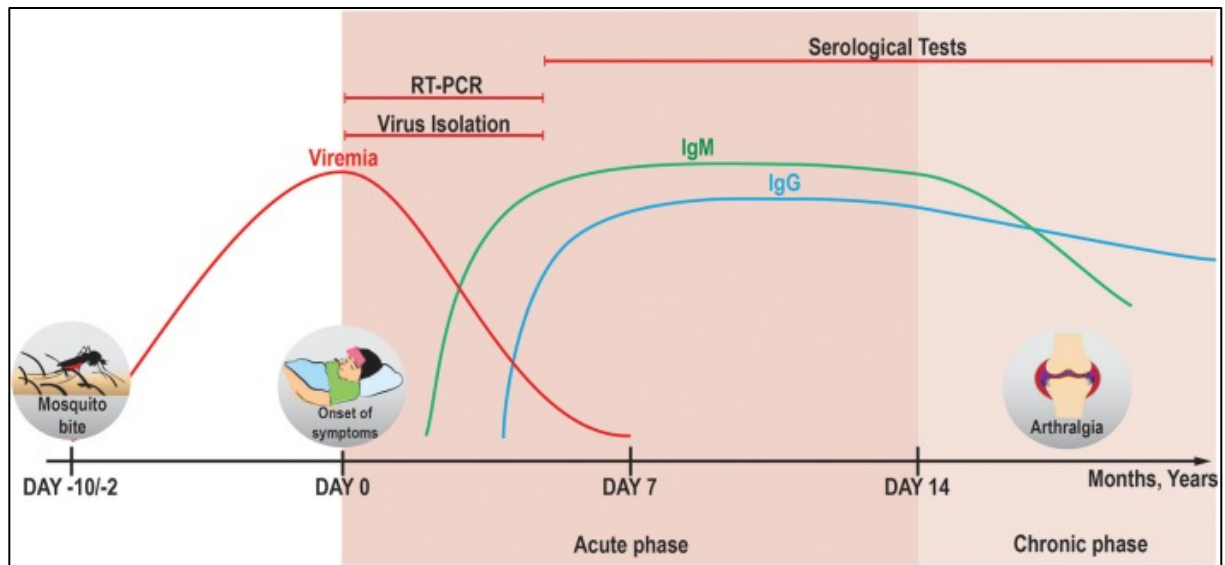
hématopoïétiques comme les lymphocytes primaires, les monocytes et les cellules dendritiques dérivées de monocytes primaires, ainsi que les lignées tumorales dérivées (Sourisseau et al. 2007). Néanmoins des données ont indiqué que les macrophages seraient susceptibles à l'infection (Sourisseau et al. 2007, Solignat et al. 2009). Ainsi dans le modèle actuel, les macrophages sont infectés dans les premières phases de l'infection, puis ces cellules agissent comme transporteurs en migrant vers les tissus périphériques. Cette fonction pourrait s'avérer clé dans la persistance chronique de la maladie au niveau articulaire (Her et al. 2010, Srivastava et al. 2020). Une prépublication récente a également montré que CHIKV, est capable d'infecter les

macrophages de manière plus efficace que d'autres alphavirus arthritogéniques. De plus les protéines d'enveloppe E1 et E2 y joueraient un rôle clé en contrecarrant les facteurs antiviraux des macrophages infectés (Yao et al. 2023b). Les modèles actuels supposent que la réplication de CHIKV se déroule initialement dans les fibroblastes et macrophages cutanés, conduisant à une virémie importante, permettant au CHIKV de se disséminer vers différents organes tels que le foie, les muscles, les articulations, la rate et le cerveau (Couderc et al. 2008).

## **b. Phase Aigue**

L'infection par CHIKV chez l'homme évolue en deux phases, une phase aigüe survenant entre 2 et 10 jours post infection, et chez certains individus, une phase chronique au-delà de 14 jours pouvant durer jusqu'à plusieurs années (Zaid et al. 2021) (Fig. 7).

Les symptômes cliniques de l'infection par CHIKV dans sa phase aigüe sont pour la plupart similaires à d'autres infections par des *Alphavirus* (comme le virus de la Rivière de Ross (RRV), ou le Virus de Sindbis (SINV)): douleurs musculaires et articulaires, fièvre, fatigue et nausées (Zaid et al. 2021). Cependant, le CHIKV induit ces symptômes avec une incidence plus importante chez les patients infectés. Ainsi, en zone épidémique, le CHIKV infecte entre 10 et 70% des individus et induit des symptômes cliniques dans 50 à 97% des cas (Yactayo et al. 2016). Dans de rares cas, des complications sont observées, telles qu'un syndrome de Guillain-Barré (Balavoine et al. 2017). Ces symptômes sont plus sévères sur des patients fragiles comme les nourrissons ou les personnes de plus de 65 ans. Il a également été montré que l'infection de nouveaux nés est associée avec le développement d'encéphalopathies et que la transmission peut avoir lieu de la mère à l'enfant (Gérardin et al. 2008). Ces cas infections semblent toutefois assez rares et sont associés à une infection périnatale dans la période intrapartum (Contopoulos-Ioannidis et al. 2018). Le CHIKV conduit rarement au décès. La majorité des cas de mortalités est répertoriée chez les plus de 65 ans, présentant des commorbidités cardiaques, neurologiques ou pulmonaires (Chua et al. 2010, Hoz et al. 2015). Dans cette population, la mortalité est cinq fois supérieure pour les individus de plus de 65 ans en comparaison avec les personnes de moins de 45 ans (Neto et al. 2019).



**Fig. 7 Evaluation des différentes phases de l'infection par CHIKV et méthodes de diagnostics.**

Dans la phase aiguë, la virémie peut persister jusqu'aux jours 5-7 post infection et l'ARN génomique du CHIKV peut être détecté par RT-PCR de manière fiable jusqu'au jour 7 post infection. Les anticorps IgM et IgG contre le CHIKV commencent à être produits respectivement aux jours 2 et 4 post infection. Des titres stables d'IgM peuvent être observés dans le sérum à partir du jour 6 jusqu'à environ 4 mois post infection, tandis que des niveaux soutenus d'IgG peuvent être présents pendant plus d'un an. Les anticorps contre le CHIKV peuvent être détectés par des tests immunologiques après le développement d'une réponse immunitaire humorale. D'après (Tanabe et al. 2018)

Lors de la phase aiguë, dans la plupart des cas, la clairance du virus a lieu une semaine post infection, principalement par l'action du système immunitaire inné. Celle-ci est organisée par l'action de différentes cytokines et chimiokines qui activent et recrutent les cellules immunitaires comme les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes natural killers, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> qui contrôlent l'infection virale (Tanabe et al. 2018). On observe en particulier une activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> au début de la phase aiguë, et un basculement vers les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> à 4 jours après l'apparition des symptômes (Wauquier et al. 2011). Le rôle de l'interféron de type 1 en particulier est prépondérant. Il a été montré que sur des souris déficientes dans cette réponse immunitaires développaient des formes graves, voire léthales de l'infection associée à une virémie incontrôlée (Couderc et al. 2008, Schilte et al. 2010).



## **c. Phase Chronique**

Chez certains individus, l'infection CHIKV conduit à une maladie articulaire chronique et invalidante qui distingue particulièrement le CHIKV des autres *Alphavirus*. Cette phase chronique peut s'étendre de plusieurs mois à plusieurs années. Elle est associée à plusieurs symptômes, comme la fatigue, des douleurs musculaires et articulaires et dans certains cas, au gonflement des articulations, des polyarthrites rhumatoïde et des spondylarthrites ankylosantes (Dupuis-Maguiraga et al. 2012). Cette persistance peut atteindre jusqu'à 75% des personnes infectées (Gérardin et al. 2011). Le modèle actuel de compréhension de ces symptômes repose sur une réponse excessive du système immunitaire inné. En effet il a été observé à partir de modèles murins qu'une infiltration de macrophages dans les tissus musculaires ou synoviaux induit une inflammation locale (Gardner et al. 2010). De plus, il a été montré que l'infection de synoviocytes par CHIKV induisait la sécrétion de facteurs tels que RANKL, IL-6, IL-8 and MCP-1 permettant l'attraction articulaire et la différenciation de macrophages en ostéoclastes (Phuklia et al. 2013). Le rôle pivot des ostéoclastes dans les arthrites chroniques ayant été démontré on peut supposer que l'interaction entre synoviocytes et macrophages est importante dans le développement chronique des atteintes articulaires dans l'infection CHIKV (Hirayama et al. 2002). Certaines interrogations demeurent cependant. Si les macrophages semblent au cœur de la pathogenèse chronique du CHIKV, le rôle de la réplication active du virus dans ces cellules ou d'une immunopathologie différente induite en amont par l'infection reste mal compris. En effet, les macrophages humains prélevés sur les sites d'inflammation articulaire pendant les phases chroniques de l'infection contiennent de l'ARN viral (Labadie et al. 2010). Ces ARNs viraux persistant sont également détectés dans les tissus musculaires ou les infiltrations articulaires, malgré une virémie globale très faible et sans que l'on détecte aucune particule virale infectieuse (Hoarau et al. 2010, Young et al. 2019).

### **1.5. Impact sur la santé publique et l'économie.**

L'expansion rapide de CHIKV à travers le monde entre 2004 et 2013 a représenté un défi considérable pour tous les systèmes de santé confrontés à ces épidémies, notamment en raison du caractère fortement invalidant de la pathologie associée et

de la nécessité de prise en charge des malades. De plus le nombre important de cas chroniques implique des conséquences économiques sur le moyen et long terme, bien après le pic épidémique. Ces phénomènes n'ont pas les mêmes impacts suivant le contexte économique et les populations. C'est pour cela que des efforts internationaux sont effectués pour quantifier le pouvoir de nuisance à large échelle de CHIKF notamment dans le sud global.

Les effets à long terme du CHIKV sur les populations ont été évalués par l'Organisation Mondiale de la Santé à l'aide de l'indicateur DALY, ou « Disability-Adjusted Life Year » (espérance de vie corrigée de l'incapacité (EVCI)) (Murray 1994). Cet indicateur, permet à l'échelle d'une population, de prendre en compte non seulement les années de vies perdues à cause d'un décès prématuré, mais également l'équivalent en année en pleine santé perdue à cause d'une maladie afin de prioriser les décisions des systèmes de santé. Entre 2006 et 2007 lors de l'épidémie causée par le lignage IOL sur le sous-continent Indien ayant conduit à l'infection de 1.4 millions d'indiens, l'impact sur la santé des personnes infectées dans cette province a été estimé entre 1300 et 1397 DALYs pour 2006 uniquement (Kumar et al. 2008, PAHO/WHO 2011) (Krishnamoorthy et al. 2009, Mavalankar et al. 2010). En Amérique du sud, où le CHIKV s'est propagé dans 33 pays, entre 2013 et 2015, causant 1,7 millions de cas identifiés et 252 décès (Cibrelus et al. 2015). la Colombie est un des pays les plus touchés du continent (49% des cas d'infection) (PAHO/WHO 2022). Dans cet état, la perte d'espérance de vie en bonne santé a été estimée à 40,44 DALYs pour 100 000 habitants soit 18 966 DALYs au total. Les cas Indiens et Sud-Américains illustrent les problématiques de gestion globale de CHIKV où les biais socioéconomiques, comme l'accès à l'eau et le traitement des déchets qui agissent comme facteur de risque supplémentaires (Oviedo-Pastrana et al. 2018).

A l'inverse, le cas de l'île de la Réunion est particulièrement intéressant, étant un territoire rattaché à un pays du nord, confronté à l'épidémie tropicale dans un contexte insulaire. En 2005, entre avril et juin, 12 400 cas sont identifiés par la Direction régionale des Affaires sanitaires et sociales (DRASS) dans une population totale de 784 000 habitants soit 1,5 % de la population. Un deuxième pic a lieu entre décembre 2005 et février 2006, avec une multiplication par dix du nombre de cas passant à 186 000, soit 23,7% de la population. En Mars 2006, 236 000 personnes était infectées soit 30% de la population (Devaux 2012). L'ampleur de cette épidémie a pris de court

les systèmes de santé, avec une multiplication des besoins d'hospitalisation et de visites médicales. Le caractère invalidant de la maladie a eu un impact majeur sur l'organisation des systèmes de santé, touchant une partie du personnel de santé et augmentant d'autant plus la charge du reste du personnel (Peton Klein 2006). Le coût total de l'épidémie a été estimé à 43,9 millions d'euros dont 60% sont attribuables aux dépenses médicales directes (consultations, traitement, hospitalisation) (Soumahoro et al. 2011). Sur le moyen terme il a été montré que 58,3% des patients présentaient encore des symptômes 1 an après l'infection. La perte en espérance de vie a été évaluée de 55 000 DALYs pendant les 5 ans qui ont suivi l'infection. Cette perte a touché la population active à 55,5% (20-60 ans) et elle est associée à 86% aux symptômes de la phase chronique (Yaseen et al. 2012). Ces exemples illustrent le fait que la lutte contre CHIKV et les autres arbovirus a tout intérêt à prendre en compte le développement des infrastructures sanitaires et civiles pour être efficace dans ces objectifs. La coopération internationale vers des objectifs communs semble en être le principal moyen.

## **1.6. Perspectives thérapeutiques : vaccin, traitement ?**

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'infection par CHIKV est un fardeau considérable pour les individus et les communautés touchées. Cependant à l'heure actuelle, le traitement de cette infection se limite à celui des symptômes avec la prise d'antalgiques pour diminuer fièvres et douleurs. Nous allons donc aborder les perspectives de développement de traitements et vaccins, qui pourraient voir le jour dans un avenir que nous souhaitons proche.

### **a. Modèles Animaux**

L'étude de la pathogénèse et le développement de traitements efficaces est dépendant de la mise en place de modèles animaux adaptés. Le cas de CHIKV ne fait pas exception à la règle et depuis plusieurs années, le développement de ces modèles a été au cœur des efforts de la recherche appliquée.

Les premiers modèles développés ont été des modèles murins. Les souris juvéniles, ont été rapidement utilisées car leur absence de système immunitaire développé induit une infection rapide et létale (Ross 1956). Par conséquent, les souris de moins de 6

jours peuvent développer une paralysie flasque mortelle là où des souris de plus de 9 jours se remettent de l'infection (Couderc et al. 2008). L'utilisation de souris adultes C57BL/6 a permis la mise en place d'un modèle adapté à l'étude des symptômes arthritiques chez l'homme. En effet l'injection du virus au niveau des pattes induit une infiltration, de l'inflammation et des gonflements (Couderc et al. 2008). Enfin l'infection de souris déficientes pour la voie de l'interféron de type I (IFN I), provoque une infection sévère et létale, similaire à l'infection de souris juvéniles (Couderc et al. 2008). Les souris A129 IFNAR<sup>-/-</sup>, déficientes pour le récepteur à l'interféron de type I sont particulièrement utiles car elles reproduisent de manière efficace les symptômes les plus graves (polyarthralgie et encéphalites) que l'on peut observer chez l'homme (Gardner et al. 2012). De plus, ce modèle étant capable de mettre en place une réponse immunitaire via les lymphocytes B et T, il est adapté aux tests nécessaires pour mesurer l'efficacité d'un vaccin ou d'anticorps neutralisants (Partidos et al. 2011).

L'alternative à ces modèles murins sont les modèles de primates non humains (NHPs) qui sont à certains égards plus pertinents. D'une part ces modèles ont l'avantage d'être plus proches immunologiquement parlant de l'homme, ce qui a été illustré dans le cas d'autres infections (Verrier et al. 2002, Vierboom et al. 2007). D'autre part nos modèles actuels tendent à montrer que les primates constituent le réservoir naturel de CHIKV en Afrique et en Asie (Broeckel et al. 2015). Les macaques Rhésus sont en particulier utilisés pour étudier la pathogénèse virale. En 2010, Karine Labadie *et al.* ont montré que les symptômes développés sont directement corrélés avec la dose d'infection initiale. Ainsi il a été observé qu'à faible dose ( $10^1$  PFU) l'infection était asymptomatique, à dose intermédiaire ( $10^2$ – $10^6$  PFU) les animaux développaient de la fièvre et des éruptions cutanées, et enfin à forte dose ( $>10^7$  PFU) l'infection était parfois létale avec un gonflement des articulations et des signes de méningoencéphalites (Labadie et al. 2010). Malgré leur contribution considérable notamment dans l'identification des tissus infectés ainsi que la cinétique de propagation virale, l'utilisation des modèles NHP reste limitée. Leur caractère onéreux de même que les exigences éthiques qui y sont liées font des modèles NHPs un support complexe de la recherche sur les arbovirus.

## **b. Vaccins**

Le rôle des anticorps neutralisant est prépondérant dans la réponse immunitaire adaptative contre CHIKV et la protection à moyen terme contre celui-ci. Des études épidémiologiques et sérologiques réalisées au Cambodge ont montré que la neutralisation par anticorps protégeait à 100% des formes symptomatiques de l'infection et cette protection s'étend à l'ensemble des lignages (ECSA, WAF, AS, IOL) (Galatas et al. 2016, Auerswald et al. 2018). Cette production d'anticorps neutralisants a été le focus de nombreux projets de développement de vaccins afin de permettre une réponse efficace contre l'infection par CHIKV à long terme. Voici les différentes stratégies de vaccinations mises en place ces dernières années et leurs principes :

### **Vaccin par virus inactivé**

Les vaccins par virus inactivés sont constitués de particules virales complètes inactivées par un traitement physico-chimique. C'est par cette approche que le premier vaccin a été développé par l'US Army en 1967. Ce vaccin était constitué de virions inactivés par formaldéhyde et avait présenté une efficacité sur modèles NHPs avec différentes souches (Harrison et al. 1967). Cependant malgré des résultats positifs chez l'homme et sans effets secondaires notables, ce vaccin a été abandonné après 1971 (Harrison et al. 1971). Cette piste a été reprise récemment par l'entreprise Bharat Biotech International qui a développé le vaccin BBV87. Celui-ci, après des résultats concluants sur l'animal a progressé jusqu'en phase II/III dans un essai clinique réalisé en 2021 en Amérique du Sud et en Thaïlande (Kumar et al. 2012, International Vaccine Institute 2022).

### **Vaccin par virus atténué**

Les vaccins par virus atténués sont eux composés de particules virales dont la souche a été sélectionnée ou modifiée pour induire une virulence beaucoup plus faible que la souche originale. C'est cette approche que l'US Army a sélectionnée en 1986 par la sélection de la souche CHIKV 181/clone 25 (Levitt et al. 1986). Cette souche a montré une bonne immunisation chez les modèles murins, et les essais sur l'homme ont présenté peu d'effets secondaires (Edelman et al. 2000). Néanmoins la virulence amoindrie de cette souche n'étant dépendante que d'une mutation de deux acides aminés de la protéine d'enveloppe E2, l'utilisation de cette souche a été interrompue par crainte d'une réversion (Gorchakov et al. 2012, Roques et al. 2017). Une autre

approche a été de générer par ingénierie génétique une souche de CHIKV dont la protéine non structurale nsP3 a subi des délétions partielles. Cette souche  $\Delta 5nsP3$  a été testée de manière concluante sur modèles murins et NHPs (Hallengård et al. 2014, Roques et al. 2017). Cette souche a été utilisée dans la formulation du vaccin VAL-181388 par Moderna Therapeutics, et celui-ci a récemment passé une phase I d'essais clinique (ModernaTX, Inc. 2020).

### **Vaccin par vecteur viral**

Les vaccins par vecteur viraux sont basés sur la conception de particules virales chimériques, qui par exemple possèdent les protéines structurales d'une souche virale, et le génome d'un autre. L'avantage de ce type de vaccin est qu'il permet de cibler précisément le type de cellules infectées par ces particules virales et d'induire une réponse cellulaire et humorale (Dempsey and Bowie 2015). Le vaccin le plus avancé de ce type est le vaccin MV-CHIK qui possède l'ARN subgénomique complet de CHIKV et la structure du virus de la rougeole. Cette souche a montré son efficacité vaccinale sur modèles NHPs avec un haut titre d'anticorps neutralisants et une protection contre la virémie, la fièvre et l'inflammation (Rossi et al. 2019). Cette souche a été poussée jusqu'en phase II d'essais cliniques avec une forte induction d'anticorps neutralisants et peu d'effets secondaires (Reisinger et al. 2019).

### **Vaccin par particule pseudo-virale**

Ce type de vaccin, est basé sur la synthèse de pseudovirions (VLPs) qui résultent de l'assemblage de protéines de capsid mais sans génome viral. Ces vaccins ont pour avantage de présenter une particule virale avec la même structure et les mêmes épitopes que le virus ciblé sans réplication. L'un de ces vaccins se nomme VRC-CHKVLP059-00-VP. Il est composé de VLPs produits en cellules hépatiques embryonnaires à partir d'un plasmide codant pour les 5 protéines structurales d'une souche ouest africaine de CHIKV. En modèles NHPs les résultats ont montré une haute immunogénicité, et la synthèse d'anticorps neutralisants efficaces contre tous les lignages (Akahata et al. 2010). Ce virus a été poussé jusqu'en phase II et a montré une efficacité 72 semaines après la vaccination (Chen et al. 2020).

### **Vaccin à ADN**

Les vaccins à ADN sont basés sur la capacité de certaines cellules à intégrer des molécules d'ADN injectées. Ces molécules vont migrer vers le noyau et être transcrites

puis traduites. Le principe est donc de dessiner des plasmides codant pour des antigènes choisis qui vont ensuite être présentés par le complexe d'histocompatibilité de type I et II et initier la réponse immunitaire (Dempsey and Bowie 2015). L'un de ces vaccins, nommé DREP est composé d'un plasmide codant uniquement pour les protéines d'enveloppes de CHIKV. Ce vaccin a montré son efficacité sur modèle NHPs et murins (Hallengård et al. 2014, Roques et al. 2017).

### **Vaccin à ARNm**

Les vaccins à ARNm suivent le même principe que les vaccins à ADN. La principale différence est que la construction injectée est sous la forme d'ARN qui va être directement traduit pour la synthèse des antigènes décidés. Un vaccin développé par Moderna Therapeutics, le VAL-181388, a montré des résultats précliniques encourageant et un essai clinique de phase I a été réalisé en 2019 (Shaw et al. 2019).

### **Vaccin sous unitaire**

Les vaccins sous unitaires sont d'origine protéique et composé de fragments protéiques purifiés du pathogène ciblé. Ces vaccins ont l'avantage de ne pas contenir de matériel génétique mais ils nécessitent l'utilisation d'adjuvants pour déclencher la réponse immunitaire. Cette approche a été mobilisée par plusieurs groupes de recherches en générant des sous unités des protéines d'enveloppe virale E1 et E2 (Metz et al. 2011, Kumar et al. 2012). Cependant il apparait que cette approche est moins immunogénique que l'utilisation de particules virales (Metz et al. 2013). Prises dans leur ensemble ces données montrent que plusieurs candidats à la vaccination sont dans des étapes avancées de développement clinique. On peut ainsi nourrir l'espoir que dans les années à venir une première campagne vaccination à grande échelle soit possible.

## **c. Traitements antiviraux**

Dans le cas du CHIKV, le criblage à haut débit (HTS) des chimiothèques ou le design artificiel d'antiviraux par génération procédurale à partir de données cristallographiques s'appuie sur la lecture d'effets cytopathiques après traitement et infection virale. Cette méthode permet de passer en revue très rapidement, une quantité de molécules pouvant atteindre plusieurs milliers de composants en considérant à la fois toutes les étapes du cycle infectieux, l'action éventuelle sur les

facteurs viraux, ou à l'inverse sur les cofacteurs cellulaires proviraux ou antiviraux. La recherche de molécules antivirales contre CHIKV a d'ores et déjà déterminé plusieurs dizaines de pistes thérapeutiques. Toutefois à l'heure actuelle aucune molécule n'a passé les phases d'essais cliniques nécessaires à leur utilisation normalisée. Nous nous contenterons ici de prendre quelques exemples pour illustrer la diversité de ces approches.

### **Inhibiteurs des étapes précoces de l'infection**

Les étapes d'adhésion cellulaire, de fusion membranaire, d'entrée cellulaire et décapsidation sont critiques dans l'établissement de l'infection et sont donc des cibles thérapeutiques de choix contre lesquelles plusieurs composés sont actifs. L'arbidol (ou umifenomevir) est un traitement licencié contre les infections respiratoires comme influenza virus (InV) par exemple. En 2011, l'équipe de Xavier Lamballerie a montré que ce composé agissait sur l'entrée virale de CHIKV dans plusieurs lignées cellulaires. Ce traitement induit toutefois l'acquisition d'une mutation compensatoire sur la protéine d'enveloppe virale E2 permettant un échappement à ce traitement (Delogu et al. 2011). Un autre composé, la suramine, licencié pour les traitements contre la trypanosomiase a montré son efficacité dans plusieurs études (Ho et al. 2015, Henß et al. 2016). Une analyse récente plus approfondie de son fonctionnement a montré que ce traitement empêchait les étapes de fusions de l'enveloppe virale et de la membrane plasmique via les glycoprotéines virales d'enveloppe (Albulescu et al. 2020). Cependant la même étude a pu identifier ici également l'apparition de certaines mutations ponctuelles permettant la résistance du virus. Ainsi à l'heure actuelle, la suramine ne fait partie d'aucun essai clinique à notre connaissance. Enfin le cas le plus emblématique est celui de la chloroquine. Cette molécule, utilisée comme traitement antipaludique, a par le passé montré son efficacité dans le cas d'autres infections virales (Sindbis (SINV), InV, herpes simplex (HSV)) (Inglot 1969). Elle a notamment pour effet d'inhiber la fusion membranaire chez le virus de Sindbis (SINV) en inhibant l'acidification du pH endosomal nécessaire à la fusion des membranes virales et cellulaires (Cassell et al. 1984). De plus son action anti-inflammatoire est efficace chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Un premier essai clinique réalisé en 1984 sur 10 patients montrait une diminution des symptômes de CHIKF (Brighton 1984). Enfin, les essais ultérieurs n'ont pas démontré d'efficacité particulière de ce traitement (de Lamballerie et al. 2008, Thiberville et al. 2013, Chopra et al. 2014).



Présentement, le ciblage des étapes précoces du cycle viral reste une stratégie encore peu étayée.

### **Protéines non structurales**

Les protéines non structurales (nsPs) sont les enzymes virales essentielles à la réplication. Elles interviennent à toutes les étapes intracellulaires du cycle infectieux. Leur rôle individuel est détaillé dans la section 5 de ce chapitre (Chapitre 1.5). Elles constituent les cibles thérapeutiques les plus fréquemment envisagées pour le développement de composés ciblant les protéines du CHIKV. Ces approches ont notamment permis le développement d'inhibiteurs de la protéine nsP1 et de son activité de coiffage des ARNs viraux. L'un des exemples les plus parlants sont les composés 3-aryl-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7(6H)-1, ou série MADTPs. Ces composés ont été identifiés à partir de chimiothèques sur la base d'un double criblage de viabilité cellulaire et de réplication virale pour CHIKV, VEEV et SINV (Gigante et al. 2014). Il a été par la suite possible d'identifier par génétique inverse que ces composés ciblent l'activité guanylyltransférase (GTase) de la protéine nsP1 ce qui inhibe le coiffage des ARNs viraux chez VEEV. Ainsi donc la réplication virale chez CHIKV et VEEV est considérablement impactée. Cependant l'apparition d'une mutation ponctuelle de résistances au niveau d'un résidu proline en position 34 de nsP1 réduit significativement l'effet de ces composés chez CHIKV (Delang et al. 2016). De manière surprenante le développement d'analogues à partir de ces premiers composés a permis d'identifier que chez VEEV l'inhibition de l'activité guanylyl-transférase de nsP1 pouvait être décorrélée d'une inhibition de l'infection et qui remet partiellement en question le modèle d'action de ces inhibiteurs (Gigante et al. 2017). Malgré cela leur efficacité sur plusieurs isolats de CHIKV font des composés MADTPs des candidats pertinents pour le développement de traitement anti CHIKV (Gómez-SanJuan et al. 2018). Ces molécules ont fait l'objet d'une partie des travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse (Chapitre 2).

La protéine nsP2 a également concentré beaucoup d'efforts dans l'identification d'antiviraux. Le bénéfice du ciblage de cette protéine est double. Outre son rôle dans la réplication en tant qu'hélicase virale, elle inhibe la réponse antivirale cellulaire ce qui fait de nsP2 un acteur clé de la réplication virale (Fros et al. 2010). C'est ainsi qu'en 2013, Bassetto et ses collaborateurs ont identifié une molécule antivirale à partir de la

structure 3D de nsP2 via analyse *in silico*, le composé 25 (Bassetto et al. 2013). Des études ultérieures à partir d'analogues de ce composé ont permis de trouver des molécules plus efficaces agissant sur deux différents sites d'action diminuant de la sorte le risque d'apparition de mutation de résistance (Das et al. 2016, Tardugno et al. 2018).

Enfin la protéine nsP4 principalement connue comme l'ARN polymérase ARN dépendante virale est elle aussi une cible de choix pour inhiber la réplication virale. A titre d'exemple, le Sofosbuvir utilisé pour le traitement de l'Hépatite C, et capable d'inhiber la réplifications des *Flavivirus* via l'inhibition de la polymérase virale (Ferreira et al. 2017) interagit avec un domaine de la polymérase nsP4 suffisamment conservé chez CHIKV et présente une efficacité contre ce virus (Ferreira et al. 2019). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* sur modèles murins, qui ont montré une efficacité nette sur la pathogénèse de la souris adulte et favorise la survie chez les souris nouveau-nées.

### **Enzymes cellulaires**

Le ciblage de cofacteurs cellulaires de la réplication virale constitue une approche thérapeutique communément admise dans le traitement des infections virales. En voici quelques exemples appliqués à l'infection CHIKV. La furine qui est une hydrolase cellulaire, est nécessaire à l'infection de CHIKV pour la maturation de la poly-protéine structurale (Ozden et al. 2008). L'utilisation de l'inhibiteur de furine, decanoyl-RVKR-chloromethyl ketone (dec-RVKR-chmk) empêche la maturation des poly-protéines d'enveloppe et diminue l'infection dans les myoblastes (Ozden et al. 2008). Le ciblage des kinases cellulaires constitue également une approche couramment envisagée dans la lutte contre l'infection CHIKV. Les kinases de la famille de Src, par exemple, sont des protéines essentielles à la réplication du CHIKV. L'utilisation d'inhibiteurs de ces protéines, comme le Dasatinib, diminue l'infection sur les fibroblastes humains (Broeckel et al. 2015).

Bien qu'un grand nombre de candidats antiviraux aient montré des résultats prometteurs *in vitro*, la transposition *in vivo* puis en essais cliniques représentent souvent des étapes hautement sélectives. On peut supposer que la diversité des approches dans les ciblage antiviraux (Indicateurs choisis, lignée cellulaire etc.) constitue un obstacle supplémentaire à la transposition de ces résultats en traitements

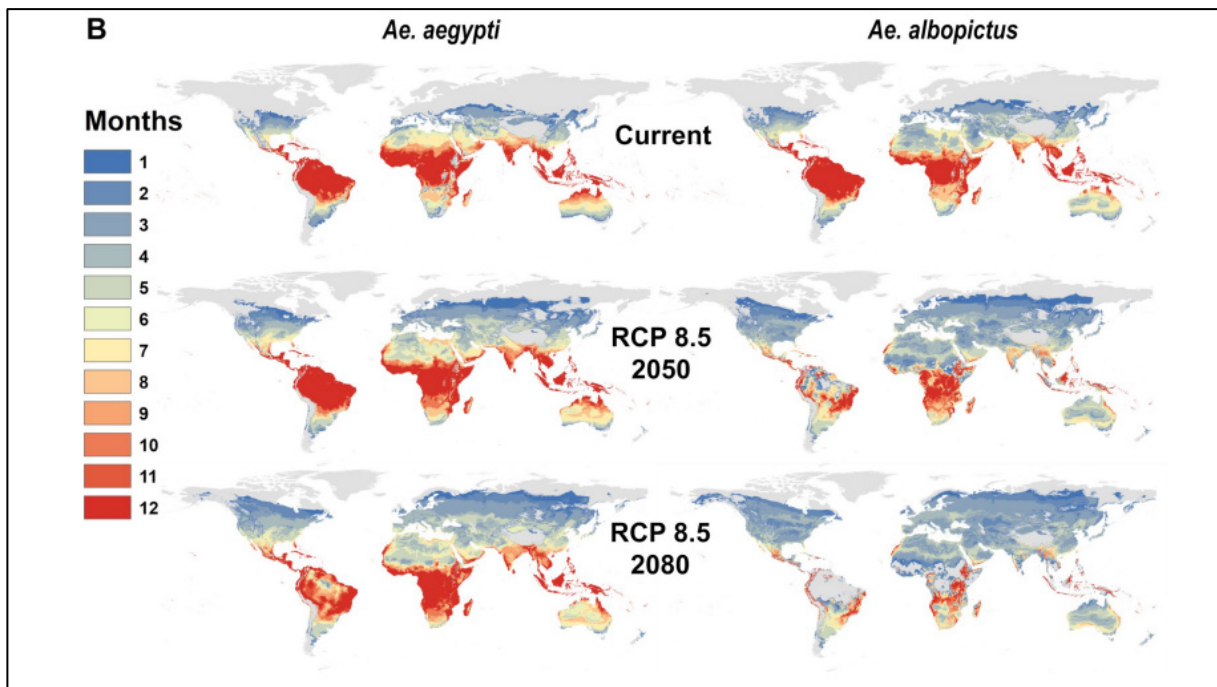
médicaux. Ainsi nous sommes encore loin de l'obtention d'un traitement antiviral efficace anti CHIKV et plus encore de l'élaboration de traitements anti-arbovirus de manière générale.

## 1.7. Evolutions futures

Comme mentionné précédemment, l'histoire épidémiologique du CHIKV montre qu'il s'agit d'une menace réémergence qui, à échéance régulière, est la cause d'épidémies de moyenne et grande échelle. Bien que les épisodes massifs datent d'une décennie, il est nécessaire d'anticiper les nouveaux risques épidémiques, et d'évaluer les capacités actuelles de lutter contre celles-ci. Le CHIKV, comme tous les virus à ARN, a un taux de substitution dans son génome de  $10^{-8}$  à  $10^{-6}$  par nucléotide par infection cellulaire (Sanjuán and Domingo-Calap 2016). Cette capacité à évoluer pour s'adapter à de nouveaux vecteurs a déjà été démontrée dans le passé (Tsetsarkin et al. 2007, 2016) et présente un avantage favorisant une meilleure dissémination et une virulence plus importante (Coffey et al. 2011). La circulation actuelle de CHIKV à travers le monde rend de plus en plus probable l'apparition de nouvelles souches présentant des virulences ou des capacités de dissémination supérieures aux souches historiques.

L'évolution climatique à venir est également susceptible de favoriser la propagation du CHIKV en bouleversant la répartition géographique de ses vecteurs (*Ae. Aegypti* et *Ae. albopictus*) qui occupent des niches écologiques différentes avec des températures optimales de transmissions virale comprises entre 29°C et 26°C (Mordecai et al. 2017). Ces modifications pourraient augmenter les risques de transmission de CHIKV dans les pays méditerranéens d'ici la fin du siècle (Fischer and Staples 2014). D'ici 2050, Ryan et al, prédisent que les augmentations de températures pourraient permettre une transmission par *Ae aegypti* toute l'année dans les régions les plus chaudes et augmenter la période de transmission de deux mois en région tempérées (Ryan et al. 2019) (Fig. 8). Le risque d'infection par *Ae albopictus* serait étendu de manière similaire à des latitudes plus froides comme le nord de l'Eurasie et l'Amérique du nord. Ainsi toutes les données climatiques tendent à montrer que la présence des principaux vecteurs de CHIKV va s'étendre à travers le globe. De plus, cette nouvelle répartition s'associe aux risques de mutations potentielles permettant une transmission plus efficace par *Ae. Albopictus* (Tsetsarkin et al. 2014).

Tous ces éléments associés à l'absence de traitements ou de vaccins, nécessitent de maintenir les efforts de lutte contre CHIKV et d'étude de sa biologie.



**Fig. 8** Carte de la prédiction des zones à risque de transmission virale par *Ae. Aegypti* et *Ae. Albopictus* suivant les trajectoires climatiques d'ici 2080.

Cartes de l'adéquation mensuelle basée sur un seuil de température correspondant à la probabilité de transmission par *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* pour les températures mensuelles moyennes prévues dans le climat actuel et les scénarios futurs pour 2050 et 2080 selon le scénario RCP 8.5 HadGEM2-ES. Source (Ryan et al. 2019).

## 2. Taxonomie et classifications

### 2.1. Virus à ARN positif

L'ARN est une molécule centrale au développement de la vie telle que nous la connaissons, pouvant à la fois être le support de l'information génétique et posséder des activités enzymatiques. Plusieurs modèles d'origine du vivant, dont la théorie du « Monde de l'ARN » défendue par Eugene Koonin (Koonin et al. 2006), estiment que l'ARN a précédé l'apparition de l'ADN en tant que support génétique. Suivant cette théorie, les virus à ARN aurait co-émergés avec les premières cellules de la soupe primordiale inorganique. En tout cas, on peut penser que les virus à ARN sont présents sur terre depuis les origines de la vie il y a plusieurs milliards d'années.

Les virus à ARN se différencient selon trois catégories en fonction de la structure de leurs génomes : simple-brin positif (ARN(+)), simple-brin négatif (ARN(-)), ou double brins (ARNdb). L'hypothèse de l'émergence de ces trois groupes serait que les virus ARN(+) sont à l'origine des virus ARNdb eux même ancêtres des virus ARN(-) (Wolf et al. 2018). En effets ces deux dernières espèces sont dépendantes d'une machinerie de réplication virale devant être empaquetée avec leurs génomes. Les virus ARN(+) sont, eux, capables de détourner les fonctions cellulaires de par leur ressemblance avec les ARN messagers (ARNm) cellulaires. Ainsi le génome viral peut être directement traduit en protéines virales.

Cependant, pour la réplication du génome ARN(+) un brin complémentaire ARN(-) est nécessaire. Celui-ci est synthétisé par une ARN polymérase virale ARN dépendante (RdRp). Cette synthèse amène à la formation d'un intermédiaire ARNdb qui est un trait commun à tous les virus ARN(+).

Les virus ARN(+) sont l'un des groupes de virus les plus divers. Ils peuvent infecter toutes les formes de vies connues. La classification des différentes souches virales est un exercice difficile de par leur évolution très rapide. Les travaux du Comité international de taxonomie des virus (ICTV) font autorité en la matière et forment la classification officielle des différentes souches depuis 1975. Cette taxonomie, a été établie en prenant en compte les caractéristiques morphologiques des particules

virales et leur virulence *in vivo* et *in vitro*. Le consensus actuel divise ce groupe en trois phyla : *Kitrinoviricota*, *Lenarviricota* et *Pisuviricota*.

Toutefois les avancées techniques en termes de séquençage et d'imagerie cellulaire ouvrent la voie à des classifications alternatives. L'analyse et l'alignement des séquences des gènes codants pour les RdRp virales, a ouvert une nouvelle division des différentes espèces (Koonin 1991). Dès lors, on peut les diviser en trois super-familles :

- La super-famille des picornavirus-like qui comprend les *Bymovirus*, *Comovirus*, *Nepovirus*, *Nodavirus*, *Picornavirus*, *Potyvirus* et *Sobemovirus*.
- La super-famille des *Flavivirus*-like comprenant les *Carmovirus*, *Dianthovirus*, *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Statovirus* et les *Tombusvirus*.
- La super-famille des alphavirus-like qui inclue les alphavirus, *Carlavirus*, *Furovirus*, *Hordeivirus*, *Potexvirus*, *Rubivirus*, *Tobravirus*, *Tricornavirus*, *Tymovirus*.

En analysant ces trois superfamilles la plus vaste est celle des *Picornavirus*-like, ce qui suggère que celle-ci est antérieure aux deux autres (Koonin et al. 2008).

## 2.2. Togaviridae-Alphavirus

La famille des *Togaviridae*, est définie par les caractères génétiques et morphologiques des virus qui y appartiennent (Chen et al. 2018b). Ses membres, produisent des virions enveloppés et sphériques d'à peu près 70 nm de diamètre. Leur génome est composé d'un ARN(+), non segmenté dont la taille varie entre 10 et 12 kb. A l'heure actuelle cette famille ne comprend qu'un seul génus, celui des *Alphavirus*.

Les Alphavirus, qui comptent plus de 30 espèces, sont remarquables dans leur capacité à infecter un large panel d'hôtes différents. On trouve notamment dans ce génus, l'Alphavirus des Salmonidés (SAV) capable d'infecter truites et saumons et causant des pertes importantes dans les élevages d'aquacultures (Jansen et al. 2017). Trois *Alphavirus*, infectent les équidés le virus de l'encéphalomyélite orientale (EEEV), de l'encéphalomyélite occidentale (WEEV), et de l'encéphalomyélite vénézuélienne (VEEV). L'infection par ces virus est fatale dans un très grand nombre de cas et induit des séquelles neurologiques chez les chevaux touchés (Aréchiga-Ceballos and Aguilar-Setién 2015). Enfin, parmi les Alphavirus, le chikungunya a été dans le passé

récent celui ayant eu le plus large impact sur la santé humaine à l'échelle mondiale via les épidémies passées. Cependant il est primordial de maintenir une surveillance globale sur l'émergence, d'autres *Alphavirus* à l'image du virus mayaro (MAYV) en Amérique latine (Ganjian and Riviere-Cinamond 2020).

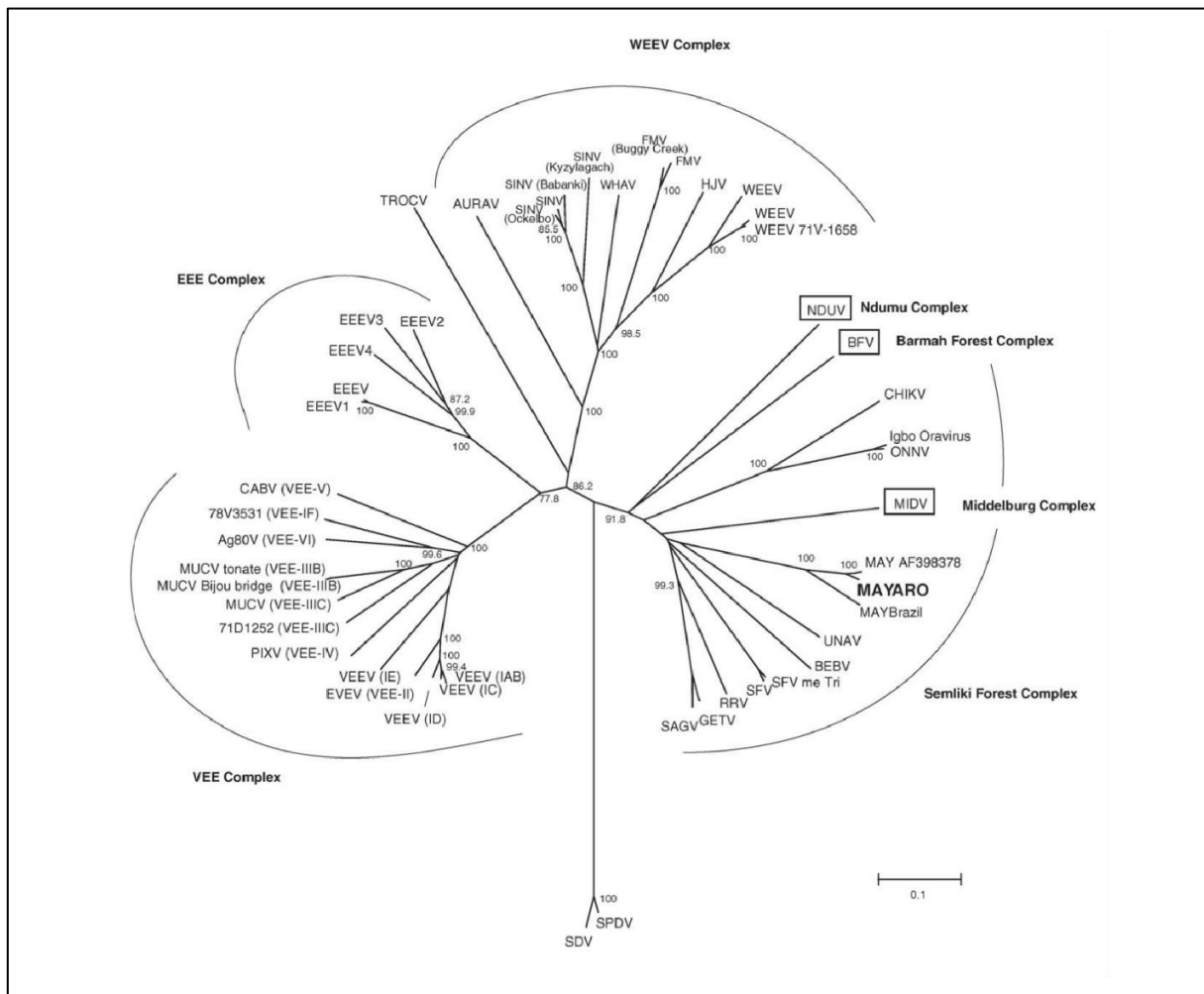
Au sein de ce génus deux espèces ont été particulièrement étudiées, constituant deux modèles d'études. Le premier modèle historique est celui du virus sindbis (SINV). Celui-ci a été découvert en Afrique en 1952, mais a été détecté ensuite en Europe chez l'homme et certains oiseaux migrateurs dès les années 1960 (Taylor et al. 1955, Brummer-Korvenkontio et al. 2002). Plusieurs séquences épidémiques ont eu lieu en Europe du Nord dans les années 1970 ce qui a concentré les efforts de plusieurs équipes de recherches notamment aux USA (Adouchief et al. 2016). L'autre modèle est le virus de la forêt Semliki (SFV). Originaire d'Ouganda il touche principalement les primates, et est responsable de quelques épidémies de faible intensité en Afrique (Mathiot et al. 1990). C'est leur faible virulence et leur facilité d'utilisation qui ont fait de SFV et de SINV deux modèles d'études pertinents.

## **2.3. Classification Alternatives**

### **a. Classification Antigénique**

Avant le développement du séquençage, et donc avant la disponibilité des séquences des génomes viraux, une démarche de classification des différentes espèces virales présentes dans le génus *Alphavirus* a été initiée sur la base d'analyses immunologiques. Derrière cette démarche se trouve le principe d'immunité croisée, où la réponse immunologique contre un pathogène peut induire une immunité contre un pathogène proche. Ainsi il a été observé que l'infection par certains *Alphavirus*, induisait une immunité contre d'autres membres de ce génus. C'est la mesure de l'immunité croisée entre ces différentes espèces, notamment au travers de la production d'anticorps interférents, qui a permis dans un premier temps de proposer une approche antigénique de classification des *Alphavirus* (Calisher et al. 1980). Cette stratégie a permis de séparer les *Alphavirus* en sept complexes distincts (Fig. 9). Le développement ultérieur du séquençage a en partie confirmé ces premières observations. Il a été montré que les virus placés au sein d'un même complexe

possédait une similarité de séquences bien supérieures qu'avec ceux des autres complexes antigéniques (Weaver et al. 2012).



**Fig. 9 Complexes phylogénétique des Alphavirus**

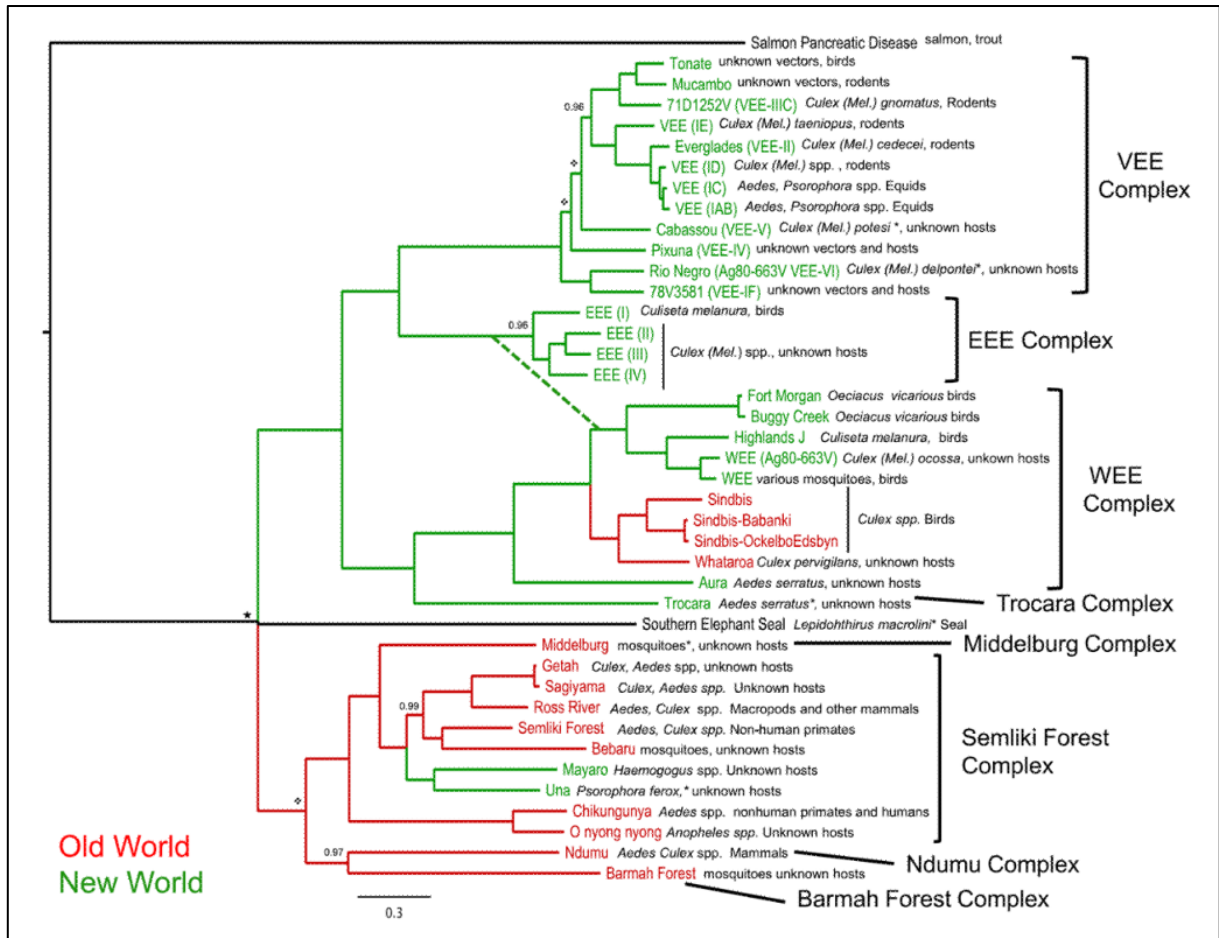
Arbre phylogénétique généré à partir des séquences partielles du gène de la glycoprotéine d'enveloppe E1. Abréviations des virus : MUCV, virus Mucambo ; TONV, virus Tonate ; PIXV, virus Pixuna ; CABV, virus Cabassou ; FMV, virus Fort Morgan ; HJV, virus Highlands ; WHATV, virus Whataroa ; SINV, virus Sindbis ; MIDV, Middelburg virus ; SFV, Semliki Forest virus ; RRV, Ross River virus ; CHIKV, Chikungunya virus ; ONNV, O'nyong nyong virus ; BFV, Barmah Forest virus ; SAGV, Sagiya virus ; SPDV, virus de la maladie du pancréas du saumon ; SDV, virus de la maladie du sommeil ; GETV, virus Getah ; NDUV, virus Ndumu ; BEBV, virus Bebaru ; TROCV, virus Troca ; BCV, virus Buggy Creek ; BABV, virus Babanki ; OCKV, virus Ockelbo ; AURAV, virus Aura ; WEEV, virus de l'encéphalite équine de l'Ouest ; VEEV, virus de l'encéphalite équine du Venezuela ; EEEV, virus de l'encéphalite équine de l'Est. Issus de (Lavergne et al. 2006).

## b. Alphavirus du vieux ou du nouveau monde

A l'exception du SAV pour lequel aucun arthropode vecteur n'a été formellement identifié à ce jour, la grande majorité des espèces d'*Alphavirus* sont des Arbovirus.



L'un des principaux axes de distinction de ces différents virus a été dans un premier temps leur zones de circulations primaires. Ainsi ont été distingués les virus de l'ancien monde (OW), qui circulaient en Afrique et en Asie, et les virus du nouveau monde (NW) circulant dans les Amériques. Par la suite il a été identifié que chacun d'entre eux ont des spécificités vectorielles différentes et sont responsables de symptômes différents chez leur un hôte vertébré. Cependant on observe une communauté de symptômes et de mécanismes physiopathologiques pour les *Alphavirus* apparentés (Baxter and Heise 2020). Les *Alphavirus* de l'ancien monde (OW), sont de ce fait majoritairement associés à des manifestations cliniques arthritogénique, dont polyarthrites, myalgies, synovites, et tendinites. Dans ce groupe on retrouve CHIKV, SFV, SINV, MAYV, SINV ainsi que le RRV et le virus O'nyong-nyong (ONNV). Ces virus de l'ancien monde sont originaires d'Asie, d'Afrique et d'Océanie. A l'opposé les virus du nouveau monde (NW) sont originaires des Amériques, et associés à des symptômes neurologiques. On trouve notamment l'apparition d'encéphalites, de méningites, et de radiculites. Dans ce groupe on retrouve EEEV, WEEV et VEEV. Il est toutefois à noter que cette division n'est pas aussi claire, car les aires de répartitions actuelles de ces espèces ne sont plus restreintes à l'ancien ou au nouveau monde. C'est le cas de MAYV, qui évolue principalement en Amérique du sud mais qui est considéré comme un virus de l'ancien monde (Ganjian and Riviere-Cinnamond 2020). De plus on suppose que des événements de recombinaison entre virus aient pu avoir lieu. C'est ce qu'a montré l'étude de SINV, circulant dans l'ancien monde, mais appartenant au complexe antigénique NW EEE (Calisher et al. 1980). Une étude plus approfondie de son génome laisse supposer un événement de recombinaison des gènes codant pour les protéines d'enveloppes entre des souches ancestrales de SINV et de EEEV (Weaver et al. 1997).



**Fig. 10 Arbre phylogénétique des Alphavirus**

Arbre phylogénétique des Alphavirus réalisé à l'aide de méthodes bayésiennes et ancré au point médian. Les vecteurs et les hôtes vertébrés sont indiqués à côté des noms des virus. L'arbre comprend des représentants de toutes les espèces et a été construit en utilisant les gènes des protéines structurales E2, 6 K et E1. La ligne en pointillé indique le point où les SINV et EEEV ancestraux se sont recombinés pour former l'ancêtre recombinant du WEEV. Les nœuds portant le symbole  $\diamond$  ont des probabilités postérieures inférieures à 0,9 et les nœuds portant le symbole  $\star$  n'avaient pas de soutien postérieur. Source (Weaver et al. 2012).

## 3. Structure et Génome

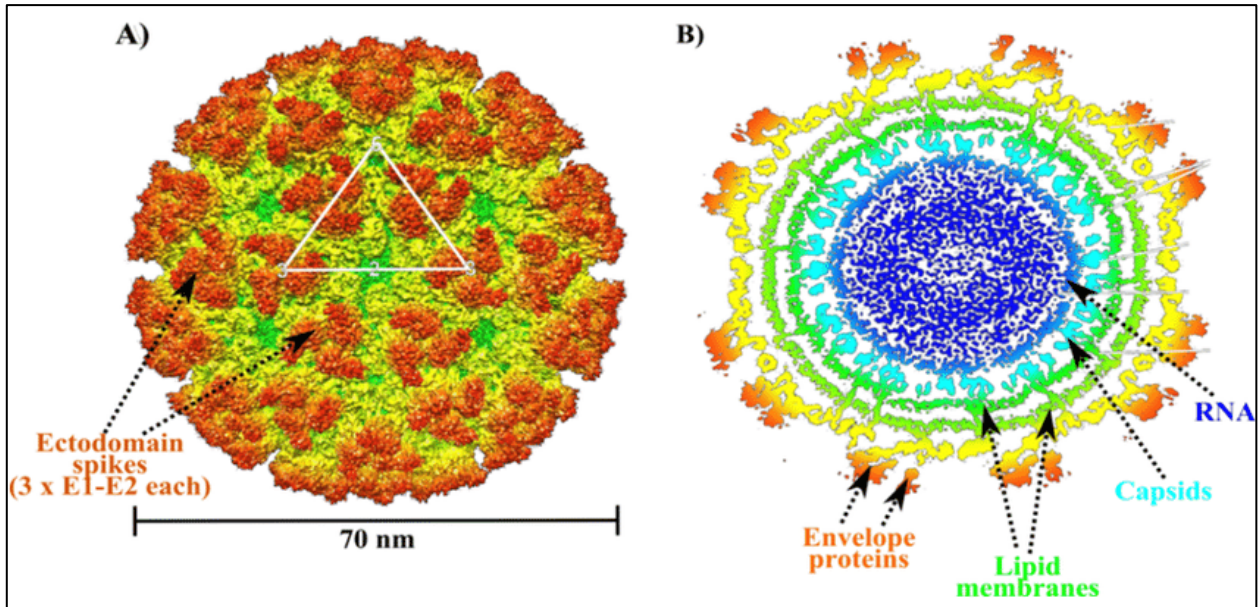
### 3.1. Virion

Comme les autres *Alphavirus*, les particules virales de CHIKV, sont organisées en plusieurs couches protectrices avec en leur cœur le génome viral (Fig. 11). Cette organisation est essentielle à la protection de l'ARN viral (Jose et al. 2009). C'est l'utilisation de la cryo-électro microscopie qui a permis à plusieurs équipes de décrire ces structures, sur les modèles SINV et SFV mais aussi directement sur CHIKV (Chen et al. 2018a, Mancini et al. 2000, Basore et al. 2019b). La plus interne de ces couches protectrices est la capsid virale, composée de 240 copies de protéine de capsid (protéine C) qui est organisée en un assemblage de 30 hexamères, et 12 pentamères qui forment une particule icosaédrique.

L'association du génome viral et de la capsid, appelé nucléocapsid, est permise par la reconnaissance d'un motif nucléotidique spécifique à chaque *Alphavirus* (PS ou packaging signal). La nucléocapsid est par la suite enveloppée d'une membrane, et cette association est médiée par l'interaction entre un peptide hydrophobe de la nucléocapsid et la partie C terminale de la glycoprotéine d'enveloppe E2 (Lee et al. 1996, Skoging et al. 1996). Cette enveloppe est constituée d'une bicouche lipidique dérivée de la cellule hôte à partir de laquelle le virion a bourgeonné. La composition lipidique de cette enveloppe reflète donc le contenu lipidique de la cellule productrice et peut, varier selon que la particule virale a été produite par une cellule d'insecte ou de mammifère. Hafer *et al*, ont en effet montré que la composition en cholestérol de ces membranes varie suivant la lignée productrice sans pour autant observer une différence dans l'infectiosité de ces virions (Hafer et al. 2009).

Insérées dans l'enveloppe virale, se trouvent des protéines virales transmembranaires, les glycoprotéines d'enveloppes E1, E2 et E3. Les protéines E1 et E2 sont organisées en 80 péplomères (ou *spike*) icosaédriques. Chacun de ces péplomères, est composé de trois hétérodimères. Ce serait la protéine E2 qui à travers un site d'interaction hydrophobe, permettrait de stabiliser l'ancrage de ces complexes à la membrane cellulaire (Chen et al. 2018a). Cet ancrage est également renforcé par l'association de la partie N terminale de la protéine E2 avec l'extrémité C terminale de la protéine de

Capside (Lee et al. 1996). Au total une particule virale CHIKV mature mesure environ 70 nm de diamètre.



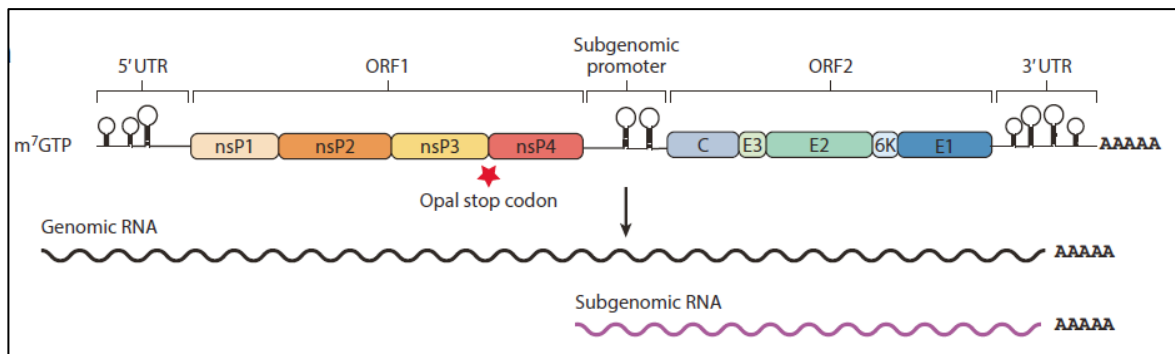
**Fig. 11 Structure de la particule virale de CHIKV**

(A) Analyse par microscopie cryogénique des péplomères de CHIKV, chacune étant un trimère d'hétérodimérique (E1-E2). La particule virale a un diamètre d'environ 70 nm. (B) Représentation en coupe de la particule virale, indiquant de l'extérieur vers l'intérieur de la particule, la localisation des protéines d'enveloppe, de la membrane lipidique, de la capside et de l'ARN. Source (Das 2015).

## 3.2. Organisation génomique

Le génome de CHIKV est composé d'un ARN simple brin de polarité positive, non segmenté, et d'environ 12kb. Il est structuré comme un ARNm présentant une coiffe en 5' et une queue poly-adenylée en 3'. Il comprend deux cadres de lecture (ORF1 et ORF2) initialement traduits sous forme de deux polyprotéines dont la maturation produit respectivement les protéines non structurales (nsPs) soit nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4 (polyprotéine P1234) et les protéines structurales (sP) (C, E3, E2, E1 et les peptides 6K et TF) (Fig. 12). Il est intéressant de remarquer que la présence d'un codon stop opal (UGA) en 3' de la séquence de nsP3 induit un arrêt de la traduction prématuré de l'ORF1, aboutissant à la synthèse d'une polyprotéine non structurale alternative tronquée P123 (Stapleford et al. 2016). On note également la synthèse d'une protéine TF issue d'un décalage traductionnel (*Ribosomal frameshifting*) au

cours de la traduction de l'ORF2. Cette protéine contient uniquement la partie C terminale de la protéine 6K (Snyder et al. 2013).



**Fig. 12 Organisation génomique de CHIKV**

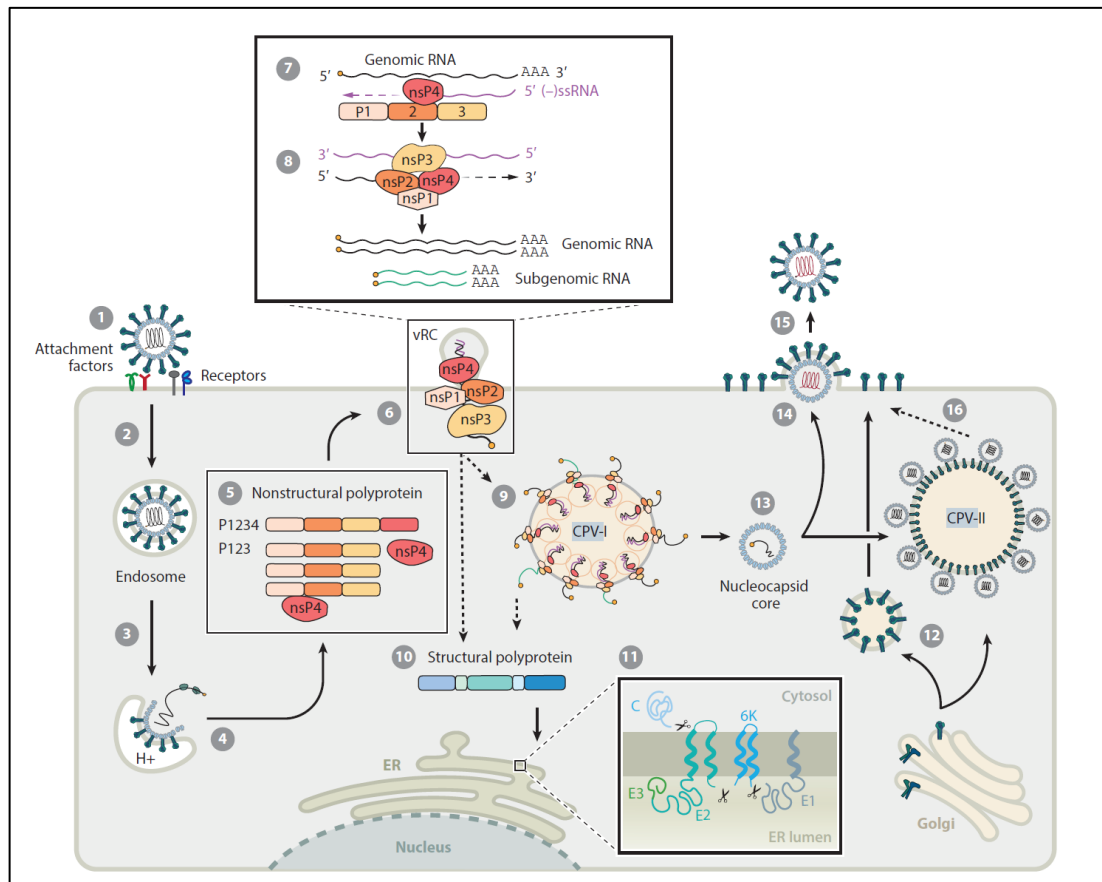
*Le génome du CHIKV est constitué d'une molécule d'ARN coiffé en 5' et à polyadénylée en 3', divisée en deux ORF. L'expression des ORF1 et ORF2, qui codent pour les polyprotéines non structurales et structurales, contrôlée par le promoteur génomique dans la région 5' UTR et un promoteur subgénomique interne, respectivement. La réplication et la transcription du génome sont régulées en cis par des structures tiges-boucles d'ARN, appelées éléments de séquence conservés (CSE), situées dans la région 5' UTR, le promoteur et la région 3' UTR. La réplication du CHIKV entraîne l'accumulation d'un ARN complet utilisé comme génome pour la production de virions de CHIKV. L'ARN subgénomique est transcrit et utilisé comme cadre pour la traduction des polyprotéines structurales. Source (Krill et al. 2021).*

Au-delà des deux ORFs, des régions non codantes essentielles à la régulation de la transcription et de la traduction de l'ARN viral ont été identifiées dans le génome du CHIKV. La coiffe de l'ARN viral à la même structure que les ARNm cellulaires, permettant la protection contre les défenses antivirales cellulaires, telles que les exoribonucléases cytoplasmiques (Decroly et al. 2012). Ce processus de coiffage sera décrit plus en détail dans la section suivante de ce chapitre (Chapitre 1.5.2.a).

Les séquences promotrices de la transcription sont composées d'une part d'un promoteur génomique constitué d'une séquence de 76 ou 77 nucléotides suivant les *Alphavirus*, présente dans la région 5'UTR et structurée sous la forme d'une tige boucle (Frolov et al. 2001). Outre sa fonction de régulation, cette région permet également de contrecarrer l'action du facteur de restriction stimulé par l'IFN, IFIT1 (Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 1), qui se fixe sur les ARN simples brins viraux et agissent comme senseurs et séquestrateurs des ARNs viraux (Hyde et al. 2015). Un second promoteur interne contrôlant la transcription d'un ARN subgénomique correspondant au dernier tiers du génome viral et codant pour les sPs est situé dans la région non codante centrale du génome entre les ORFs 1 et 2. Enfin,

la région 3'UTR qui est de longueur variable entre espèces d'*Alphavirus* contient cependant un domaine très conservé (CSE) juste en amont de la queue poly-A (Pfeffer et al. 1998, Hyde et al. 2015). Celui-ci sert de promoteur à la synthèse du brin d'ARN(-) complémentaire, intermédiaire nécessaire à la réplication virale et également à l'efficacité de traduction des protéines virales (Hardy and Rice 2005). De plus on suppose que cette région est impliquée dans le tropisme vectoriel des *Alphavirus*. En effet, il a été démontré que des mutations dans ces régions chez SINV et EEEV peuvent influencer la réplication dans des cellules de moustique (Kuhn et al. 1990, Weaver et al. 1999).

## 4. Cycle Infectieux



**Fig. 13 Cycle viral de CHIKV au sein de cellules mammifères**

(1) L'infection par le CHIKV est initiée par l'interaction des hétérodimères de la glycoprotéine E1/E2 avec le récepteur Mxra8 de la surface cellulaire et les facteurs d'attachement. (2) La particule virale est internalisée par endocytose et acheminée vers les endosomes. (3) L'acidification du pH vacuolaire entraîne le dégagement du peptide de fusion de la protéine E1 et la fusion des membranes virales et endosomales. (4) La capsid virale est libérée dans le cytoplasme et le génome viral est libéré par décapsidation. (5) Le génome de CHIKV est traduit pour produire les polyprotéines P123 et P1234. (6) nsP4 est maturée et forme un complexe avec P123 et l'ARN viral puis transite vers la membrane plasmique. Ce complexe remodele la membrane cellulaire pour favoriser la formation d'organelles de réplication, ou sphérules. (7) Au sein des sphérules, un ARN complémentaire de polarité négative est synthétisé. (8) Ensuite, P123 est maturée séquentiellement pour produire les quatre nsPs matures, ce qui entraîne un basculement de l'activité du complexe de réplication vers la synthèse d'un génome d'ARN positif [(+) ARN] et d'un ARN subgénomique. (9) Une partie des compartiments de réplication du CHIKV sont endocytés et fusionnent avec des endo-lysosomes pour former le CPV-I dans lequel les sphérules internalisées restent actives. (10) Les protéines structurales sont traduites à partir de l'ARN subgénomique sous la forme d'une polyprotéine transloquée dans le RE. (11) La protéine C est libérée par clivage autocatalytique. Les glycoprotéines E et la protéine 6K est maturée par les protéases cellulaires. (12) La polyprotéine structurale est acheminée vers la membrane plasmique via les voies sécrétoires. (13) La protéine C et l'ARN génomique forment une nucléocapside icosaédrique. (14) L'assemblage viral a lieu à la membrane plasmique où les glycoprotéines E matures et les nucléocapsides sont adressées. (15) L'interaction C/E2 favorise le bourgeonnement des particules de CHIKV et la libération des particules virales. (16) Le recrutement alternatif des nucléocapsides et des glycoprotéines E assemblées au niveau de CPV-II contribue en outre à l'assemblage et au bourgeonnement des virions du CHIKV. Issus de (Krill et al. 2021).

Dans cette partie nous nous focaliserons sur les connaissances relatives au cycle répliatif de CHIKV chez son hôte vertébré et aux interactions virus/cellule impliquées (Fig. 13). Les différentes fonctions des protéines virales notamment dans le complexe de réplication seront discutées dans la section suivante (Chapitre 1.5). Une part importante de ces connaissances découle d'études ayant été effectuées sur les modèles SINV ou SFV. Cependant il est raisonnable de postuler que les mécanismes du cycle infectieux de CHIKV sont similaires à défaut d'être identiques. De même l'étude du cycle viral dans des cellules d'insectes est lacunaire. Bien qu'on puisse supposer que l'infection suive les mêmes étapes chez le moustique, les différences considérables en termes de métabolisme et d'immunité cellulaire, nous obligent à la prudence.

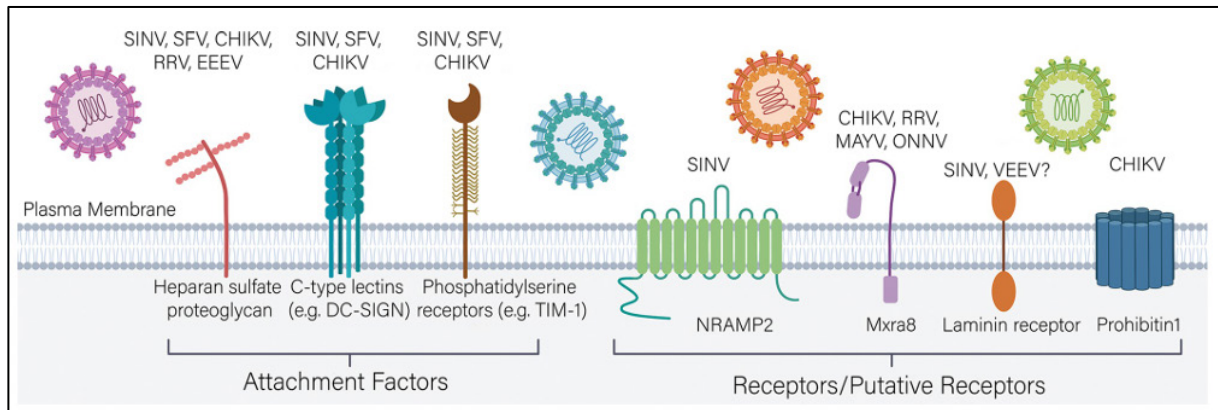
## 4.1. Facteurs d'attachement et récepteurs

L'ensemble des virus, pour pénétrer une cellule hôte, nécessitent la présence de facteurs d'entrée qui peuvent se présenter sous deux formes : Les récepteurs, essentiels à l'entrée virale, interagissant directement et spécifiquement avec les protéines d'enveloppes portées par le virion, et les facteurs d'attachements qui facilitent l'adhésion du virion à la cellule sans interaction spécifique (Fig. 14).

Les récepteurs cellulaires responsables de l'entrée des *Alphavirus* dans les cellules de vertébrés sont longtemps restés énigmatiques. Dans le cas de SINV, il a été démontré que la protéine NRAMP2 joue le rôle de récepteur (Rose et al. 2011). Cette protéine, qui est un transporteur transmembranaire d'ions de fer et de manganèse, favorise l'entrée virale à la fois chez les mammifères et les insectes. Chez SINV également, le récepteur membranaire laminine a été proposé. Cette glycoprotéine impliquée dans la structure de la matrice extracellulaire a été observé comme favorisant la fixation de des particules virales aux cellules cibles (Wang et al. 1992). Cependant il n'a pas pu être démontré qu'une interaction a lieu entre cette protéine et que cette interaction médie l'endocytose virale.

Un autre récepteur des alphavirus est la protéine de surface LDLRAD3 (low density lipoprotein receptor class A domain containing 3). Encore peu caractérisée cette protéine est exprimée chez les mammifères dans les cellules neuronales, épithéliales, myéloïdes et musculaires. Elle n'a pas d'orthologue chez l'insecte.





**Fig. 14 Récepteurs d'entrée et facteurs d'attachement des Alphavirus.**

Les Alphavirus utilisent plusieurs molécules de surface cellulaire, notamment les récepteurs HS, DC-SIGN/L-SIGN et PS, pour effectuer un premier attachement aux cellules cibles. Ces molécules augmentent l'infektivité de plusieurs Alphavirus et peuvent également favoriser l'internalisation du virus. Les récepteurs potentiels des alphavirus qui comprennent NRAMP2 et Mxra8. D'autres récepteurs putatifs nécessitant une confirmation supplémentaire sont le récepteur de la laminine et PHB1. Modifié à partir de (Decroly et al. 2012).

Chez VEEV, le ciblage de cette protéine s'est montré particulièrement délétère à l'infections de lignées cellulaires et à la pathogénèse en modèle murin (Ma et al. 2020). La résolution de sa structure a permis de prédire que c'est par son domaine D1, le plus distant de la membrane plasmique, que la protéine interagit avec la particule virale en particulier l'hétérodimère E1-E2 (Basore et al. 2021, Ma et al. 2021). Ce phénotype semble spécifique à VEEV, LDLRAD3 n'ayant aucune incidence sur l'infection de EEEV, WEEV ou SINV et l'ensemble des virus du vieux monde (Ma et al. 2020, 2021). Cependant, une protéine apparentée à LDLRAD3, VLDLR (Very low-density lipoprotein receptor), a été décrite comme favorisant l'infection de SFV, EEEV ou SINV. En effet, cette protéine humaine ainsi que ses orthologues chez l'insecte, peuvent agir comme en tant que récepteur alternatif lors de l'entrée de ces virus (Clark et al. 2022). La découverte de ce récepteur permet d'éclairer d'un jour nouveau la phylogénie des *Alphavirus* et de VEEV en particulier.

Dans le cas de CHIKV en particulier, la nature du, ou des récepteurs de CHIKV est restée une question ouverte pendant plusieurs décennies. Le premier récepteur potentiel identifié fut la prohibitin1 (PHB1). Cette protéine transmembranaire régulatrice de la prolifération cellulaire a été identifiée comme candidat par approche protéomique (Kuadkitkan et al. 2010). Il a pu être observé que le ciblage de PHB1 par

anticorps neutralisants ou par extinction de gène, diminuait significativement l'infection. Néanmoins, bien que PHB1 interagisse avec la protéine d'enveloppe E2, il n'y a pas de preuve formelle de son rôle dans l'entrée virale ou de son interaction avec la particule virale complète.

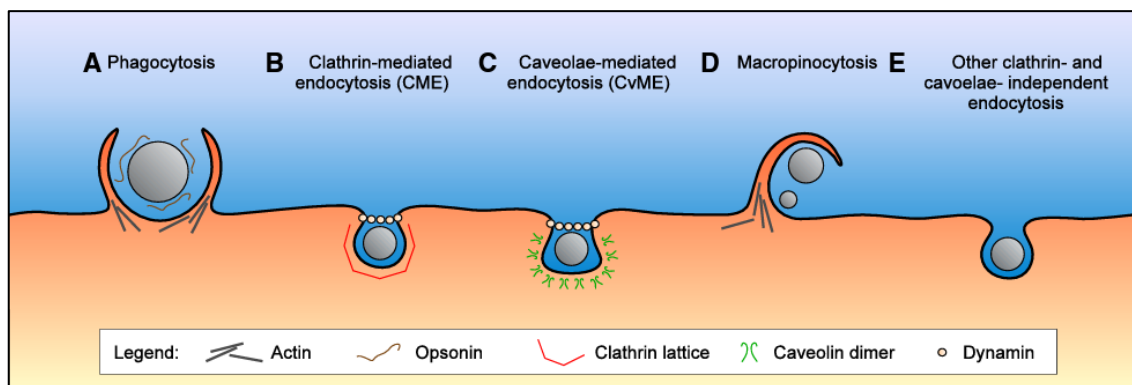
Le développement de cribles utilisant la technologie d'édition CRISPR/Cas9 a permis des avancées importantes ces dernières années. De cette manière, en 2018, la protéine transmembranaire Mxra8 a été identifiée comme un récepteur du virus (Zhang et al. 2018). Cette protéine, impliquée dans l'adhésion cellulaire et exprimée dans les fibroblastes de mammifères forme un complexe en association avec les protéines d'enveloppe E1, E2 et E3 caractérisé par cryo-électro-microscopie (Basore et al. 2019b). La fonction de récepteur de Mxra8 est conservée pour les *Alphavirus* MAYV et ONNV, phylogénétiquement proches du CHIKV. En revanche, Mxra8 ne facilite pas l'infection par le SINV ou le virus de Middelburg (MIDV). A première vue Mxra8 n'a pas d'orthologue chez les invertébrés (Zhang et al. 2018). On peut noter que bien que Mxra8 ne soit pas impliqué dans l'entrée virale de VEEV, le récepteur LDLRAD3, présente des sites d'interactions très similaires suggérant une forme de conservation au sein du génus (Basore et al. 2021).

Cependant, bien que cette découverte soit importante, le fait que CHIKV soit capable d'infecter des cellules n'exprimant pas Mxra8 ; indique qu'il ne s'agit sans doute pas de son unique récepteur. Ainsi tous les lignages de CHIKV n'ont pas la même affinité pour Mxra8. Les lignages As par exemple sont plus fortement dépendants de sa présence que les lignages ECSA (Zhang et al. 2018). Il a donc été proposé que certains polysaccharides de surface, les Glycosaminoglycans (GAGs), qui favorisent l'infection, pourraient agir comme mécanismes d'entrée compensatoires (McAllister et al. 2020). De ce fait, Mxra8 pourrait avoir un rôle dans l'entrée cellulaire mais circonstancié, à la souche infectieuse et au type cellulaire. On dispose cependant de plus d'informations sur les facteurs d'attachements de CHIKV. Tout d'abord il a été montré que certaines protéines transmembranaires permettent l'attachement des virions. Les récepteurs de lectines DC-SIGN et L-SIGN ont été tout d'abord identifiés chez SINV (Klimstra et al. 2003). Par la suite certains membres des familles TIM et TAM, nommément TIM1 et AXL facilitent l'ancrage à la membrane plasmique. En effet, ces deux protéines sont capables de se lier aux phosphatidylserines de l'enveloppe virale et on suppose, de faciliter l'interaction avec les récepteurs viraux (Morizono et

al. 2011, Jemielity et al. 2013). L'autre catégorie de facteurs d'attachements est constituée par les polysaccharides de surface. On retrouve dans cette catégorie les GAGs membranaires évoqués plus hauts. On peut également évoquer les héparanes sulfates (HS) qui ont été tout d'abord identifiés comme facteurs d'attachement de SINV. Récemment, il a été confirmé que CHIKV était aussi dépendant de ces molécules (Byrnes and Griffin 1998, Tanaka et al. 2017).

## 4.2. Entrée et fusion

Après s'être fixées à la cellule cible, les particules CHIKV, détournent la machinerie d'endocytose cellulaire pour être internalisées. Deux types de voies d'endocytose principales sont utilisées par les *Alphavirus* (Fig. 15). La voie d'endocytose clathrine-dépendante a été la première décrite comme détournée afin de permettre l'entrée virale dans le cytoplasme. Le phénomène d'endocytose, constitutif aux cellules mammifères, consiste en l'invagination et la scission de la membrane plasmique par un complexe protéique qui inclue la dynamine, la clathrine et Eps15 (Kirchhausen et al. 2014). Cette voie a été longtemps considérée comme le principal mécanisme



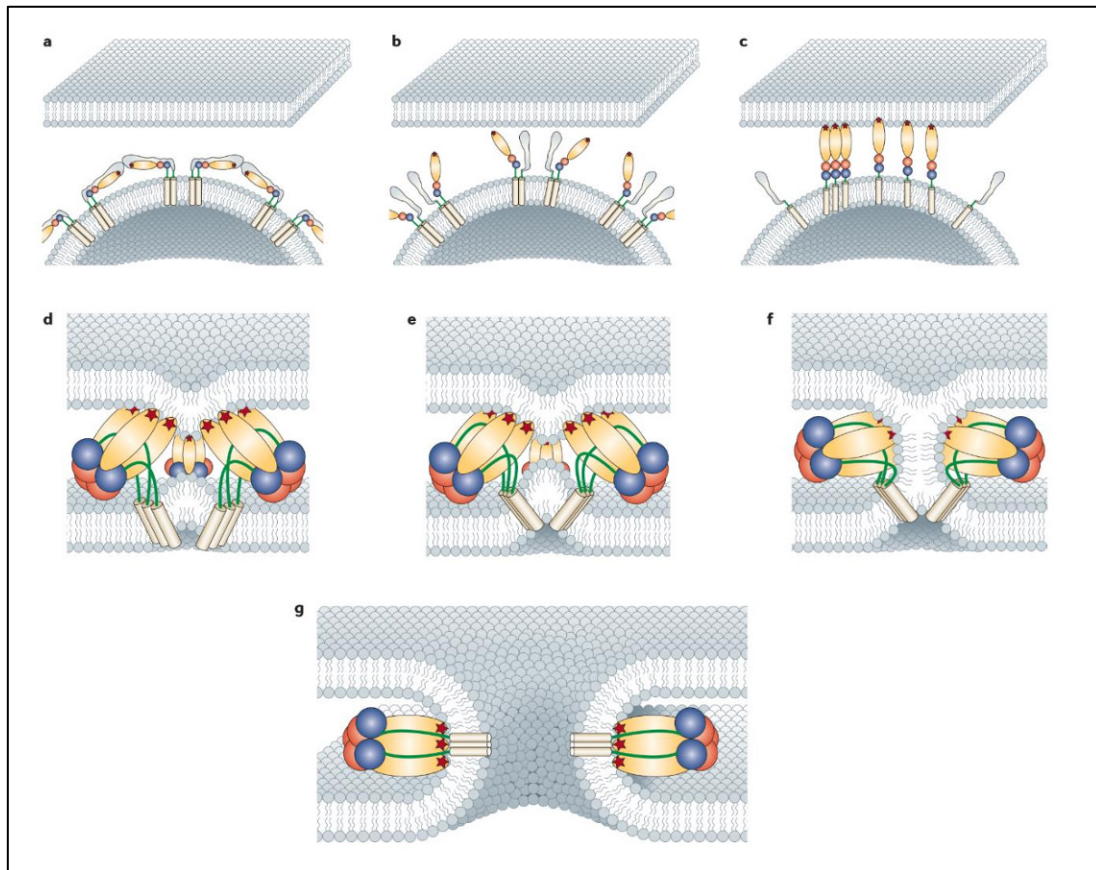
**Fig. 15 Principaux mécanismes d'internalisation des particules virales.**

(A) La phagocytose est un mécanisme basé sur l'actine qui se produit principalement dans les cellules phagocytes, tels que les macrophages, et qui est étroitement associé à l'opsonisation. (B) L'endocytose médiée par la clathrine est une voie largement partagée d'internalisation des particules virales, associée à la formation d'un réseau de clathrine et dépendant de la GTPase dynamine. (C) L'endocytose médiée par les cavéolines se produit dans des invaginations typiquement en forme de flasque où la membrane plasmique est recouverte de dimères de cavéolines. (D) La macropinocytose est une voie basée sur le cytosquelette d'actine permettant l'engloutissant des particules virales ainsi que le milieu extracellulaire avec une faible sélectivité. (E) D'autres voies d'endocytose peuvent être impliquées dans l'internalisation des virions, indépendamment de la clathrine et des cavéolines. Modifié à partir de (Hillaireau and Couvreur 2009).

d'entrée des *Alphavirus*. Cependant, l'internalisation du CHIKV dans les cellules épithéliales humaines reste possible après invalidation de la chaîne lourde de

clathrine, pointant l'utilisation d'une voie d'internalisation alternative clathrine-indépendante (Bernard et al. 2010, Hoornweg et al. 2016). Enfin, on soupçonne également depuis peu l'implication d'une troisième voie, celle de la macropinocytose dans ce processus (Lee et al. 2019). En effet l'activation par le virus de récepteurs tyrosine kinase comme la sortin nexin 9 pourrait induire un repli membranaire qui en fusionnant permettrait l'internalisation virale chez les cellules musculaires. Pourtant dans des lignées cellulaires non musculaire, le rôle de la macropinocytose semble négligeable, indiquant un rôle cellule dépendant de ce mécanisme d'entrée. Des études supplémentaires sont nécessaires pour faire la lumière sur la contribution respective et sur la redondance de ces différents processus selon le type cellulaire.

Une fois internalisés au sein d'un endosome précoce, les particules virales vont fusionner à la membrane de la vésicule, afin de libérer la capsid et les protéines virales dans le compartiment cytoplasmique. C'est au sein des endosomes précoces que plus de 95% des virions entrent en phase de fusion. Dans ces vacuoles, l'activation de pompes à protons ATP dépendantes, va abaisser le pH jusqu'à un seuil inférieur à 6.2, permettant ainsi la fusion des membranes cellulaires et virales (Bernard et al. 2010, Hoornweg et al. 2016). L'étude détaillée des structures de l'enveloppe virale a en effet montré qu'à ce seuil d'acidité la protéine E1 se dissocie en partie de E2. Ce remaniement dévoile un motif peptidique hydrophobe de fusion présent dans E1 permettant son ancrage dans la membrane vésiculaire (Gibbons et al. 2004b) (Fig. 16). Par la suite, E1 se détache complètement de E2 pour former des homotrimères. Ceux-ci vont induire un rapprochement des membranes entraînant une héli-fusion (Li et al. 2010a). Enfin, les trimères E1, forment un pore membranaire permettant la libération de la capsid dans le cytoplasme (Gibbons et al. 2004a).



**Fig. 16 Modèle de fusion membranaire des Alphavirus**

(a) Les domaines I, II et III de E1 sont colorés en bleu, rouge et jaune respectivement ; E2 est représenté en gris. La boucle de fusion hydrophobe de E1 (indiquée par une étoile) est située dans un sillon entre le domaine A et le domaine B de E2 ; (b) La déstabilisation de l'hétérodimère E2/E1 est déclenchée par la baisse de pH. Le domaine B de E2 s'éloigne et le peptide de fusion est exposé ; (c) Insertion du peptide de fusion dans la membrane cible et dissociation de la protéine E2 ; (d,e) distorsion de la membrane cible ; (f) Fusion des feuillettes membranaires opposés (hémifusion) ; (g) Formation de l'homotrimère final stable et ouverture du pore de fusion. Modifié à partir de (van Duijl-Richter et al. 2015).

### 4.3. Décapsidation et traduction initiale

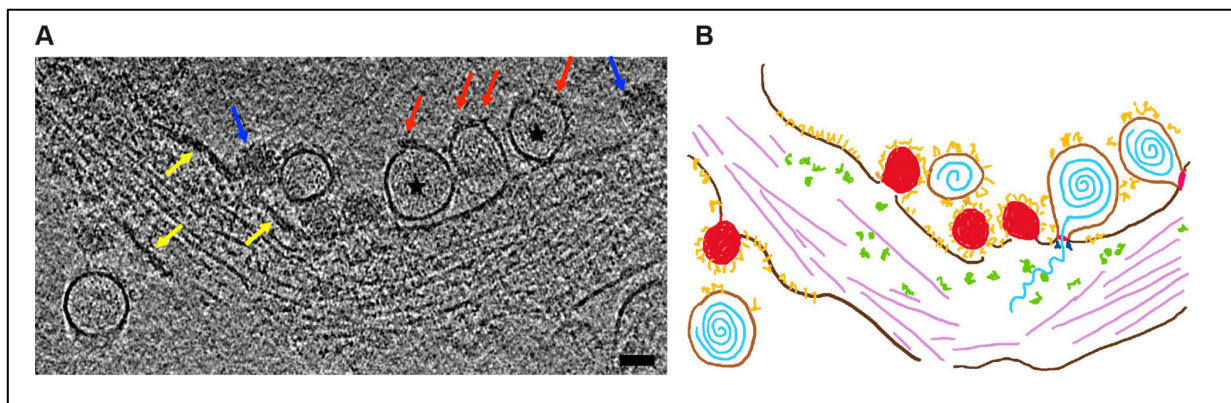
Après la libération de la capsidie dans le cytoplasme, on connaît peu de chose du processus de décapsidation. Les travaux réalisés dans le modèle SFV indiquent que ce processus est très rapide (1 min) et serait facilité par l'interaction de la sous unité 60S ribosomique avec la protéine C (Singh and Helenius 1992). Une fois libéré dans le cytoplasme l'ARN génomique viral est pris en charge par la machinerie traductionnelle. La persistance d'une interaction entre l'ARN viral et la capsidie après la décapsidation est nécessaire à la traduction efficace du génome viral (Sokoloski et al. 2017). Ces évènements donnent lieu dans un premier temps à l'accumulation de deux polyprotéines P1234 et majoritairement (plus de 90% des évènements) de P123

résultant de la présence du codon stop opal au niveau de nsP3 (Li and Rice 1993). L'ARN viral ayant la même structure que l'ARNm, on suppose que les machineries de traduction impliquées sont similaires. Un élément concordant est le fait que la traduction virale des *Alphavirus* est dépendante du facteur d'initiation eIF4E (Joubert et al. 2015). Cette protéine a un rôle important dans l'assemblage du complexe de traduction au niveau de la coiffe des ARNm. L'activation d'eIF4E est généralement dépendante de deux voies de signalisation dépendantes soit de mTOR, soit des MNKs (MAP kinase-activated protein kinases). Lors de l'infection virale, la voie de signalisation mTOR est capable de bloquer la traduction cellulaire et virale en inhibant l'action des facteurs de traduction. Cependant certains virus sont capables de tourner cette situation à leur avantage en contournant ce blocage. De la sorte, la machinerie de traduction se retrouve entièrement dédiée aux protéines virales (Martin et al. 2012). Ainsi Joubert *et al* ont montré que lors de l'infection par CHIKV, l'arrêt de la traduction médié par mTOR est contourné par le virus. La traduction des protéines virales est maintenue dans ce contexte par l'activation des facteurs MNKs qui vont permettre le recrutement par phosphorylation de eIF4E au niveau de l'ARN viral. Ceci permet le maintien de la traduction pour les ARN viraux dans un contexte d'arrêt global de la traduction (Joubert et al. 2015). Les facteurs viraux responsables de cette prise de contrôle sont à l'heure actuelle inconnus.

#### **4.4. Formation du complexe de réplication**

Après la traduction des polyprotéines non structurales P123 et P1234, celles-ci vont être séquentiellement clivées en trans et en cis par le domaine cystéine protéase de nsP2 (Vasiljeva et al. 2003). Cette maturation est séquentielle conduisant tout d'abord à l'accumulation de P123 + nsP4, puis à celle de nsP1 + P23 + nsP4, et enfin à l'accumulation des protéines matures nsP1, nsP2, nsP3, nsP4. L'association de P123, nsP4 et de l'ARN viral initie l'activité du complexe réplcatif qui va dans premier temps être adressé à la membrane plasmique, et s'y ancrer via le domaine d'association membranaire de nsP1. L'action de la RdRp nsP4 au sein de ce complexe éphémère va permettre, à partir du génome viral, la synthèse d'un brin ARN(-) complémentaire au génome viral conduisant à l'accumulation d'ARNdb (Ahola and Merits 2016). A partir de ce stade, la poursuite de la maturation de la polyprotéine P123 convertit l'activité de nsP4 qui pourra alors transcrire de nouveaux ARN viraux génomiques et

subgénomiques en utilisant l'ARN(-) néosynthétisé comme matrice. Ces événements prennent place dans une niche répliquative à la membrane plasmique que l'on nomme sphérule. Celle-ci prend la forme d'une évagination de la membrane, connectée par un col étroit au reste du cytoplasme (Fig. 17). Ces compartiments permettent la protection de l'ARNdb des senseurs de l'immunité innée et des réponses antivirales susceptibles de conduire à sa dégradation. Ainsi la machinerie de réplication virale est protégée au sein de ses structures et permet l'export des ARN néosynthétisés vers le cytoplasme. Les rares connaissances relatives à la biogénèse et l'organisation de ces compartiments seront détaillées plus loin dans la section 7 de ce chapitre (0). À des stades plus tardifs de l'infection, une partie de ces sphérules sont internalisées sous la forme de vacuoles cytopathiques de type I (CPV-I). Ces structures de 0.6 à 2 µm de diamètre sont issues de membranes endolysosomales et sont présentes chez tous les *Alphavirus* (Froshauer et al. 1988). Cependant la fréquence de formation des CPV-I ne semble pas être similaire entre chaque *Alphavirus*. L'infection par CHIKV par exemple induit peu de CPV-I (Thaa et al. 2015).



**Fig. 17 Sphérules de réplication de CHIKV à la membrane plasmique.**

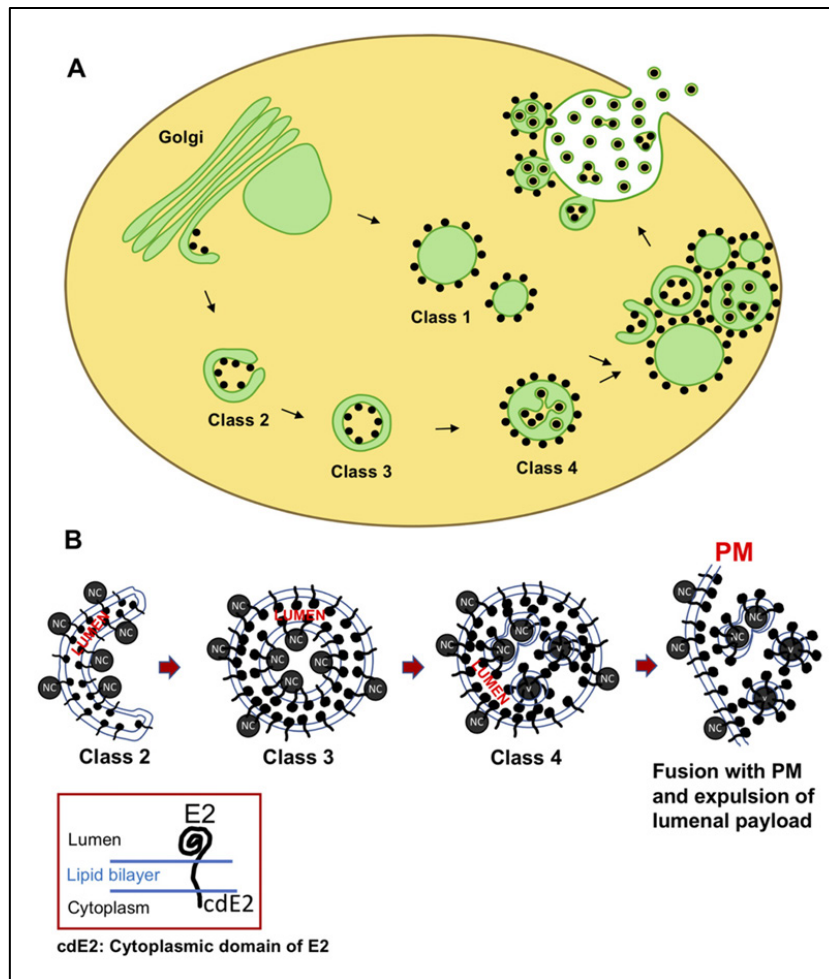
A. Tomographie électronique d'une extension de type filopode induite par CHIKV. Les particules virales sont détectées au niveau de la membrane plasmique P (flèches bleues), les organelles de réplication apparaissent moins denses et plus larges (étoiles noires). Un épaissement de la MP peut apparaître localement (flèches jaunes). Barre d'échelle, 50 nm. B. Représentation schématique de A. Les filaments d'actine sont représentés en violet, les ribosomes en vert, la membrane plasmique cellulaire en brun, les particules virales en rouge, les organelles de réplication en brun clair, l'ARNdb en bleu clair, l'anneau putatif nsP1 en rose, et certains partenaires de réplication en bleu foncé. Modifié à partir de (Girard et al. 2023a).

## 4.5. Assemblage et bourgeonnement

Dans les dernières étapes du cycle répliquatif, l'ARN subgénomique est transcrit à partir de l'ARN(-), sous contrôle du promoteur subgénomique. Cet ARN est traduit sous la

forme d'une polyprotéine C-E3-E2-6K-E1. Celle-ci est maturée séquentiellement grâce à l'activité protéasique de la protéine C qui s'auto-clive. La protéine de capsid libérée de cette façon va par la suite s'auto-assembler en multimères de 240 copies en association avec l'ARN génomique néosynthétisé. En parallèle, la polyprotéine E3-E2-6K-E1 est adressée au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et est insérée au travers de sa membrane via les domaines transmembranaires des protéines E2, 6K et E1 (Fig. 20). Les protéines 6K et E1 sont libérées par l'action de signalases cellulaires présentes dans le lumen endoplasmique. Après cette étape, l'intermédiaire E3-E2 (ou p62) s'associe avec E1 afin de produire un complexe trimérique immature, qui va transiter par des voies de sécrétions. Ce complexe subit tout d'abord des modifications post-traductionnelles comprenant des palmitoylations et des glycosylations. Le précurseur p62 modifié est ensuite clivé par l'action de la furine conduisant alors à la production des glycoprotéines E2 et E3 matures associées à E1 (Ivanova and Schlesinger 1993, Ryan et al. 1998). Les trimères matures formés de cette manière, sont acheminés vers la membrane plasmique. Une fois adressée à la membrane plasmique ces complexes s'oligomérisent sous forme de feuillet hexagonaux. Cette conformation favorise l'interaction entre la protéine E2 et la nucléocapside virale. La particule est ainsi pleinement formée et prête au bourgeonnement (Soonsawad et al. 2010, Jin et al. 2018a). Cependant il n'est pas certain que l'interaction entre les nucléocapsides et les protéines d'enveloppe prenne place directement à la membrane plasmique. Une des hypothèses propose que cet assemblage puisse se produire au niveau de vésicules spécifiques appelées vacuoles cytopathiques de type II (CPV-II) (Soonsawad et al. 2010). Ces structures vacuolaires dérivées du Golgi et sont formées dans les étapes intermédiaires et tardive du cycle viral. Elles peuvent prendre la forme de vésicules à simple ou double membranes et sont marquées par la forte présence de protéine de capsid et d'enveloppe. Une étude récente par microscopie électronique propose un modèle de morphogénèse de ces vacuoles où ces dernières subissent plusieurs étapes de maturation depuis le Golgi vers la membrane plasmique pour y adresser l'assemblage de capsid et de protéines d'enveloppe (Sengupta et al. 2022) (Fig. 18). Il est possible que ces vacuoles servent d'intermédiaire à la maturation des particules virales. Toutefois, il est à l'heure actuelle impossible de l'affirmer avec certitude.





**Fig. 18 Modèle de biogénèse des CPV-II.**

(A) Le modèle actuel suggère que malgré la présence distincte de quatre types morphologiques de CPV-II, deux mécanismes sont potentiellement à l'œuvre. La morphogénèse des classes 2, 3 et 4 commence par la flexion et la fragmentation des citernes de Golgi. Le CPV-II de classe 1, en revanche, se forme directement par hernie et gonflement de la citerne de Golgi. La classe 2 (ou forme falciforme) se replie sur elle-même et fusionne pour donner naissance à la structure de vésicule à double membrane (DMV) de la classe 3. Enfin, les protéines NC piégée dans la DMV acquiert son enveloppe à partir de la membrane interne de la DMV pour donner naissance à la classe 4. Enfin, toutes ces formes se regroupent grâce à l'interaction bivalente de la NC de surface qui relie de nombreux CPV-II entre eux et sont transportées vers la membrane plasmique (PM). Il est supposé que les protéines NC à la surface des CPV-II sont d'abord transférées vers le feuillet interne de la MP, d'où elles bourgeonnent. Parallèlement, les CPV-II, beaucoup plus petits, fusionnent et délivrent les virions à l'extérieur de la cellule. (B) Hypothèse sur l'orientation de la glycoprotéine E2 dans les différentes classes de CPVII et sur la présence de NC et leur livraison potentielle à la MP. Issus de (Sengupta et al. 2022).

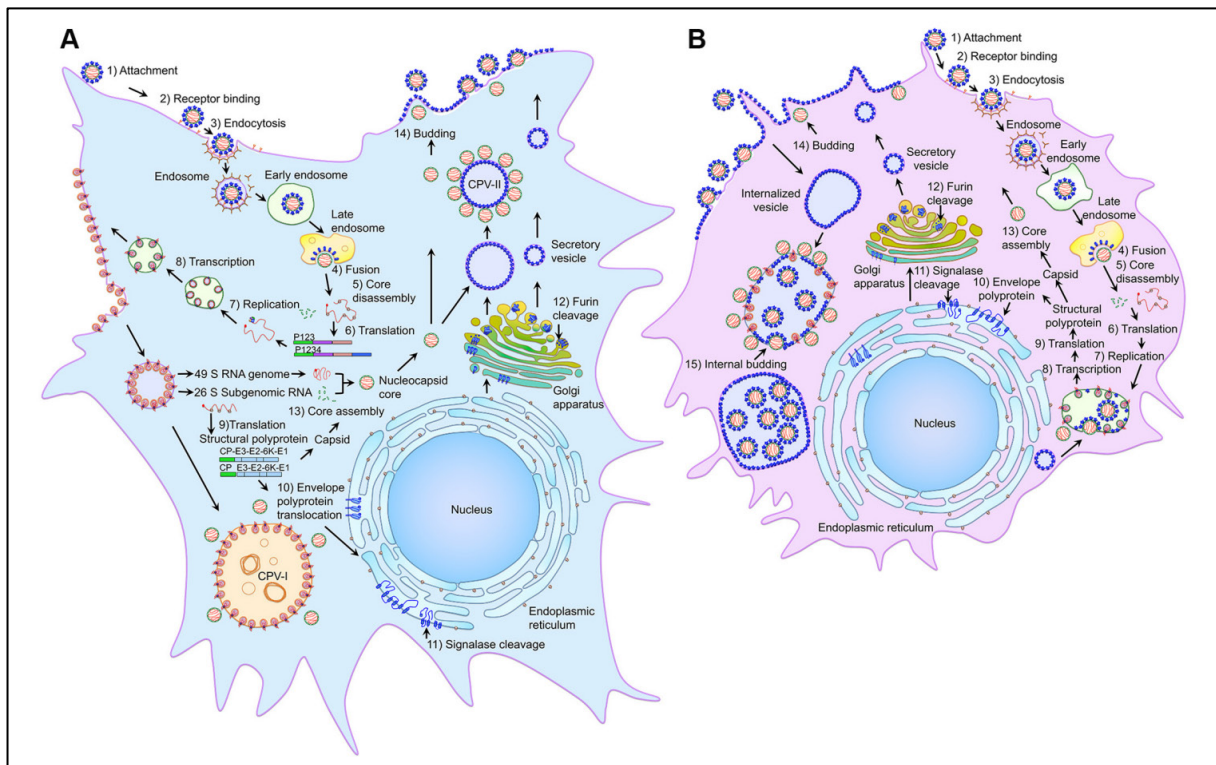
Enfin, la dernière étape du cycle infectieux, consiste au bourgeonnement des particules virales. Si l'on sait que l'interaction entre E2 et la nucléocapside promeut le bourgeonnement et la libération extracellulaire des particules virales néo-formées, et que cet évènement n'implique pas les complexes ESCRT généralement utilisés par les virus enveloppés, le mécanisme exact du bourgeonnement du CHIKV et des

*Alphavirus* en général reste encore largement inconnu à l'heure actuelle (Taylor et al. 2007, Snyder et al. 2011).

## 4.6. Et chez les vecteurs ?

Les connaissances actuelles sont minces sur le cycle infectieux chez l'insecte. Pour ce qui est des facteurs d'entrée, la sous unité  $\beta$  de l'ATP synthase a été identifiée comme interagissant avec la protéine E2 et lorsque ciblée inhibe l'entrée virale (Fongsaran et al. 2014). Il est intéressant de noter que les facteurs d'entrée constitués par les Héparanes sulfates et les récepteurs aux phosphatidylsérine, identifiés chez les mammifères, n'ont pas d'effet sur l'infection virale des cellules de moustique (Reyes Ballista et al. 2023). De plus Mxra8 n'a pas d'orthologue chez le moustique, l'excluant également. Comme dans les cellules de vertébré, le processus de fusion lors de l'internalisation nécessite une acidification des endosomes (Gay et al. 2012). L'étude la plus avancée concernant les étapes intracellulaires de l'infection chez le moustique ont été réalisées par Jose *et al* en 2017 chez SINV et à partir d'un modèle de lignées cellulaires d'*Ae. albopictus* (Jose et al. 2017a). Les chercheurs ont montré que chez SINV, la formation des complexes de réplifications se fait au contact de vésicules acides contenant les glycoprotéines virales contrairement aux cellules mammifères qui en sont dépourvues. Il a également été observé que chez les cellules de moustiques le bourgeonnement est majoritairement interne au sein de vésicules et non pas à la membrane plasmique. De leurs comparaisons des étapes de réplication et le bourgeonnement, ces chercheurs en ont ainsi déduit un modèle partiel de la réplication au sein de cellules d'insectes (Fig. 19).

Cependant, les difficultés d'utilisation de lignées cellulaires de moustique, tout comme l'imperfection des rares modèles cellulaires disponibles constituent une entrave importante à la compréhension du cycle infectieux chez le vecteur et explique en partie le manque de données sur le sujet. Par exemple la lignée C6/36 utilisée est issue de broyats de larves de moustique au background génétique inconnu. Il est dès lors complexe de cibler un tissu ou un type cellulaire physiologiquement ou génétiquement pertinent avec ces lignées. Des études supplémentaires restent absolument nécessaires pour pouvoir potentiellement dans l'avenir empêcher la propagation de CHIKV par cycles enzootiques.



**Fig. 19** Modèle comparatif de la réplication des Alphavirus chez les cellules mammifères et les cellules d'insectes

Après l'attachement et la liaison au récepteur (étapes 1 et 2), SINV est internalisé par endocytose médiée par la clathrine (étape 3). La fusion à pH acide (étape 4) au sein d'endosomes tardifs libère la nucléocapside (NC). Après la décapsidation (étape 5), les polyprotéines non structurales sont traduites à partir de l'ARNm viral (étape 6). Les protéines non structurales, les protéines de l'hôte ainsi que l'ARN viral forment les complexes de réplication (étape 7) qui répliquent et transcrivent l'ARN viral et induisent la formation de sphérules aux membranes endosomales et plasmiques (étape 8). L'internalisation des sphérules de réplication à partir de la membrane plasmique et la fusion des vésicules ainsi formées avec les lysosomes génère des CPV-I. La polyprotéine structurale traduite à partir de l'ARN sous-génomique (étape 9) est maturée en protéine de capsid (CP) et en précurseur polyprotéique d'enveloppe. Celui-ci est transloqué vers le RE (étape 10), clivées par la signalase (étape 11) et glycosylées, puis transportées à travers le complexe de Golgi, où le clivage de la furine sépare E3 de E2 (étape 12) et permet le transit vers la membrane plasmique via la voie sécrétoire. Les protéines C, se lient à l'ARN génomique pour former le NC (étape 13) qui se lie aux pointes de glycoprotéines sur la MP et le virus bourgeonne à partir de la MP (étape 14). Les structures du CPV-II qui contiennent les glycoprotéines et les nucléocapsides associées proviennent du Golgi et s'accumulent dans les cellules à un stade avancé de l'infection. Dans les cellules de moustiques, les sphérules de réplication ne sont présentes que sur de grandes vésicules internes qui contiennent également des nucléocapsides et des particules virales bourgeonnantes internes. Les vésicules contenant des glycoprotéines sont internalisées à partir de la membrane plasmique et la fusion de vésicules internalisées de petite taille permet la formation de larges vacuoles cytopathiques. Les particules virales bourgeonnent au sein des grandes vacuoles cytopathiques (étape 15), qui contiennent également des sphérules de réplication et des nucléocapsides. Les virions bourgeonnants s'accumulent dans la lumière de ces grandes vésicules. Des sphérules situées à la membrane plasmique et la distinction nette entre CPV-I et CPV-II ne sont pas observées chez les cellules de moustiques. Issu de (Jose et al. 2017b).



## 5. Protéines Virales

Dans cette section, nous détaillerons les fonctions canoniques et non canoniques des protéines structurales et non structurales des *Alphavirus* et du CHIKV lorsque celles-ci ont été explorées spécifiquement.

### 5.1. Protéines structurales

#### a. Protéine C

La protéine C isolée est une petite protéine de 35KDa qui a pour rôle principal de s'auto assembler pour former la capsid qui va protéger l'ARN viral. Son extrémité C terminale contient un domaine sérine protéase qui va lui permettre de s'auto-cliver et de se libérer de la polyprotéine structurale (Melancon and Garoff 1987). L'extrémité N terminale quant à elle contient deux régions aux activités différentes. La région I structurée en hélice  $\alpha$ , et riche en résidus basiques, est impliquée dans la dimérisation des protéines de capsides par interactions entre superhélices (Perera et al. 2001). La région II, riche en acides aminés basiques, est impliquée dans l'interaction avec l'ARN viral et son recrutement dans la nucléocapside (Owen and Kuhn 1996). La visualisation par cristallographie de la structure de la nucléocapside de CHIKV, a montré que le domaine protéase de la protéine C est replié dans une poche hydrophobe et que cette conformation permet l'interaction avec la queue cytoplasmique de E2. Cette interaction serait cruciale au bourgeonnement (Sharma et al. 2018b).

Enfin, cette protéine, possède des signaux de trafic vers le noyau (NLS) et hors du noyau (NES). Chez CHIKV ces régions sont situées respectivement sur les résidus 60-99 et 143-155 (Thomas et al. 2013). On ignore en grande partie le rôle du trafic de la protéine C de CHIKV vers le noyau. Si dans le cas des *Alphavirus* encéphalitiques du nouveau monde, il a été montré que ce trafic induisait un arrêt de la transcription cellulaire, ce n'est pas le cas pour CHIKV (Garmashova et al. 2007).

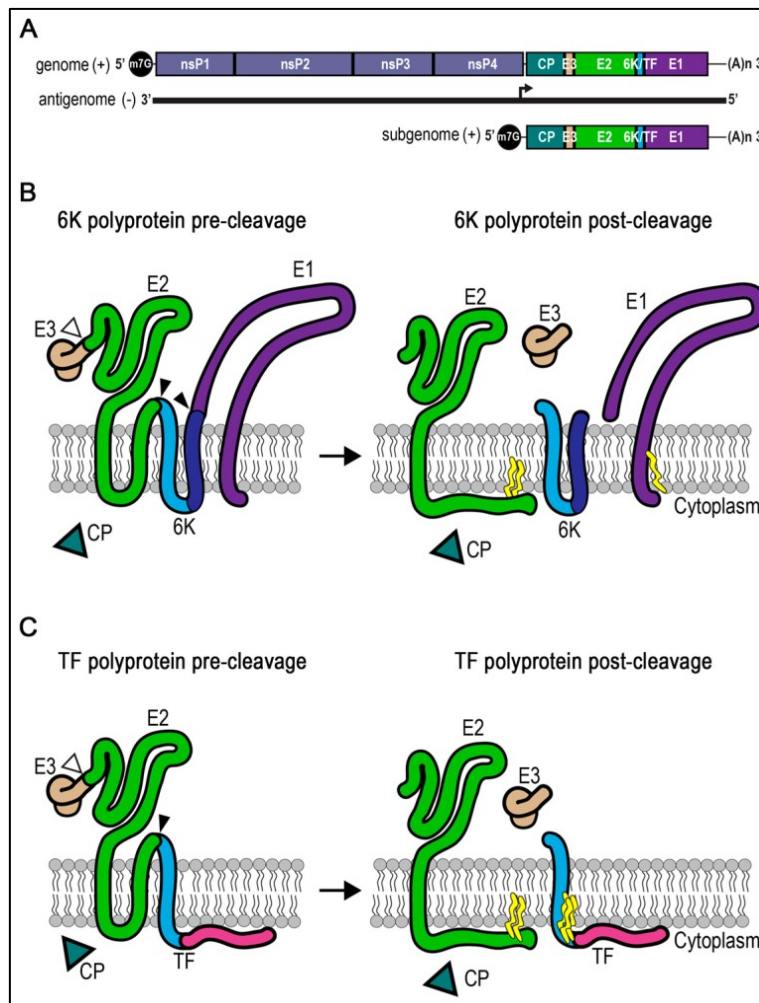
#### b. 6K et TF

Pendant de nombreuses années, le gène 6K était uniquement associé à la production d'une petite protéine de 6 kDa nommée 6K. Cependant en 2008 il a été montré que la

présence d'un site de décalage ribosomique permettait la production d'une protéine alternative nommée TF (Transframe) (Firth et al. 2008). Le rôle de la protéine 6K est relativement peu connu, on sait que cette protéine est fortement acétylée et qu'elle est présente au sein des particules virales bourgeonnantes (Welch and Sefton 1980). De plus on pense que 6K possède deux domaines transmembranaires essentiels à la maturation de la poly-protéine structurale (Fig. 20). Ainsi la protéine 6K a été observée au sein des cellules infectées au niveau des membranes du RE, du Golgi et de la membrane plasmique (Ramsey and Mukhopadhyay 2017). De plus, il a été montré que les mutations de cette protéine diminuent fortement la production virale via des perturbations du bourgeonnement (Loewy et al. 1995). Par la suite, il a été établi que l'interaction de 6K avec la glycoprotéine E2 au cours du cycle viral participe à la maturation de cette dernière ce qui pourrait expliquer les perturbations de bourgeonnement observées chez les mutants 6K. De plus, la mutation de 6K génère des mutations compensatoires pouvant apparaître sur E2 pour restaurer le bourgeonnement (Ivanova et al. 1995). L'autre fonction connue de 6K est son rôle de canal ionique. C'est une viroporine (une pore cellulaire d'origine virale) qui permet le passage d'ions à travers la double couche lipidique (Antoine et al. 2007). Il est intéressant de noter que la concentration en ions monovalents est cruciale pour la régulation du bourgeonnement, en influençant le réarrangement de la protéine E2 (Melton et al. 2002).

La protéine TF est elle aussi relativement peu connue. Il est estimé que le décalage ribosomique nécessaire à sa synthèse se produit dans 10 et 18% des événements de traduction. Elle partage le domaine N terminal de la protéine 6K mais possède un domaine C terminal unique issu de la séquence du gène E1 (Firth et al. 2008). Elle conserve également sa fonction de canal ionique (Snyder et al. 2013). La protéine TF contrairement à 6K subit des modifications post traductionnelles, notamment des palmitoylations sur son domaine N terminal, ce qui promeut sa localisation à la membrane plasmique et au sein des particules virales (Ramsey et al. 2017). La présence de la protéine TF n'est pas essentielle dans la réplication du génome ou le trafic des protéines d'enveloppe. Cependant dans un modèle *in vivo*, cette absence se traduit par une diminution drastique de la virulence (Snyder et al. 2013, Kendra et al. 2017). Une des explications possibles à ce phénotype a été apportée récemment par

Rogers *et al* qui ont montré que TF à un rôle antagoniste à la réponse IFN-I, et que cette fonction est corrélée à la palmitoylation de TF (Rogers et al. 2020).



**Fig. 20 Maturation de la polyprotéine des Alphavirus.**

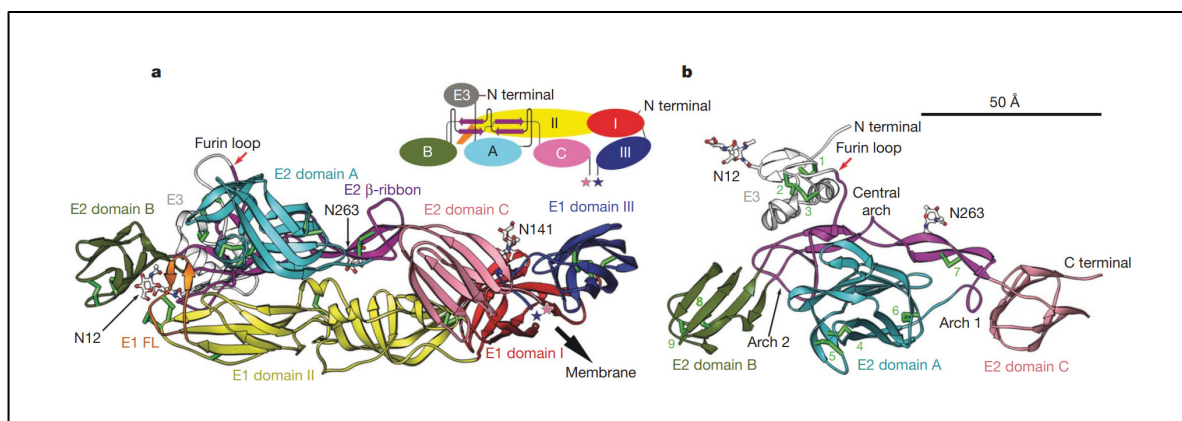
(A) Le génome des Alphavirus à ARN positif comporte deux cadres de lecture. À l'extrémité 5' se trouve la coiffe méthyl-7-guanosine (m7G), suivie des cadres de lecture des protéines non structurales (nsP) et des protéines structurales, ainsi que de la queue poly A en 3'. Au cours de la réplication, l'ARN viral de polarité négative est utilisé comme modèle pour produire l'ARN sous-génomique à partir d'un promoteur sous-génomique interne (flèche). Les protéines structurales sont traduites à partir de la transcription subgénomique. (B, C) Conformation de la polyprotéine structurale avant clivage dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE). La capsid (CP) est d'abord libérée sous forme de protéine soluble dans le cytoplasme. L'extrémité N-terminale de l'E3 contient une séquence de signal qui dirige la translocation à travers la membrane. Les flèches blanches indiquent le site de clivage de la furine entre E3 et E2, qui se produit dans le réseau transgolgien. Les autres protéines de l'enveloppe traversent la membrane grâce à l'insertion de domaines transmembranaires. Les flèches noires marquent les sites de clivage de la signalase qui sont utilisés dans le RE. Les conformations post-clivage comprennent des sites de palmitoylation (en jaune). (B) La polyprotéine 6K est le produit de traduction majoritaire. (C) La forme TF de la polyprotéine est le produit minoritaire résultant d'un décalage de cadre dans le gène 6K, et n'inclut pas E1. Issu de (Ramsey and Mukhopadhyay 2017).

## c. Protéines d'enveloppes

Les protéines constitutives de l'enveloppe virale sont transmembranaires, glycosylées et palmitoylées. Ces protéines sont insérées dans un double feuillet lipidique dérivé de la membrane plasmique cellulaire. L'enveloppe virale contient 240 copies des deux protéines E1 et E2 présentes en proportions identiques et formant des hétérodimères. Ces hétérodimères s'assemblent eux même en trimères à la surface des virions et sont clés dans le processus d'internalisation (Chen et al. 2018a).

La protéine E1, est une protéine de 47 kDa composée de trois domaines riches en feuillets  $\beta$  (I, II et III) (Fig. 21). C'est le deuxième de ces domaines qui contient le peptide de fusion exposé lors de l'acidification des endosomes (Li et al. 2010b).

La protéine E2, de taille similaire (47 kDa) est composée de trois domaines : un ectodomaine (A), une région en tige (B) et d'une région transmembranaire en hélice  $\alpha$  (C). C'est cette protéine qui est clé dans la reconnaissance des récepteurs cellulaires par le virion (Weger-Lucarelli et al. 2016). De plus, les mutations dans la séquence des régions A et B sont associées à des éléments clés de l'infection comme le tropisme cellulaire ou la pathogénicité (Voss et al. 2010). De manière surprenante, il a été montré que l'expression ectopique ou dans le cadre d'une infection de E2 induit la formation d'extensions intercellulaires. Ces structures contenant de l'actine et de la



**Fig. 21 Structure de l'hétérodimère p62-E1.**

(A) Diagramme en ruban de l'hétérodimère p62-E1. Les domaines I, II et III de E1 sont représentés respectivement en rouge, jaune et bleu, et la boucle de fusion (FL) en orange. Les domaines E3 (blanc/gris), ainsi que les sous-domaines A (cyan), B (vert), C (rose) et le feuillet  $\beta$  (violet) de E2 sont indiqués. La flèche noire pointe vers la membrane virale. (B) Organisation de p62, orientée approximativement à 90 degrés par rapport à (a) D'après (Weger-Lucarelli et al. 2016).



tubuline pourraient permettre la transmission intercellulaire de SINV (Martinez and Kielian 2016, Yin et al. 2023a).

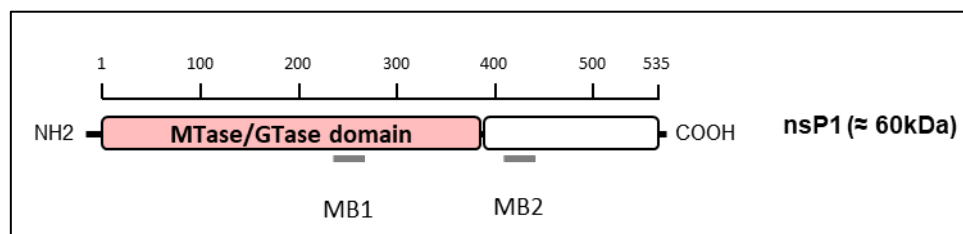
En comparaison, le rôle de la protéine E3 est relativement méconnu. Cette petite protéine de 10 kDa, pourrait agir en tant que chaperone de E2 lors de l'assemblage du dimère E1/E2, protéger la conformation de E1 lors de changements de Ph et interagir avec le récepteurs Mxra8 (Snyder and Mukhopadhyay 2012, Uchime et al. 2013, Basore et al. 2019a).

## 5.2. Protéines non-structurales

Les protéines non structurales sont les enzymes virales. Elles sont essentielles à la formation du complexe de réplication viral. Cependant ces protéines ont également d'autres fonctions considérées comme non canoniques qui jouent également un rôle important lors de l'infection.

### a. nsP1

La protéine nsP1 est composée de 535 acides aminés et un poids de 60 kDa (Fig. 22). Cette protéine possède de nombreuses fonctions dans un le cadre du cycle viral. Il a notamment été montré récemment que cette protéine est capable de s'auto assembler en dodécamère pour former le col des organelles de réplication. Ici seront abordées trois de ses fonctions principales. La capacité de déformation membranaire de nsP1 ainsi que sa contribution à la formation de sphérules seront décrites plus loin dans la section 6 et 7 de ce chapitre (Chapitre 1.6.2.c et Chapitre 1.7.2).



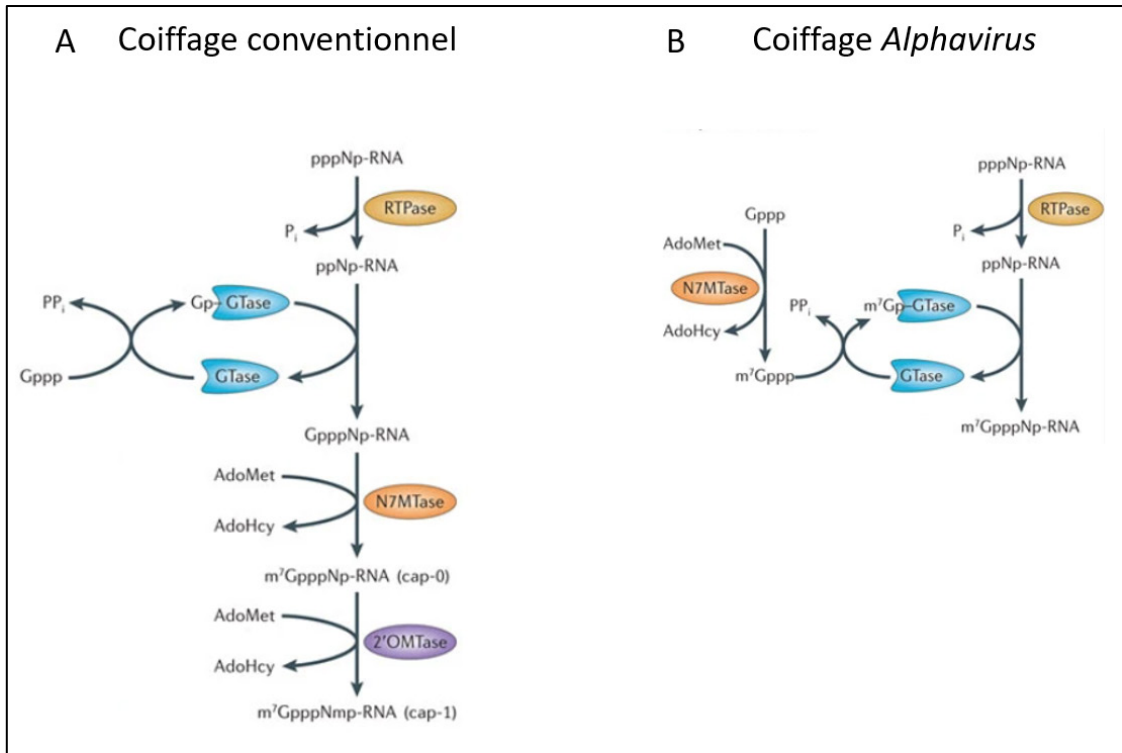
**Fig. 22 Organisation de la protéine nsP1**

*La protéine nsP1, fais approximativement 60kDa. Le domaine MB1 correspond à la séquence 245-268 structurée en hélice  $\alpha$  permettant l'ancrage membranaire. Le domaine MB2 correspond à la séquence 417-419 comprenant trois cystéines palmitoylés responsables de l'adressage membranaire de la protéine.*

## Coiffage des ARN viraux

La première fonction qui a été identifiée pour nsP1 chez les *Alphavirus* est son rôle dans le coiffage des ARN viraux. Ce processus est différent de celui impliqué dans le coiffage des ARN cellulaires. Dans ce cas-là une ARN triosephatase (RTPase) va prendre en charge l'ARN, puis une GTase va permettre le transfert d'un groupement GMP issu d'un Guanosine triphosphate (GTP) vers à l'extrémité 5'. Enfin, une méthyltransférase (MTase) transfère un groupement Méthyl depuis une S-adenosyl-méthionine vers la guanine en 5' (Decroly et al. 2011). Dans le cas du coiffage des *Alphavirus*, nsP1 possède un domaine MTase qui permet le transfert d'un groupement méthyl depuis une molécule de S-adénosylméthionine vers un GTP permettant la formation d'un complexe nsP1-m<sup>7</sup>GMP (Laakkonen et al. 1994). Par la suite ce processus se poursuit via l'activité GTase de ce même domaine ce qui va permettre le transfert de la guanosine méthylée à l'extrémité 5' de l'ARN néosynthétisé (Fig. 23). Cette réaction nécessite cependant l'action de la protéine nsP2 qui permet le clivage du phosphate gamma en 5' de l'ARN naissant via son activité ARN triphosphatase (RTPase) (Ahola and Kääriäinen 1995).

Ce domaine MTase/GTase de la protéine nsP1 est crucial, et certains résidus ont été identifiés comme critiques pour le processus de capping. Des expériences ont montré par exemple que des mutations sur les sites D64, D90, R93 and C135 empêchaient l'activité de capping chez SINV (Wang et al. 1996). En parallèle, chez SFV, il a été montré qu'une mutation sur le site H38 avait pour effet d'inhiber l'activité GTase mais pas l'activité MTase de la protéine (Ahola et al. 1997). De plus il a été prouvé que l'activité de capping de nsP1 est absolument nécessaire à la réplication virale. Le fait que le processus de capping viral soit très différents du capping cellulaire, fait que le ciblage de cette étape du cycle cellulaires soit apparu comme prometteur dans le développement de nouveaux traitements antiviraux (Chapitre1.6.c) (Gigante et al. 2014, 2017, Delang et al. 2016). Cette approche a constitué une partie de mes travaux de thèse (Chapitre2.3).



**Fig. 23 Réactions de coiffage cellulaire et chez les *Alphavirus***

(A) La structure *cap-0* est formée sur les d'ARN naissants par l'action séquentielle de trois enzymes. Tout d'abord, l'ARN triphosphatase (RTPase) hydrolyse le  $\gamma$ -phosphate de l'ARN naissant (pppNp-ARN, où N désigne le premier nucléotide transcrit et p un groupe phosphate) pour produire un ARN diphosphate (ppNp-ARN) et du phosphate inorganique (Pi). Ensuite, la guanylyltransférase (GTase) réagit avec l' $\alpha$ -phosphate du GTP (Gppp), libérant le pyrophosphate (PPi) et formant un intermédiaire covalent enzyme-guanylate (Gp-GTase). La GTase transfère ensuite la molécule de GMP (Gp) à l'ARN 5'-diphosphate pour créer l'ARN GpppNp. Lors de la dernière étape, la (guanine-N7)-méthyltransférase (N7MTase) transfère le groupe méthyle de la S-adénosyl-L-méthionine (AdoMet) à la guanine de coiffe pour former la structure *cap-0*, 7-méthyl-GpppNp ( $m^7$ GpppNp), et libère la S-adénosyl-L-homocystéine (AdoHcy) en tant que sous-produit. La réaction de coiffage est complétée par la méthylation de la position ribose-2'-O du premier nucléotide par la (nucléoside-2'-O)-méthyltransférase dépendante de l'AdoMet (2'OMTase), générant la structure *cap-1* ( $m^7$ GpppNm<sup>2'</sup>-Op).

(B) Mécanisme de coiffage des *Alphaviridae*. L'ARN triphosphatase (RTPase) hydrolyse le  $\gamma$ -phosphate de l'ARN viral pour obtenir un ARN diphosphate (ppNp-ARN) et Pi. Une molécule de GTP est méthylée en position N7 par la N7MTase dépendante de l'AdoMet. La GTase lie alors le N7-méthyl-GTP ( $m^7$ Gppp), formant un lien covalent avec une histidine catalytique ( $m^7$ Gp-GTase) et libérant le PPi. La GTase transfère ensuite la molécule de  $m^7$ GMP ( $m^7$ Gp) à l'ARN 5'-diphosphate pour créer l'ARN  $m^7$ GpppNp. L'encadré indique les virus qui acquièrent leur structure de coiffe en utilisant une telle voie de coiffe. Modifié à partir de (Decroly et al. 2012).

Il est cependant nécessaire de nuancer l'importance du capping viral. En effet il a été montré qu'une partie de des ARNs viraux de SINV n'étaient pas coiffés. La production d'ARN non coiffés au début de cycle viral est apparu comme nécessaire à l'établissement de l'infection virale (Sokoloski et al. 2017). En effet, la diminution de ces ARN viraux non coiffés induit une diminution du nombre de particules virales produites (LaPointe et al. 2018b). En parallèle la même équipe a démontré que

l'efficacité du coiffage lors d'infections *in vivo* avait un effet important sur la virulence et la sensibilité immunitaire. En effet il a été observé que diminuer la proportion d'ARN non coiffés induisait une légère mortalité et une plus forte sensibilité à l'IFN-I. A l'inverse augmenter cette proportion abolit toute mortalité et induit une plus forte résistance à l'IFN-I (LaPointe et al. 2020) Ainsi on peut supposer que ces ARN non coiffés ont un rôle de contrôle de l'immunité antivirale similaire aux sfRNA des Flavivirus (Slonchak and Khromykh 2018).

### **Ancrage Membranaire**

La protéine nsP1 est également connue comme étant la seule protéine du complexe de réplication à pouvoir s'ancrer à la membrane cellulaire. En effet il a été observé dès 1995 que cette protéine avait une affinité particulière pour la membrane plasmique et les enveloppes d'endosomes (Ahola and Kääriäinen 1995). La première explication pour l'affinité membranaire de nsP1 est la présence conservée d'un domaines contenant, selon les *Alphavirus*, une à trois cystéines palmitoylées dans la région C terminale de la protéine (417-419) (Laakkonen et al. 1996). La palmitoylation est une modification post traductionnelle réversible qui permet l'association de diverses protéines aux membranes cellulaires. Ces modifications permettent l'adressage des protéines marquées à différentes membranes (plasmique, mitochondriale etc.) et même à certains domaines lipidiques précis (Wang et al. 2020b). Pendant de nombreuses années les acteurs cellulaires responsables de la palmitoylation de nsP1 sont restés inconnus. Le rôle des palmitoyltransferases à doigt de zinc ZDHHC2 et ZDHHC19 a récemment été identifié (Zhang et al. 2019). L'importance de ce domaine ne semble toutefois pas universelle chez les *Alphavirus*. D'une part il a été montré chez SINV et SFV que des mutations des cystéines palmitoylées avaient peu d'effet sur la réplication virale (Ahola et al. 2000, Žusinaite et al. 2007). A l'inverse chez CHIKV la présence de ce motif est cruciale à la réplication virale et à l'ancrage membranaire. De plus notre équipe a récemment démontré que la présence de ce groupement palmitoylé permettait l'adressage de nsP1, et de l'ensemble des protéines non-structurelles dans des ilots riches en cholestérol de la membrane plasmique nécessaire au bon fonctionnement de la machinerie de réplication virale (Bakhache et al. 2020). Cette localisation a par la suite été confirmé par Lasswitz *et al.* (Lasswitz et al. 2022)

Le fait que l'ancrage membranaire de nsP1 pouvait dans le cas de SINV, perdurer malgré des mutations du domaine de palmitoylation a amené à des investigations plus approfondies. En 1999, une approche de mutagenèse permet de découvrir un second domaine d'interaction membranaire dans la région centrale de la protéine (245-268) (Ahola et al. 1999). Cette région a été par la suite identifiée comme une structure en hélice- $\alpha$  permettant un ancrage amphipatique à la membrane (Lampio et al. 2000). Notamment la présence d'un tryptophane W249 capable de s'insérer dans le feuillet lipidique a été suggérée comme un déterminant additionnel de l'interaction de nsP1 avec les membranes cellulaires. Récemment le paradigme de la fonction d'ancrage de nsP1 a été bouleversé par la capacité de nsP1 à former un anneau dodécamérique au niveau des membranes plasmiques (Jones et al. 2020a, Zhang et al. 2021). Cette organisation induit un mode d'interaction complexe avec les bicouches lipidiques. Ce nouveau modèle et ses implications seront discutés plus loin dans la section 7 de l'introduction (Chapitre 1.7.2).

### **Interaction avec la réponse interféron**

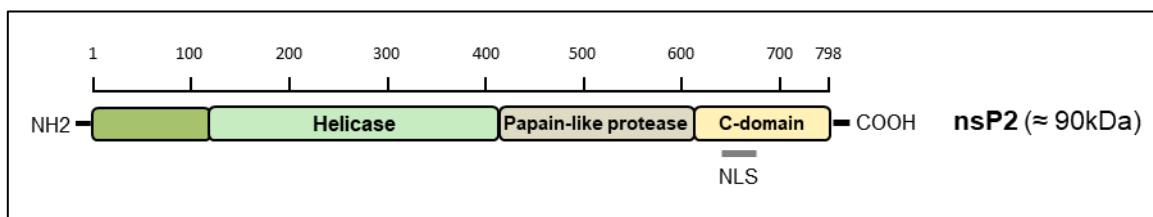
Plusieurs observations suggèrent la contribution de nsP1 dans la stratégie d'évasion immunitaire des *Alphavirus*. Tout d'abord dans le cas de RRV, il a été observé que chez la souris, nsP1 était associé aux niveaux d'inflammation *in vivo* (Jupille et al. 2011). Il a été montré par la suite que cet effet était tissu spécifique et qu'il était associé à une modulation de la sensibilité à l'IFN-I (Stoermer Burrack et al. 2014). En effet, il apparaît que nsP1 peut moduler la réponse IFN $\alpha$  des monocytes tissus infectés (Haist et al. 2017).

Une autre piste de l'implication de nsP1 dans la régulation immunitaire est son action sur l'expression de tetherine. La tetherine est une protéine codée par le gène BST2 et fait partie des gènes stimulés par voie interféron. Elle contribue à l'inhibition du bourgeonnement de virus enveloppés tels que VIH, SARS-CoV2 et le virus influenza aviaire (Casartelli et al. 2010, Stewart et al. 2022). Lors de l'infection par le CHIKV la tetherine agit comme facteur de restriction en inhibant le bourgeonnement. Il a été montré que nsP1 colocalise avec la tetherine et diminue l'expression de cette protéine (Jones et al. 2013). Cependant ces observations ont été contestées dans une seconde étude qui n'a pas montré d'effet de nsP1 sur la régulation de la tetherine (Wan et al. 2019).

Enfin, il a été montré que nsP1 pouvait cibler la réponse interféron en inhibant la voie cGAS-STING. Cette voie est usuellement mobilisée via la détection par la protéine cGas d'ADN double brin ou d'hybrides ARN-ADN (Webb and Fernandez-Sesma 2022). On ignore exactement par quel moyen s'effectue la restriction de CHIKV par cette voie, cGas ne détectant pas les ARN double brins (Civril et al. 2013, Sali et al. 2015). Toutefois il a été observé récemment que la protéine nsP1 avait un rôle antagoniste dans l'activation de cette voie. En effet nsP1 peut interagir avec la protéine STING, qui est un capteur d'ADN cytosolique, acteur critique de l'immunité antivirale via la voie cGas-STING. Cette interaction induit une stabilisation de l'expression de nsP1 (Webb et al. 2020).

## b. nsP2

nsP2 est la protéine qui a le plus haut poids moléculaire au sein du complexe de réplication viral, avec une masse de 90 kDa (Fig. 24). nsP2 est localisée principalement à la membrane plasmique mais aussi dans le noyau. Cette protéine possède de nombreuses fonctions associées à différents domaines enzymatiques. En N-terminal, cette protéine possède des domaines hélicase, nucléoside triphosphatase (NTPs), et RTPase. En C-terminal, elle possède un domaine protéase et MTase (Russo et al. 2006).



**Fig. 24 Organisation de la protéine nsP2**

*La protéine nsP2, fait approximativement 90kDa. Le domaine NLS correspond à la séquence d'adressage nucléaire de la protéine (648-PRRRV-652).*

### Activité protéase de nsP2

Le domaine protéase de nsP2 responsable de la maturation de la polyprotéine virale est structurée de manière similaire à la famille des protéases de type Papaïne. Lors de la maturation de cette polyprotéine, les clivages de P1234 et de P12 se font en *cis*. A l'inverse le clivage de P123 se fait en *trans*. L'activité protéase de nsP2 a été

montrée comme essentielle à l'infection, des mutations dans ce domaine ayant complètement aboli la réplication virale (Lulla et al. 2006, Balistreri et al. 2007). De plus il a été montré récemment que l'activité protéase de nsP2 était également dépendante d'un interdomaine permettant la flexibilité de la structure protéique. Cette séquence située entre les résidus 463 à 476 est en partie conservée chez les *Alphavirus*, en particulier la 468-FQNKAN-476(Law et al. 2021).

### **Activité hélicase de nsP2**

L'appartenance de nsP2 à la superfamille des hélicases a dans un premier temps été identifié par bio-informatique (Gorbalenya and Koonin 1993). Des expériences in vitro ont ensuite confirmé cette fonction sur des ARN double brins, en observant la déshybridation des deux brins, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. Le modèle actuel considère que cette fonction permet une meilleure séparation entre l'ARN génomique et subgénomique et le brin complémentaire pour faciliter l'accès de la polymérase virale nsP4 aux promoteurs viraux (Gomez de Cedron et al. 1999, Das et al. 2014b). L'activité hélicase est endergonique, elle nécessite un apport énergétique pour avoir lieu. Coïncidemment, nsP2 possède un domaine ATPase qui semble essentielle à la fonction hélicase (Das et al. 2014b).

### **Activité ARN triphosphatase**

L'activité ARN triphosphatase de nsP2 hydrolyse le phosphate- $\gamma$  situé en 5' des brins d'ARN néosynthétisés. Cet événement est essentiel au coiffage de ces ARN par nsP1 comme évoqué plus haut (Rikkonen 1996, Vasiljeva et al. 2000).

### **Évitement immunitaire**

nsP2 est le principal acteur dans l'arsenal des *Alphavirus* permettant de mettre en place une stratégie d'évitement immunitaire. En premier lieu, il a été montré que nsP2 peut transloquer dans le noyau. Cette capacité de nsP2 à transloquer peut être imputée à la présence du peptide d'adressage nucléaire (NLS : 648-PRRRV-652) et d'un résidu arginine-649 critique au centre de la protéine (Rikkonen et al. 1992, Rikkonen 1996). Une fois dans le noyau nsP2 est capable de cibler plusieurs voies immunitaires. D'une part nsP3 est capable d'établir un arrêt transcriptionnel cellulaire durant l'infection (Gorchakov et al. 2005). C'est la dégradation de Rpb1, une sous unité de l'ARN Polymérase II, par nsP2 qui en est responsable (Akhrymuk et al. 2012). Cette dégradation, est la principale cause de la cytotoxicité des *Alphavirus* qui entraîne la

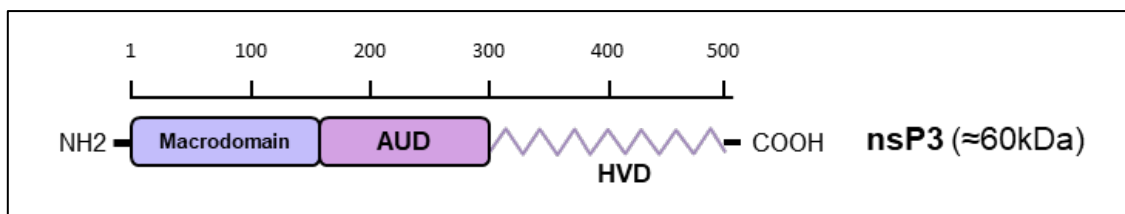
mort cellulaire par apoptose (Akhrymuk et al. 2018). D'autre part nsP2 est également capable d'inhiber la phosphorylation de la protéine STAT1 (Fros et al. 2010). Cette protéine est impliquée dans plusieurs voies de signalisation, notamment la voie JAK-STAT. Lors de sa phosphorylation STAT1 acquiert un rôle de transducteur de signal et se relocalise dans le noyau où elle va augmenter l'expression de certains gènes. STAT1 peut ainsi induire l'expression de certains gènes stimulés par interféron et induire une réponse antivirale. Le ciblage de STAT1 par nsP2 permet donc directement de diminuer la réponse antivirale cellulaire. Enfin il a été montré que le domaine MTase de nsP2 induisant un export nucléaire de phospho-STAT1 par la voie CRM1 (Goertz et al. 2018). De ce fait, nsP2 peut dépléter la réponse immunitaire par deux moyens l'inhibition de de STAT1 et son export depuis le noyau vers le cytoplasme.

### **c. nsP3**

nsP3 est une protéine modulaire de 60 kDa divisée en trois domaines : un macrodomaine N terminal (MD) similaire aux macrodomaines retrouvés dans certaines protéines cellulaires telles que certaines histones ; un domaine central unique à chaque *Alphavirus* (AUD) contenant une structure en doigt de zinc , capable de lier l'ARN viral; un domaine C terminal hypervariable en longueur et en séquence (HVD) spécifique à chaque *Alphavirus* (Fig. 25). Le domaine MD est extrêmement conservées dans chez les *Alphavirus* et chez les virus à ARN simple brin positif de manière plus large. Ce domaine possède une double activité d'hydrolyse et de fixation des ADP-riboses qui apparait comme critique dans le cas de nombreux virus (Rack et al. 2016). De manière similaire le domaine central AUD est également assez conservé chez les *Alphavirus* (Gao et al. 2019). A l'inverse le domaine HVD montre une faible conservation de séquence et de taille entre les différents *Alphavirus*, y compris au sein de groupes phylogéniques proches. Ce site désordonné, se montre très permissif pour l'insertion de mutations ce qui en a fait un site privilégié pour l'insertion de marqueurs cellulaires (Foy et al. 2013). Deux résidus phosphorylés en particulier en position 319 et 368 ont été montré comme essentiel à la réplication (Vihinen and Saarinen 2000, Vihinen et al. 2001). Il semble également que la séquence de HVD ait une influence sur l'internalisation des complexes de réplifications. En effet une étude a montré qu'invertir les séquences HVD de SFV et de CHIKV avait pour effet de favoriser l'internalisation des complexes sous forme de CPV-I chez ce dernier (Thaa et al. 2015).



Lors de l'infection, nsP3 est détectée à plusieurs localisations cellulaires qui varient au cours du temps. D'une part on peut l'observer à la membrane plasmique en association avec le complexe de réplication viral dans les étapes précoces du cycle viral. Chez certains *Alphavirus*, elle peut également être détectée à la membrane vésiculaire des CPV dans les régions périnucléaires lors des étapes tardives (Cristea et al. 2006). D'autre part une sous population se localise au sein d'agrégats cytoplasmiques en association avec des facteurs cellulaires (Peränen et al. 1988, Foy et al. 2013). Cette protéine a longtemps été considérée comme une protéine adaptatrice, dépourvue d'activité enzymatique, servant uniquement au recrutement des cofacteurs cellulaires de la réplication virale. Cependant des recherches récentes ont apporté un éclairage nouveau sur cette question. Les fonctions connues de nsP3 sont les suivantes.



**Fig. 25 Organisation de la protéine nsP3**

*La protéine nsP3, fait approximativement 60kDa. Le domaine HVD est structurée de manière désordonnée est fortement variable entre espèces virales.*

### Activation de la voie PI3K-Akt-mTOR

La mobilisation de la voie anti apoptotique PI3K-Akt-mTOR par les *Alphavirus* est essentielle pour la réplication. Dans le cas de SINV, l'infection active fortement cette voie (Mohankumar et al. 2011). Cette activation a récemment été attribuée à nsP3 qui contient un motif YXXM dans son domaine HVD. Cette séquence permet la fixation de la sous unité p85 de PI3K et imite ainsi les signaux induits par des facteurs de croissance. Etant donné la localisation membranaire de PI3K, cette interaction aurait lieu lorsque nsP3 est associée au niveau de la membrane plasmique avec les autres nsPs (Mazzon et al. 2018). Les conséquences de la mobilisation de la voie PI3K-Akt-mTOR par les *Alphavirus* sont multiples. D'une part la suractivation de cette voie par RRV a pu être associée à la sévérité de la pathogénèse in vivo pour le cas de RRV. D'autre part elle a pour effet de modifier le métabolisme cellulaire. L'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR par la protéine nsP3 de SFV diminue la glycolyse et favorise la

voie des pentose phosphate stimulant alors la production de précurseurs d'acides aminés et d'acides gras par la cellule hôte (Mazzon et al. 2018). De plus cette voie est supposée comme impliquée dans l'internalisation des sphérules dans les CPV-I, comme cela été observé dans le cas de SFV (Spuul et al. 2010, Thaa et al. 2015). De plus en comparaison, CHIKV qui active cette voie à un niveau légèrement plus restreint, internalise peu ses sphérules via les CPV-I (Thaa et al. 2015). Tout cela montre la capacité de nsP3 à manipuler cette voie pour favoriser la survie et la multiplication virale.

### **Association avec les facteurs de granules de stress.**

Comme mentionné précédemment, outre sa présence au sein du complexe de réplication, dans les cellules infectées, nsP3 est détectée sous la forme d'agrégats cytoplasmiques (Peränen et al. 1988). Ce même phénotype est observé lors de l'expression ectopique de nsP3. Dans le cas du SINV, l'analyse des agrégats purifiés a démontré la présence de 35 facteurs cellulaires dont notamment les protéines G3BP-1 et G3BP-2 (Ras GTPase-activating protein-binding proteins) (Cristea et al. 2006). Ces résultats ont par la suite été confirmés chez CHIKV et d'autres *Alphavirus* (Fros et al. 2012, Frolov et al. 2017). Les protéines G3BPs sont essentielles à la formation de structures nucléoprotéiques nommées granules de stress (SGs) (Kedersha et al. 2016). L'agrégation des SGs constitue un mécanisme de défense mis en place dans les cellules soumises à un stress tel que les infections virales. Il s'agit d'un phénomène réversible entraînant l'agrégation des facteurs d'initiation de la traduction et des polysomes dans des granules cytoplasmiques. Ce mécanisme bloque ainsi toute traduction d'ARNm jusqu'à la résolution du stress (Buchan and Parker 2009). L'agrégation des SGs est délétère pour les virus qui utilisent la machinerie traductionnelle de leur hôte pour se multiplier. Cette situation a conduit à l'acquisition de contremesures virales. Chez les *Alphavirus* ces stratégies d'évitement divergent. Pour les virus OW, la formation des SGs est empêchée par la séquestration de G3BP1 et G3BP2 par nsP3 et l'agrégation de ces protéines dans des granules cytosoliques virales contenant également la protéine nsP2 mais pas les autres protéines non structurales (Panas et al. 2015, Scholte et al. 2015). Cette interaction est médiée par 2 motifs FGDF très conservée dans le domaine HVD, au sein duquel les résidus phénylalanine sont critiques. Certaines exceptions ont toutefois été décrites récemment par notre équipe, en particulier pour MAYV dont l'un des motifs FGDF est

remplacé par une séquence FGAP (Neyret et al. 2022). Ces travaux auquel j'ai participé sont présenté en Annexe.

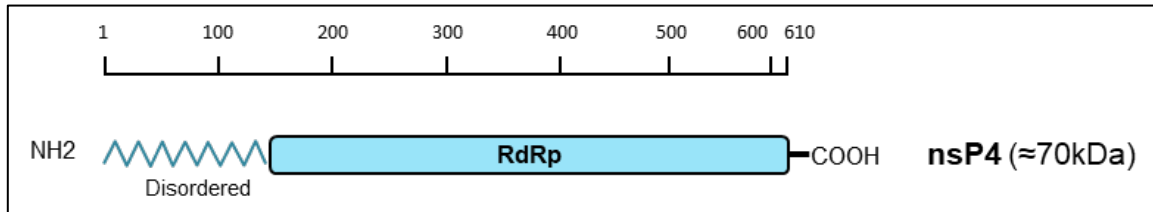
CHIKV présente une particularité en étant dépendant de cette interaction G3BP-nsP3 contrairement à SFV (Scholte et al. 2015, Kim et al. 2016). En effet, la perte de cette interaction, consécutive soit à l'inhibition de l'expression de G3BP1 et G3BP2 ou à la mutation domaine HVD est néfaste à la réplication virale. Cette observation, ainsi que le recrutement des isoformes de G3BP sur le site de la réplication virale suggère fortement que ces protéines cellulaires interagissent avec le précurseur P123 et l'ARN viral, et contribuent à la formation et/ou la maintenance des organelles de réplication (Kim et al. 2016). De plus les protéines G3BPs sont capable d'interagir avec la sous unité ribosomale 40S ce qui laisse supposer leur contribution dans le recrutement des facteurs de traduction à proximité des sites de réplication, permettant une traduction rapide des ARNs néosynthétisés après leur export des sphérules (Götte et al. 2019). Cette contribution à la formation des sphérules de réplication sera décrite plus en détail dans la section 7 ce chapitre (Chapitre 1.7.2).

### **ADP ribosylation des ARN viraux.**

Comme mentionné précédemment, le domaine MD permet l'association de nsP3 avec des ADP riboses. L'ADP ribosylation est une modification post-traductionnelle impliquée dans de nombreux processus cellulaires essentiels comme la réparation de l'ADN, l'expression génique, la dégradation protéique ou la régulation de l'apoptose. Chez les organismes eucaryotes cette modification réversible est générée par les poly-ADP ribose polymérases (PARP). Dans un contexte cellulaire, elles sont hydrolysées par la poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG). De études récentes ont montré que le domaine MD de nsP3 est capable de se reconnaître le mono(ADP-ribose) et poly(ADP-ribose) et également d'effacer ces marques par hydrolyse. Cette capacité est essentielle à la réplication virale et a été associée au niveau de virulence *in vivo* (McPherson et al. 2017, Abraham et al. 2018, 2020). L'ADP ribosylation étant essentielle à la formation des SGs, cette fonction jouerait un rôle crucial dans l'inhibition de leur formation via l'ADP-ribosylation des protéines G3BPs (Jayabalan et al. 2021). Elle constitue donc une autre stratégie d'évitement immunitaire déployée par les *Alphavirus* et potentiellement une cible thérapeutique prometteuse (Shimizu et al. 2020).

## d. nsP4

nsP4 est une protéine de 70kDa identifiée comme étant la polymérase virale RNA dépendante (RdRPs) (Khan et al. 2002) (Fig. 26).



**Fig. 26 Organisation de la protéine nsP4**

*La protéine nsP4, fais approximativement 70kDa et extrêmement conservée au sein des Alphavirus. La région N terminale de cette protéine est désordonnée.*

Il a été très tôt considéré, au vu de sa séquence très similaire à d'autres RdRps virales, que nsP4 était responsable de la synthèse d'ARN viraux (Kamer and Argos 1984). In vitro, la protéine nsP4 recombinante permet la synthèse d'ARN simple brin négatif à partir d'une matrice d'ARN simple brin de polarité positive. Cette activité de synthèse nécessitait cependant la présence des autres nsPs, au moins sous forme immature (P123) associées à des fragments membranaires. La réaction est stimulée par la présence d'ions magnésium. Le domaine enzymatique de synthèse ARN a été identifié comme une région de 97 résidus dans la région N Terminale (Rubach et al. 2009). Il a été observé également que cette protéine est extrêmement conservée chez les *Alphavirus*. En effet, les protéines nsP4 provenant de différents *Alphavirus* peuvent s'associer avec des complexes P123 provenant d'autres virus et conserver leur fonctionnalité (Lello et al. 2021). Enfin, un domaine adénylyltransférase est présent au sein de sa séquence et il est supposé que c'est ce domaine qui est responsable la polyadénylation des ARN viraux néosynthétisés au sein des sphérules (Tomar et al. 2006). Comme évoqué précédemment, au sein du complexe de réplication la fonction de nsP4 est modulée par la présence et la structure des autres nsPs. Ainsi le clivage de la polyprotéine P123 en nsPs individuelles, induit un changement conformationnel permettant le passage de la synthèse du brin matrice ARN(-), à la réplication du génome et sous-génome viral ARN(+) (Shirako and Strauss 1994). De cette façon, certains sites d'interactions entre nsP4 et nsP1/nsP2/nsP3 ont été identifiés comme

clé dans ces mécanismes et possiblement responsable de l'organisation conformationnelle de nsP4 (Rupp et al. 2011).

## 6. Déformations membranaires et infections virales

### 6.1. Protrusions membranaires dans la cellule eucaryote

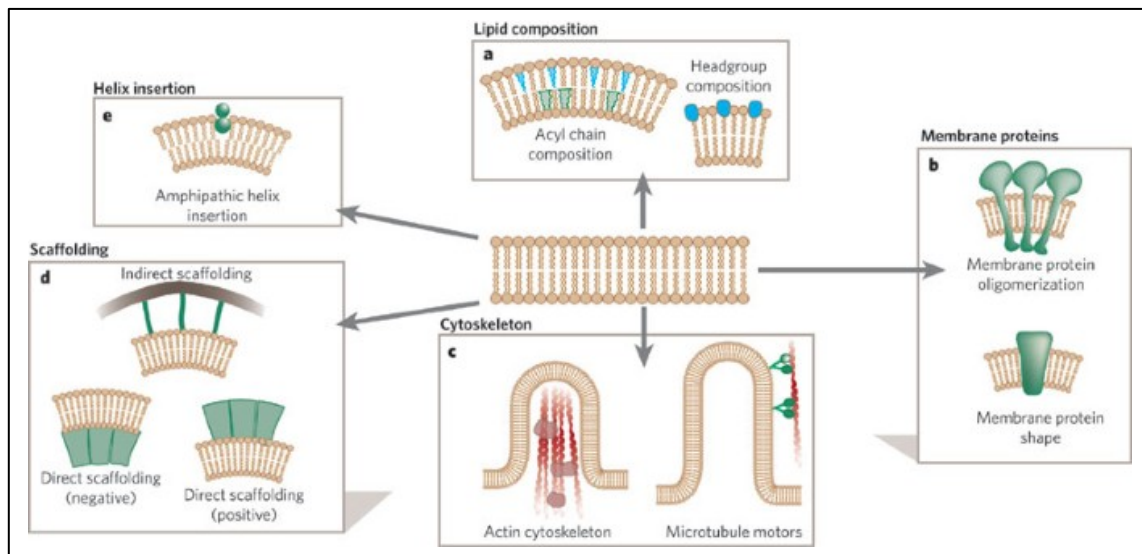
Une représentation simplifiée de l'unité cellulaire la considérerait comme un amas protéique isolé du reste de leur environnement par une membrane lipidique. Cependant les cellules sont capables d'une immense plasticité, régulant leur structure interne, leurs morphologies et leur perméabilité à l'environnement extérieur.

Le changement morphologique d'une cellule est essentiel à la mise en place de nombreux processus comme la migration par reptation, la phagocytose ou l'adhésion cellulaire. Les protrusions membranaires font partie de ce phénomène. Ces extensions de la membrane plasmique peuvent être constitutives d'un front de migration et donc jouer un rôle dans la polarité cellulaire. Elles peuvent être formées en réponse à un signal chemo-attractant ou à l'inverse être projetées de manière aléatoire pour sonder l'environnement extracellulaire (Petrie et al. 2009).

La formation de protrusions nécessite l'intégration de plusieurs processus cellulaires. Il a été longtemps considéré que la force de déformation de la membrane était entièrement fournie par le cytosquelette d'actine, dont la polymérisation dynamique pousse la membrane vers l'avant. Toutefois un récent article a mis en lumière le fait qu'une disjonction entre la membrane cellulaire et le cytosquelette d'actine est nécessaire à l'initiation des protrusions membranaires (Welf et al. 2020). La membrane elle-même se dilate sous l'effet de la tension, un processus qui nécessite un trafic membranaire et la fusion de vésicules contenant des lipides pour supporter l'augmentation de la surface membranaire (Bi 1995). Enfin, les protubérances doivent adhérer à un substrat. Si elles n'adhèrent pas, les protubérances ont tendance à se rétracter par vagues en réponse à la tension générée dans la cellule, dans un processus connu sous le nom de "membrane ruffling" (ébouriffement de la membrane).

Pour résumer la dynamique membranaire nécessaire à la formation de protrusions cellulaires repose sur un étroit dialogue entre les espèces lipidiques formant la membrane plasmique, les différents polymères cytosquelettaires et un grand éventail de protéines cellulaires organisatrices (Fig. 27). Dans cette partie seront décrites les

principales formes de protrusions membranaires ainsi que les différents acteurs cellulaires responsables de déformations membranaires.



**Fig. 27 Mécanismes de déformation des membranes.**

La bicouche phospholipidique peut être déformée, ce qui entraîne une courbure positive ou négative de la membrane. Ces modifications peuvent être générées par : a) les changements dans la composition des lipides ; b) l'insertion de protéines membranaires intégrales possédant une courbure intrinsèque ou entraînant une courbure par oligomérisation ; c) la polymérisation du cytosquelette et la traction par les microtubules ; d) La structuration directe et indirecte de la bicouche ; e) l'insertion d'une hélice amphipathique dans un des feuillet de la bicouche. D'après (McMahon and Gallop 2005).

## a. Principaux types de protrusions membranaires

Parmi les types de projections cytoplasmiques que peuvent former les cellules on distingue trois principales catégories :

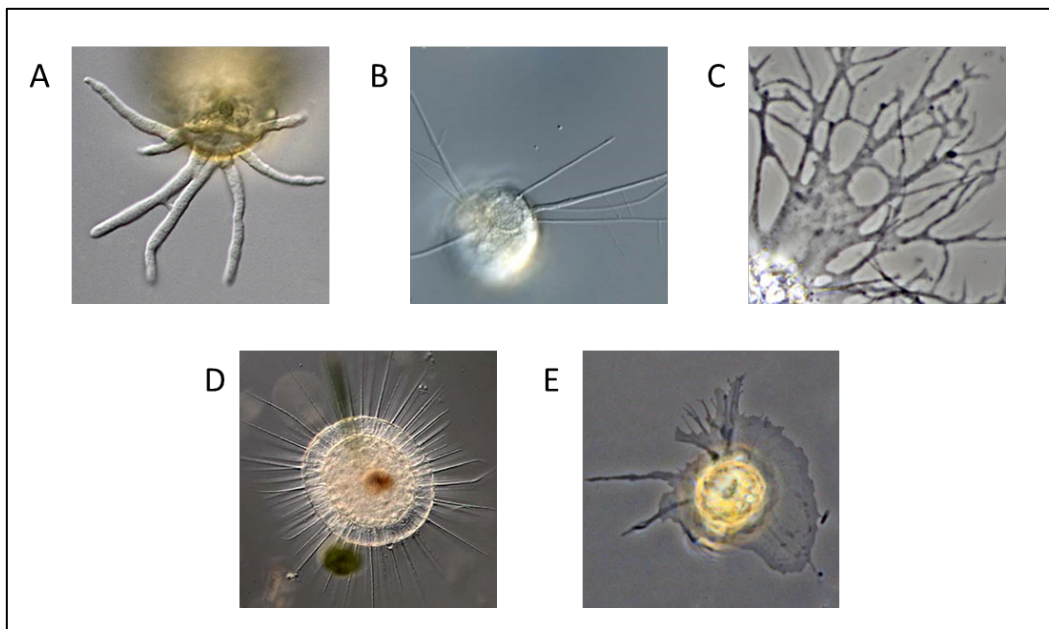
Les cils et flagelles qui sont des projections mobiles formées par une structure microtubulaire, ondulant pour permettre le mouvement cellulaire (Gilpin et al. 2020).

Les microvilis, qui sont de courtes extensions souvent en grand nombre à la surface de cellules, permettant d'augmenter la surface d'échange entre la cellule et son environnement externe (Lange 2011).

Les pseudopodes qui sont des projections cytoplasmiques des cellules eukaryotes. Ces extensions cellulaires sont formées par l'action du cytosquelette : les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. On distingue plusieurs types

de pseudopodes, lobopodes, filopodes, réticulopodes, axopodes, lamellipodes... (Fig. 28).

Ces distinctions sont basées principalement sur les différences morphologiques de ces éléments (longueur, diamètres, embranchements etc.). Cependant cette grande diversité est principalement associée au domaine d'étude des Amibes. Dans le champ des autres cellules animales, majoritairement, seule, la distinction filopodes/lamellipodes est considérée. C'est pour cela que nous nous concentrerons par la suite sur deux grands types structures, les protrusions membranaires larges (BCP, Broad cellular protrusion) qui comprennent les lamellipodes et les protrusions fines et longues (FLP, Finger like protrusion). On peut néanmoins noter l'existence d'autres protrusions tels les blebs, invadopodes et d'autres.



**Fig. 28 Types de protrusions cellulaires.**

*Types de protrusions cellulaires, observées chez différentes espèces d'amibes. (A) lobopodes, (B) filopodes, (C) réticulopodes, (D) axopodes, (E) lamellopipode. Source (<https://arcella.nl/2421-2/>).*

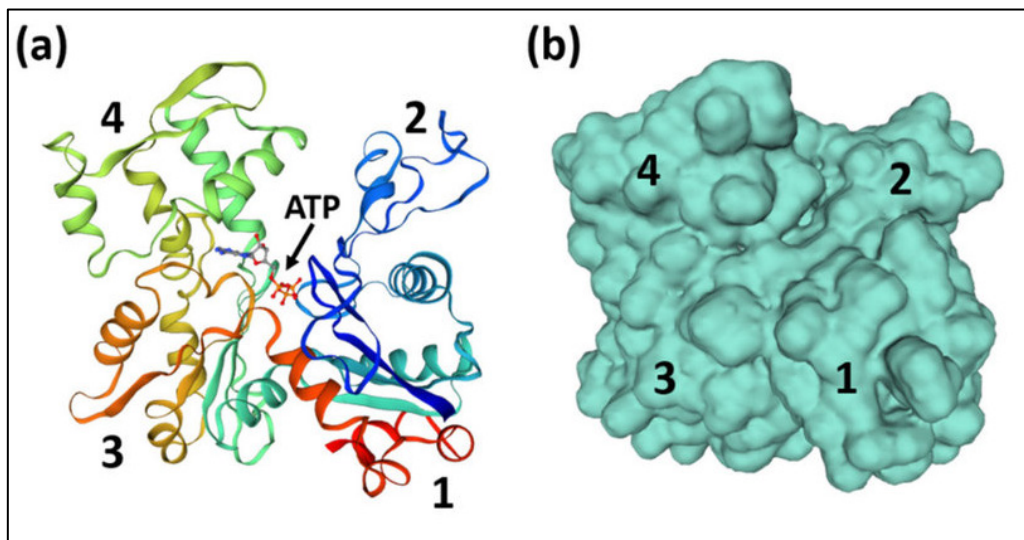
## **b. Polymères d'actine et déformations membranaires**

Le cytosquelette d'actine constitue au sein du cytoplasme une structure essentielle à la morphologie cellulaire et à la mise en place de la polarité. Il est composé de filaments polymériques d'actine ainsi que d'un ensemble de protéines accessoires et régulatrices qui y sont associées. Cet assemblage est entre autre responsable de la



formation du cortex cellulaire, un réseau de filaments d'actine qui parcourt la face interne de la membrane plasmique et assure le maintien de la morphologie cellulaire dans son ensemble (Salbreux et al. 2012). Le cytosquelette d'actine est également considéré comme la principale source d'énergie mécanique à la membrane plasmique (Tilney 1975, Svitkina and Borisy 1999).

A l'origine, l'actine, sous sa forme monomérique, est une petite protéine globulaire constituée de quatre sous-domaines séparés en 2 lobes autour d'une niche enzymatique capable de lier l'ATP. C'est cette liaison aux molécule d'ATP qui induit en changement conformationnel permettant l'assemblage en polymères d'actine (Squire 2019) (Fig. 29).

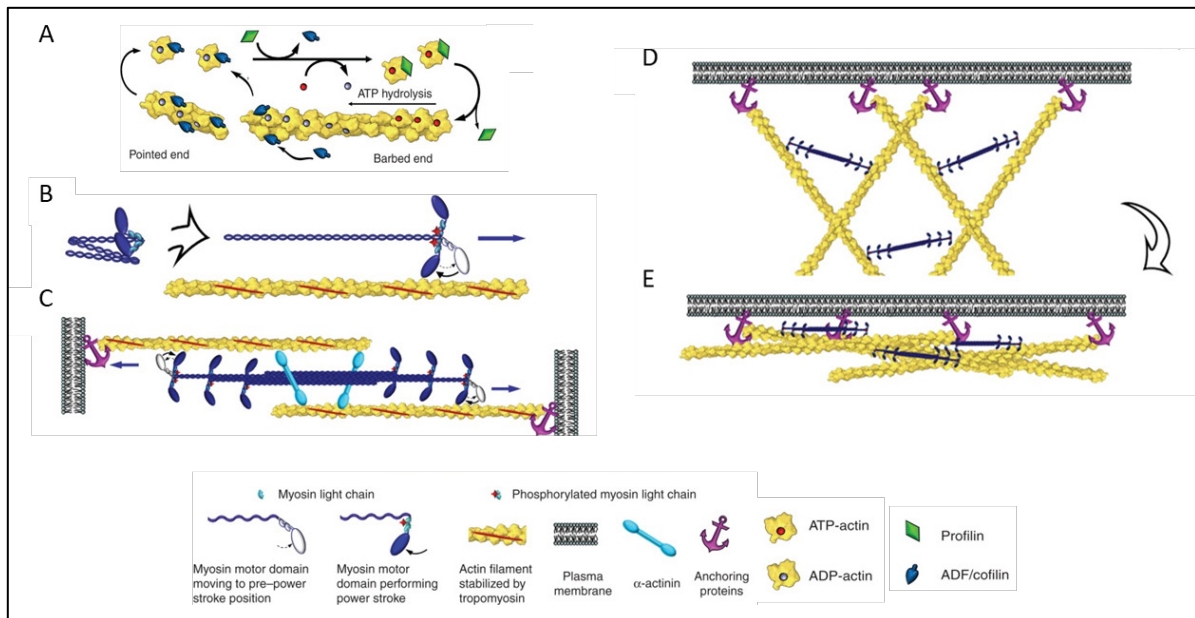


**Fig. 29 Structure de l'actine-G monomérique.**

*(a) Diagramme en ruban et (b) représentation de surface de l'actine-G montrant les quatre sous-domaines et la poche centrale de liaison à l'ATP. Issus de (Squire 2019)*

La capacité à pousser sur la membrane pour former des protrusions, est due à la polymérisation des brins d'actine à une extrémité qu'on nomme positive. Au sein du cytoplasme, ces extrémités positive sont situées vers la membrane plasmique et l'ajout de nouvelles actines globulaires se fait par une réaction via l'action de la profiline et l'association avec une molécule ATP. La polymérisation entraîne l'hydrolyse progressive de l'ATP en ADP ce qui induit un gradient le long d'un filament. Les protéines les plus récemment ajoutées à l'extrémité positive étant liées quasi exclusivement à de l'ATP et à l'inverse les protéines à l'extrémité négative très riche

en ADP. C'est cette liaison à l'ADP qui induit une affinité de l'extrémité négative pour les protéines cellulaires favorisant la dépolymérisation. La polymérisation produit une force de poussée de l'ordre du Piconewton mais lorsque ce phénomène est multiplié par un grand nombre d'événements cette force en est démultipliée.



**Fig. 30 Dynamique des filaments d'actine**

(A) La polymérisation des filaments d'actine se produit de préférence à l'extrémité positive (barbed end) à partir des complexes ATP-actine-profiline; après l'incorporation d'un monomère d'actine dans le filament, la profiline se dissocie. L'hydrolyse de l'ATP déclenchée par la polymérisation rend les filaments plus sensibles à la dépolymérisation et augmente leur affinité pour les facteurs de dépolymérisation de l'actine comme l'ADF/cofiline. (B) La myosine II est une molécule hexamérique. La phosphorylation de la chaîne légère de la myosine entraîne un changement conformationnel induisant l'activité motrice ; la myosine II activée peut alors se déplacer vers l'extrémité du filament d'actine par un mécanisme dépendant de l'ATP. La contraction des faisceaux d'actine-myosine-II (C) ou des réseaux formés par ces faisceaux (D) est médiée par les unités bipolaires de myosine II qui se déplacent le long de filaments d'actine et sont orientés de manière opposée (C) ou non alignées (D). Modifié à partir de (Svitkina 2018).

Ainsi si ces filaments se rassemblent en faisceaux parallèles la force générée va induire une extension ciblée et étendue de type filopode. A l'inverse un amas ramifié de filaments d'actine, permet une poussée plus répartie sur des régions plus larges de la membrane, permettant la formation de lamellipodes (Kovar and Pollard 2004).

Lors de la contraction de ces mêmes extensions, c'est l'utilisation de protéines motrices nommées myosines organisées en filaments bipolaires qui permet le glissement des fibres les unes par rapport aux autres (Fig. 30). Les myosines de classe II sont spécialisées dans la contraction des filaments d'actine. Ces protéines

possèdent une tête se fixant au filament d'actine et qui se contracte par hydrolyse d'ATP (Pollard 1975). En étant liées à deux filaments d'actines, les chaînes de myosines permettent un rapprochement progressif. L'intégrité des filaments d'actines est protégée lors de cette traction par des protéines fibreuses, les tropomyosines fixées sur le long des filaments d'actine (Nevzorov and Levitsky 2011). L'organisation entre filaments d'actine et les chaînes de myosine est extrêmement diverse, de l'organisation parallèle quasi-sarcomérique au réseau désordonné (Heissler and Manstein 2013). Les fibres de stress sont un de ces types de réseau qui permet la contractilité cellulaire (Weber and Groeschel-Stewart 1974).

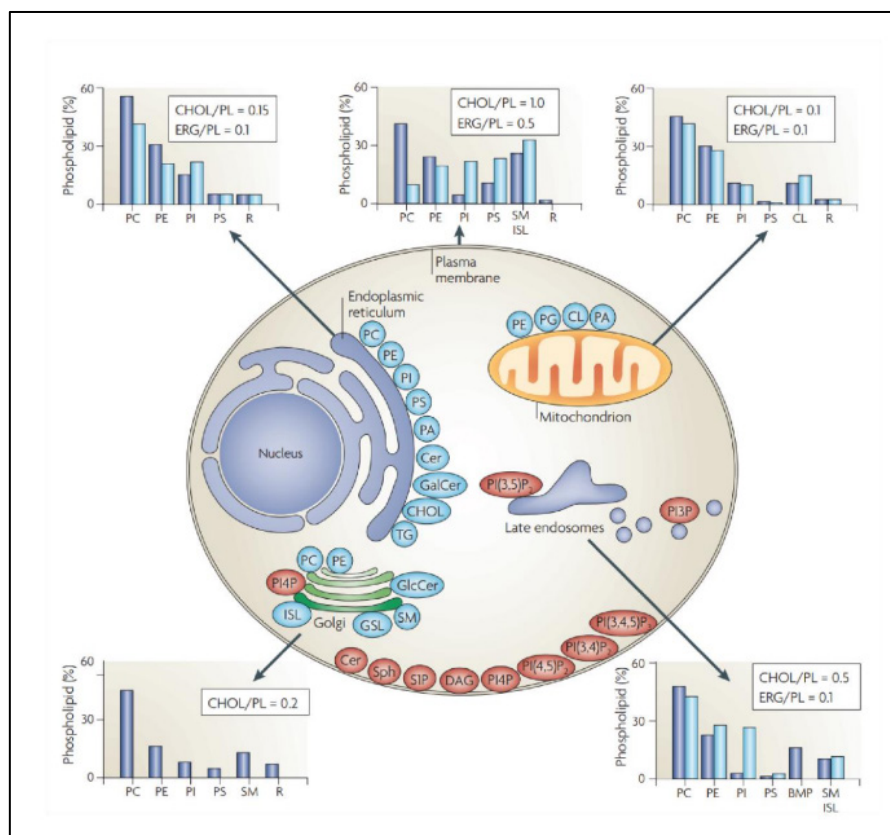
La structure polymérique des filaments d'actine est la colonne vertébrale du cytosquelette. Elle est à la fois le principal vecteur d'énergie mécanique au sein de la cellule et la base structurelle de l'ensemble des processus de déformations membranaires. Cependant dans ces processus les polymères d'actine sont en interdépendance de deux autres acteurs, la composition lipidique de la membrane plasmique et l'ensemble des protéines régulatrices qui organisent sa structuration.

### **c. Rôle des lipides membranaires**

Les lipides sont des molécules dont la capacité à s'auto-assembler en macrostructures dynamiques dans un milieu aqueux a été reconnue comme l'un des mécanismes fondamentaux du processus évolutif (Luisi et al. 1999). Cette capacité est due à la nature amphiphile des molécules lipidiques qui ont tendance à s'agréger de telle sorte que les parties hydrophobes (queues) et hydrophiles (têtes) des lipides sont séparées et maintenue en séparation par tension hydrophobe (Krimm 1980). C'est l'auto-organisation en double feuillet avec les queues hydrophobes au centre et les têtes hydrophiles en périphérie qui permet la structuration des membranes cellulaires.

Loin d'être homogènes, les récentes avancées dans les domaines de la lipidomique ont montré l'existence de milliers d'espèces lipidiques différentes au sein des membranes eucaryotes (Raghu 2020). Il est à noter que cette composition varie considérablement entre les organelles étudiées et même entre le feuillet externe et interne de celle-ci. Ainsi la membrane plasmique chez les eucaryotes est particulièrement riche en sphingolipides et en stérols (van Meer et al. 2008) (Fig. 31).

Pour réguler de manière efficace la morphologie cellulaire et la perméabilité au milieu extérieur les cellules doivent, assurer une stabilité à large échelle et une grande plasticité à l'échelle moléculaire (McMahon and Gallop 2005). Cette plasticité repose en partie sur la diversité des espèces lipidiques composants les membranes et leurs caractéristiques physico-chimiques respectives. Par exemple, les phosphatidyléthanolamines (PE) et les diglycérides (DAG), ont un rôle de déstabilisation des bicouches lipidiques, déstabilisations qui ont pour effet de favoriser les interactions protéo-lipidiques et de favoriser la plasticité morphologique (Cullis and de Kruijff 1979, Hafez and Cullis 2001, Ces and Mulet 2006).



**Fig. 31 Distribution des espèces lipidiques au sein des membranes cellulaires**

La composition lipidique est exprimée en pourcentage de la teneur totale en phospholipides (PL) et est représentée en bleu clair pour les levures et en bleu pour les mammifères. Elle est représentée de la même manière pour la teneur en stérols avec le cholestérol (CHOL) pour les mammifères et l'ergostérol (ERG) pour les levures. À l'intérieur de la cellule, le site de synthèse des principaux phospholipides est représenté par les cercles bleus et les autres lipides impliqués dans les voies de signalisation sont représentés par les cercles rouges. PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PI : phosphatidylinositol ; PS : phosphatidylsérine ; PA : acide phosphatidique ; Cer : céramide ; GalCer : Galactosylcéramide ; SM : sphingomyéline ; TG : triacylglycérol ; GSL : glycosphingolipides ; ISL : inositol sphingolipide de levure ; DAG : diacylglycérol ; CL : cardiolipine ; PI4P : phosphatidylinositol-4-phosphate ; PI(3,5)P2 : phosphatidylinositol-(3,5)-bisphosphate ; PI(4,5)P2 : phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate ; PI(3,4,5)P3 : phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate ; BMP : bis(monoacylglycéro)phosphate ; S1P : sphingosine-1-phosphate ; R : lipides restants. Modifié à partir de (van Meer et al. 2008).

Dans le cas des protrusions membranaires, il est avéré que certaines espèces lipidiques ont un rôle particulier dans les courbures que peuvent adopter la membrane plasmique. L'importance de deux espèces en particulier ont été mises en lumière : les acides phosphatidiques (PA) et les acides Lysophosphatidiques (LPA) (Kooijman et al. 2005). En effet il a été observé par Kooijman *et al* que la présence de ses deux acteurs avait pour effet d'induire des courbures respectivement négatives et positives sur des membranes *in vitro*. Cependant il apparaît désormais que les deux phénomènes sont liés et qu'il est difficile de savoir si le recrutement de ces lipides est un précurseur ou au contraire une conséquence de la courbure membranaire. En effet, l'induction d'une courbure membranaire entraîne un tri lipidique favorisant l'accumulation de PA dans les régions à courbure négative (Callan-Jones et al. 2011, Black et al. 2014).

Deux modèles s'opposent sur leur mode d'action et de recrutement. D'une part le modèle historique, considère que la courbure est induite par la polarité elle-même de ses espèces lipidiques. Les espèces comme le PA ayant de grandes têtes hydrophiles et de petites queues hydrophobes forment un cône et inversement pour le LPA. Pour autant des études biophysiques tendent à remettre en cause ce modèle, ne montrant que peu de liens entre la morphologies des espèces lipidiques et les déformations de membranes (Kamal et al. 2009). Le second modèle propose que la courbure membranaire induit des « défauts » dans l'organisation lipidique de la membrane, des manques qui induirait le recrutement de certaines espèces lipidiques par des protéines détectrices (Hatzakis et al. 2009, Sorre et al. 2009). Ce mécanisme reste à l'heure actuelle en grande partie non élucidé.

Cependant la contribution du PA aux processus cellulaires de déformation a été illustré comme par exemple dans le cas de la macropinocytose ou de la formation de lamellipodes (Nishioka et al. 2010, Bohdanowicz et al. 2013).

Comme dit précédemment, l'organisations de ces espèces lipidiques au sein de la membrane plasmique est complexe. Même si théoriquement les différentes espèces lipidiques sont libres de diffuser sur un plan membranaire en 2D, ce processus ne relève pas simplement de la diffusion brownienne (Kusumi et al. 2005). En effet il a été montré que les lipides membranaires de par leur propriété de séparation latérale de phase, sont capables de s'agréger pour former des îlots denses (Simons and van Meer 1988, Simons and Ikonen 1997). Il a été montré dans des modèles théoriques que

c'est justement dans des modèles avec réduction d'entropie des espèces lipidiques qu'est rendue possible la présence de courbures membranaires (Callan-Jones et al. 2011). La présence de ces structures permet aux cellules de former des accumulations locales de lipides particuliers et ainsi de permettre une forme de polarité cellulaire. Ces zones enrichies constituent alors des zones d'interactions avec certaines protéines cellulaires pouvant s'ancrer à la membrane et ayant des affinités lipidiques particulières (Arumugam and Bassereau 2015). Par conséquent, ces phénomènes permettent la mise en place de dialogues complexes entre membranes, protéines et cytosquelette. Un exemple de cela est le fait que la protéine Rac1, Rho GTPase essentielle à la formation de lamellipodes est lorsqu'elle est palmitoylée adressée à la membrane plasmique au sein d'ilots lipidiques riche en cholestérols (Navarro-Lérida et al. 2012). De plus il a été montré que l'intégrité de ces ilots est essentielles à la formations de lamellipodes via le recrutement de protéines d'adhésion, les intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 3$  (Bi et al. 2018).

En conclusion, la composition de la membrane plasmique est essentielle à la mise en place de déformations membranaires. Plus que participants actifs de ces déformations, ces lipides agissent comme plateforme permettant l'interaction entre la membrane plasmique, le cytosquelette d'actine et les protéines membranaires.

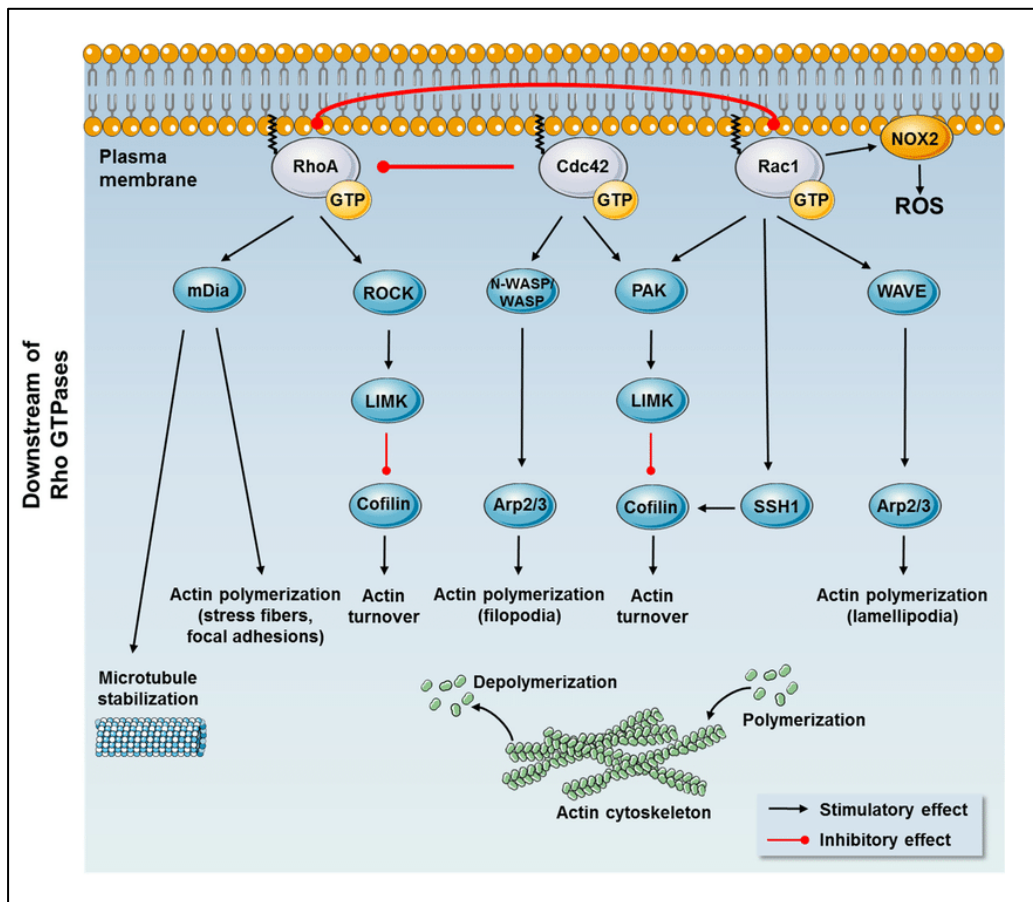
#### **d. Réorganisation par les protéines cellulaires**

Comme dit précédemment le cytosquelette d'actine est en constante interaction avec un large ensemble de protéines cellulaires qui en contrôle la dynamique et dont l'architecture sert de support pour la mise en place de nombreux processus cellulaires. Dans cette section nous présenterons les principaux acteurs de l'organisation du cytosquelette.

##### **Les voies des Rho GTPases**

L'une des pierres angulaires du contrôle et de la transduction des processus cellulaires sont les petites GTPases. Ces protéines, capables de se lier au GTP et de l'hydrolyser en GDP ont un rôle particulier « d'interrupteur » protéique (Fig. 32). Généralement ces protéines sont dans un état actif lorsque liées au GTP et inactif lorsque liées au GDP. L'activation de ces GTPases est sous le contrôle de protéines qu'on nomme GEFs (« Guanine nucleotide exchange factors ») qui vont retirer le groupement GDP pour

placer à la place un groupement GTP et mettre la protéine en état actif (Fig. 33). A l'inverse d'autres protéines appelées GAPs (« GTPase Activating proteins ») induisent l'activité GTPase des petites GTPases, permettant la transformation du GTP en GDP et par conséquent l'état inactif de la protéine. Enfin les GDIs (« Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors ») permettent l'adressage des petites GTPases à certains sites subcellulaires. Cet adressage est permis par la reconnaissance de modifications post traductionnelles par les GDIs, les isoprénylations. Les GTPases ont pour rôle de servir



**Fig. 32 Protéines effectrices en aval des principales Rho GTPases, Rac1, Cdc42 et RhoA**

Protéines effectrices en aval des principales Rho GTPases, Rac1, Cdc42 et RhoA. Les protéines effectrices en aval de Rac1 et Cdc42 comprennent les protéines de la famille WASP et les kinases activées par la p21 (PAK). WASP, N-WASP et WAVE favorisent la polymérisation de l'actine par l'activation du complexe Arp2/3. Les PAKs activent les kinases du domaine LIM (LIMK) qui favorisent la phosphorylation et l'inactivation de la cofiline, protéine qui induit des coupures dans les filaments d'actine. Les protéines effectrices en aval de RhoA comprennent la protéine kinase associée à Rho (ROCK) et la famille des protéines formines (mDia). Parmi les autres protéines effectrices en aval, ROCK régule le renouvellement de l'actine via la voie LIMK-Cofiline. Modifié à partir de (Møller et al. 2019).

de plateforme d'interaction et de transmettre à un myriade d'effecteurs les stimuli internes ou externes qui lui sont transmis (Wennerberg et al. 2005).

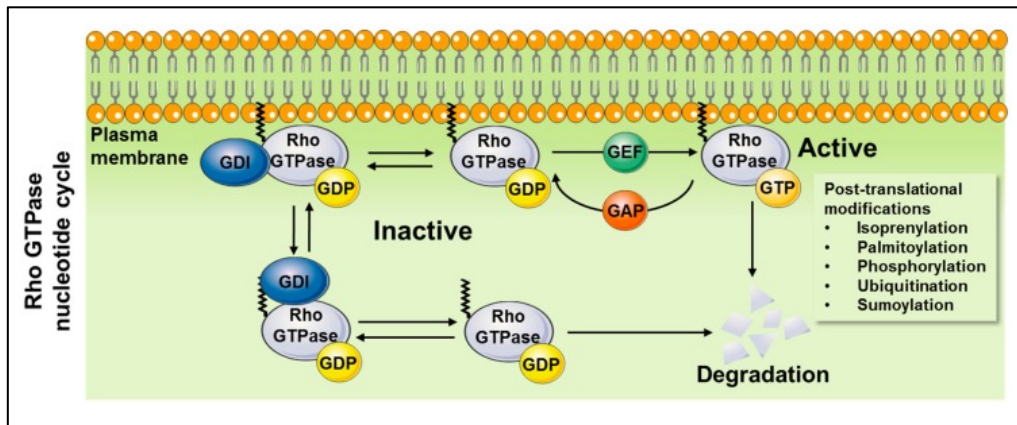
Parmi les petites GTPase la superfamille Ras compte de nombreux représentants impliqués dans une grande diversité de processus cellulaires. Par exemple, la sous famille Arf, est impliquée dans le transport vésiculaire tandis que la sous famille Rab est principalement liée au trafic membranaire. Le groupe qui nous intéressera en particulier est la sous famille des Rho GTPases qui est en charge de la régulation du cytosquelette d'actine. (Goitre et al. 2014). Dans cette famille trois membres sont particulièrement caractérisés, Rac1 ("Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1"), Cdc42 ("cell division cycle 42") et RhoA ("Ras homologous member"). On associe respectivement et de manière traditionnelle ces GTPases à la formation de lamellipodes, filopodes et fibres de stress. Il est intéressant de noter que bien que séparées, les multiples voies de signalisations en aval de ces trois GTPases ont parfois certains acteurs en commun ce qui tend à nuancer l'idée de l'implication exclusive d'une seule d'entre elles (Sells et al. 1997, Kameritsch et al. 2015, Seetharaman and Etienne-Manneville 2020). Au regard de leur implication dans la formation de protrusions membranaires. Nous nous concentrerons sur Rac1 et Cdc42.

Il existe une grande diversité de GEFs capables d'activer de manière plus ou moins spécifique les Rho GTPases (Fig. 34). On en compte deux familles principales : les Dbls et les DOCKs dont la spécificité dépend d'une multitude de domaines comme par exemple les domaines, PH, DHR2, SH2 et SH3 (Cook et al. 2014).

Parmi ces GEFs l'un des décrite est  $\beta$ -PIX, un membre de la famille Dbl dont le rôle a été identifié dans la migration et l'invasion et former de nombreux complexes activateurs. Par exemple le complexe tri-moléculaire GIT- $\beta$ PIX-Pak1 qui promeut l'activité de Rac1 et la migration cellulaire. GIT est une protéine qui joue le rôle de GAP pour les Arf GTPases et ainsi favoriser le recyclage de récepteurs et l'exocytose. Cette protéine va s'associer au facteur  $\beta$ PIX au niveau des zones d'adhésions focales riche en paxilline phosphorylée associée aux protéines d'adhésions (Nayal et al. 2006). Ce complexe va ensuite s'associer à la protéine kinases Pak1, une sérine/thréonine kinase, qui est effectrice de Rac1 et Cdc42 et impliqués dans la régulation de l'adhésion et la formation de protrusions membranaire (Delorme-Walker et al. 2011). C'est la protéine Pak1 qui est en partie responsable de la phosphorylation



des paxillines à la membrane plasmique. De cette manière le complexe GIT-βPIX-Pak1 permet le recrutement et l'activation locale de Rac1, ce qui constitue une boucle auto activatrice : Pak1 activé par les Rho-GTPases permettrait la phosphorylation de nouvelles paxillines et ainsi de suite. Ceci aura pour effet la mise place de nouvelles structures d'adhésions nécessaire à la migration cellulaire et à la formation de filopodes (Rajah et al. 2019).



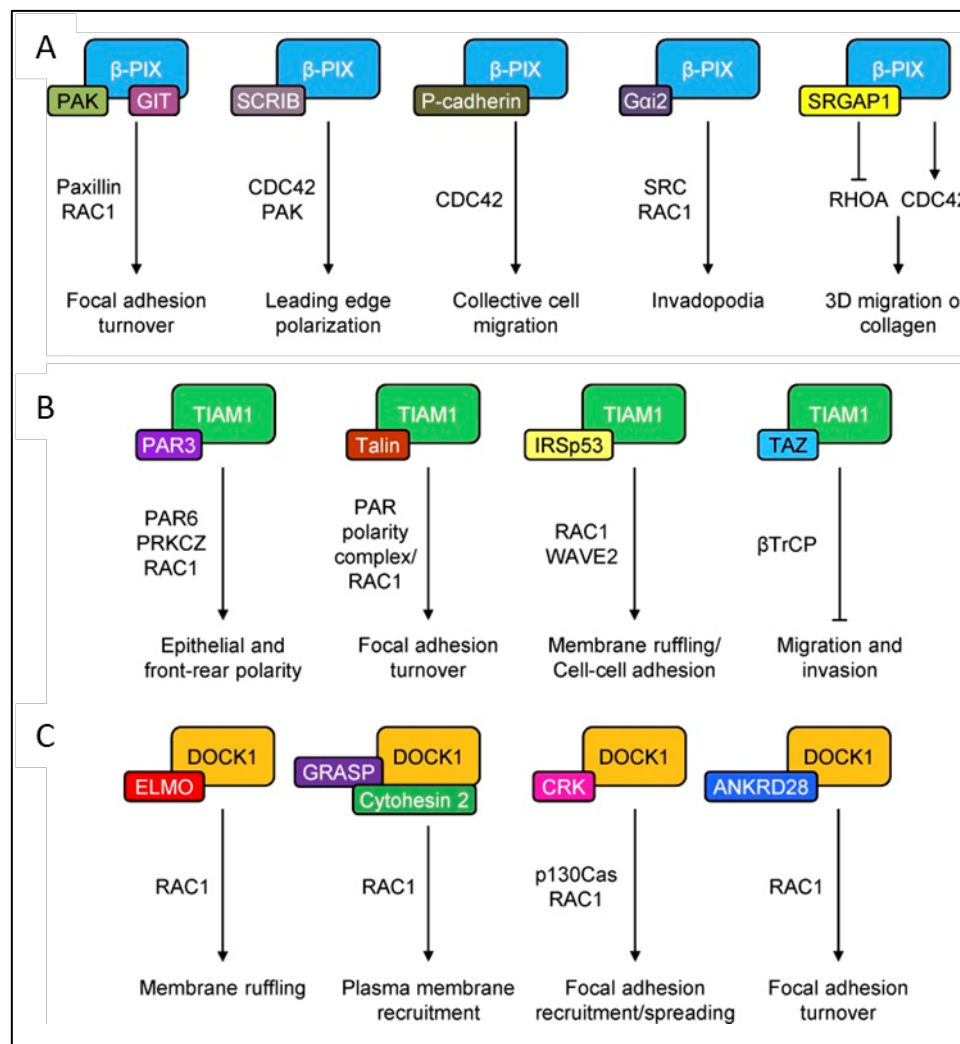
**Fig. 33 Cycle d'activation des Rho-GTPase**

*L'activation des GTPases Rho nécessite : 1) la libération des inhibiteurs de dissociation de la guanine Rho (GDI) et 2) l'activation des facteurs d'échange de nucléotides guanine (GEF), qui facilitent le passage d'un état inactif lié à la guanosine diphosphate (GDP) à un état actif lié à la guanosine triphosphate (GTP) et la translocation vers la membrane plasmique. L'inactivation se produit lorsque les protéines activatrices de la GTPase (GAP) stimulent l'hydrolyse du GTP en GDP et que la Rho GTPase se lie à nouveau à RhoGDI. Les Rho GTPases prénylées libres sont instables et dégradées et les Rho GTPases actives peuvent également être ciblées pour la dégradation. Modifié à partir de (Møller et al. 2019).*

Un autre interactant du facteur β-PIX est la protéine d'échafaudage SCRIB. En effet il a été montré dans le cas des astrocytes que β-PIX pouvait se lier à SCRIB et de cette manière activer Cdc42 au niveau du front de migration (Osmani et al. 2006). De plus, dans le cas de cellules cancéreuses, il a été observé que β-PIX et SCRIB s'associait avec Pak1 pour former des protrusions loin des zones d'adhésion suggérant un complexe différent de GIT-βPIX-Pak1 (Nola et al. 2008).

On peut également citer la GEF Tiam1 également membre de la famille Dbl qui elle est spécifique de Rac1. Cette GEF est impliquée dans la polarisation cellulaire l'adhésion et l'extensions de lamellipodes (Connolly et al. 2005, Pegtel et al. 2007, Marei et al. 2016). Comme β-PIX, Tiam1 est impliquée dans l'activation de Rac1 mais également dans la l'aiguillage de la transduction du signal en aval de Rac1. C'est par

l'association à différentes protéines adaptatrices qu'est permis cet aiguillage. Par exemple Tiam1 peut se lier avec la protéine adaptatrice IRSp53 (également nommée BAIAP2) qui va servir d'intermédiaire à l'activation du facteur WAVE2 lui-même nécessaire à la formation de lamellipodes (Connolly et al. 2005).

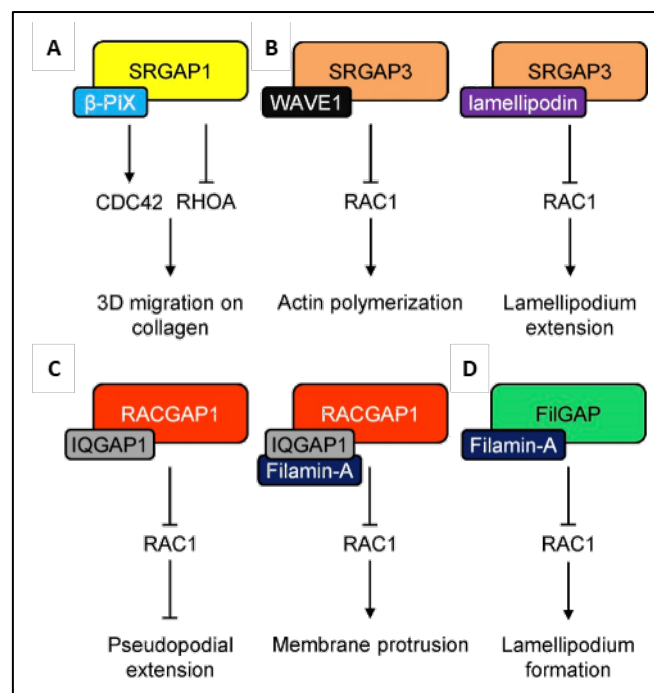


**Fig. 34 GEFs spécifiques de Rac1 et Cdc42**

Les GEF spécifiques de Rac/CDC42 forment des complexes distincts pour contrôler de manière différentielle la migration et l'invasion des cellules. Les GEF  $\beta$ -PIX (A), TIAM1 (B) et DOCK1 (C) spécifiques de RAC/Cdc42 régulent la migration de différentes manières en fonction des complexes qu'ils forment. Les GEFs et les protéines liant les GEFs sont représentées dans des cases de couleur arbitraire. Pour chaque complexe, les cibles de signalisation en aval sont indiquées ainsi que le résultat fonctionnel. Modifié à partir de (Lawson and Ridley 2018).

En comparaison aux RhoGEFs, les connaissances actuelles sur les GAPs des RhoGTPases sont moins développées. On peut citer notamment la protéine RACGAP1 impliquée dans la cytokinèse et le contrôle de la migration (Zuo et al. 2014)

(Fig. 35). En effet, lorsque cette protéine est phosphorylée, elle induit le recrutement de la protéine d'échafaudage IQGAP1 à l'extrémité de pseudopodes invasifs (Jacquemet et al. 2013a). Dans ce complexe RACGAP1 aurait pour rôle d'activer l'hydrolyse de l'ATP tandis que la protéine IQGAP1 capable de se fixer à Rac1 (mais également CDC42) aurait pour fonction de verrouiller cet état d'inactivation et par la même d'inhiber localement la formation de protrusions. Ce phénomène serait contrôlé par des signaux d'adhésions provenant d'intégrines membranaires (Kurella et al. 2009, Jacquemet et al. 2013b).



**Fig. 35 Complexes GAP impliqués dans la migration et l'invasion**

Les RhoGAP SRGAP1 (A), SRGAP3 (B), RACGAP1 (C), FilGAP (D), régulent la migration de différentes manières en fonction des complexes qu'elles forment. Les complexes GAPs et les protéines liant ces complexes sont représentées. Pour chaque complexe, les cibles de signalisation en aval sont indiquées ainsi que le résultat fonctionnel. Modifié à partir de (Lawson and Ridley 2018).

Dans le cas de Rac1 et Cdc42, il a été observé qu'un grand nombre d'effecteurs en aval des différentes voies de signalisation, possèdent un domaine d'interaction spécifique. Ce motif de 18 acides aminés nommé CRIB (« Cdc42/Rac Interactive Binding ») est présent dans de nombreuses protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Ces protéines ont pour point commun de contenir de multiples domaines actifs, comme des domaines d'interaction avec l'actine (ABD),

d'interaction protéines-protéines ou encore des domaines d'échafaudage, permettant la transduction de signaux. Un grand nombre de ces protéines ont des activités enzymatiques auto-inhibitrices qui ne sont activées qu'après interaction avec les GTPases (Burbelo et al. 1995, Bustelo et al. 2007). Ces protéines aux fonctions variées sont essentielles au contrôle du cytosquelette par les Rho GTPase. Plus bas seront décrites les grandes fonctions de ces protéines capables.

### **Protéines de Coupe**

Les protéines de coupes sont des protéines capables de sectionner les filaments d'actine formés pour en favoriser la dépolymérisation. On peut les classer en deux familles, les petites protéines de coupe de type cofiline (~15 kDa) et les grosses protéines à multidomains de type gelsoline.

La cofiline a la capacité de s'associer aux filaments d'actine avec une affinité très supérieure pour les protéines d'actine liée au GDP. Cette interaction induit un changement conformationnel au niveau des sous domaines I et II des monomères d'actine ce qui en déstabilise la structure, favorisant la flexibilité du filament mais aussi sa rupture (McCullough et al. 2011). De manière surprenante la fixation d'un trop grand nombre de cofiline le long d'un filament à l'effet inverse en le stabilisant (Ngo et al. 2015). Il a été longtemps considéré que la cofiline était un facteur facilitant la dépolymérisation de l'actine (elle était nommée à l'origine actin-depolymerizing factor) (Bamburg et al. 1980). Cependant sa contribution à ce phénomène semble indirecte. En découpant les filaments d'actine, la cofiline induit une augmentation des extrémités négatives présentes et donc la probabilité de dissociation (Andrianantoandro and Pollard 2006). Sous sa forme native, la cofiline est inactivée et associée à la membrane plasmique dans des zones riches en PI(4,5)P<sub>2</sub>. Lors de certains événements, comme une déphosphorylation par certaines protéines ou une hydrolyse de PI(4,5)P<sub>2</sub> la cofiline est activée et va transloquer de la membrane plasmique aux filaments d'actine. Cependant il a été montré que la cofiline était rétro-contrôlée par plusieurs voies de signalisation, au travers de sa désactivation par sa phosphorylation par les kinases LIMK (Delorme et al. 2007). On peut retrouver ces protéines LIMKs comme effectrices de RHOA par l'intermédiaire de la protéine ROCK mais aussi de Rac1 et Cdc42 via la protéine Pak1 (Sumi et al. 1999). Ainsi il a pu être observé que la cofiline avait un rôle important dans la formation de lamellipodes par Rac1 en participant à l'élargissement

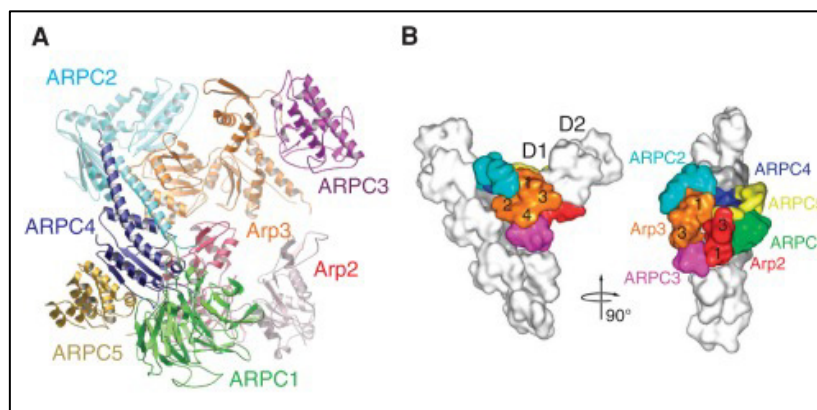
du front de protrusion (Delorme-Walker et al. 2011). De plus, la capacité de flexibilisation des filaments d'actine par la cofiline a été illustrée dans sa capacité à induire des courbures au sein de filopodes neuronaux (Hylton et al. 2022).

La gelsoline et les autres protéines s'y apparentant, ont un mécanisme différent permettant de contrôler la croissance des filaments d'actines. Au sein des cellules, la gelsoline peut se fixer à l'extrémité positive des filaments d'actine. Une fois fixées à cette extrémité, elles vont empêcher la polymérisation du filament et induire sa coupure en aval (Fan et al. 2017). Il est intéressant de noter qu'*in vitro*, par sa capacité à se fixer sur les structures d'actine, la gelsoline peut également jouer un rôle dans la nucléation de monomères d'actine par rapprochement (Burtnick et al. 1997). On ignore si ce phénotype de nucléation existe dans un contexte cellulaire et par quel mécanisme il serait régulé. La gelsoline semble également impliquée dans la dynamique de protrusions cellulaires, notamment en jouant un rôle dans la rétractations de filopodes neuronaux chez la souris (Lu et al. 1997). Enfin, il a été montré que la gelsoline jouait un rôle important dans la dynamique de formation des lamellipodes (Mazur et al. 2010).

### **Protéines nucléatrices**

Bien que l'autoassemblage de l'actine soit possible, ce processus est généralement contrôlé par des facteurs cellulaires. Deux familles de facteurs de nucléation sont particulièrement décrites : le complexe Arp2/3 et les protéines de type formines.

Le complexe Arp2/3 est un complexe protéique composé de 7 sous-unités comprenant les protéines Arp2, Arp3, très similaires à l'actine dans leur structure, ainsi que les sous unités ArpC1/C2/C3/C5. Ce complexe très conservé au cours de l'évolution permet la formation de réseaux arborescents de filaments d'actine. Ce complexe a la capacité de se fixer sur un filament d'actine « Mère » déjà existant et d'induire la nucléation d'un filament « Fille » à un angle d'environ 70°. De cette manière l'extrémité du filament fille peut s'allonger tandis que le complexe ancre l'extrémité négative au filament mère (Rouiller et al. 2008). L'ancrage au filament mère demande un changement conformationnel, coûteux énergétiquement et lent à mettre en place. Pour réguler ce phénomène, l'activité de Arp2/3 est contrôlée par une variété de cofacteurs cellulaires (Rotty et al. 2013).



**Fig. 36 Complexe Arp2/3**

(A) Diagramme en ruban montrant les deux protéines liées à l'actine (Arps) et les cinq sous-unités. Les sous-domaines 1 et 2 d'Arp2 sont désordonnés dans cette structure. (B) Modèle de jonction de branche à partir de reconstructions de micrographies électroniques. Le complexe Arp2/3 ancre une branche représentée par les sous-unités filles D1 et D2 du côté du filament mère en blanc. Les numéros indiquent les sous-domaines d'Arp2 (rouge) et d'Arp3 (orange). Modifié à partir de (Pollard 2016).

Il s'agit par exemple des protéines transductrices des familles WASPs et SCAR/WAVE (SCAR et WAVE désignant la même protéine identifiée respectivement chez *Dictyostelium discoideum* et chez l'Homme). Ces deux groupes de Rho GTPases possèdent un domaine nommé VCA, qui permet de lier une molécule d'actine monomérique ainsi que le complexe Arp2/3. C'est l'ajout de ce premier monomère actine au pseudodimère Arp2/Arp3 qui permet l'induction efficace de la polymérisation (Padrick et al. 2011). Les protéines WASPs possèdent un domaine CRIB d'interaction avec la Rho GTPase Cdc42 qui leur permet de sortir de leur état basal d'auto-inhibition. A l'inverse, les protéines du groupe SCAR/WAVE n'ont pas cette fonction auto-inhibitrice mais à la place forment un complexe régulateur pentamérique composé des protéines WAVEs (WAVE1, WAVE2 ou WAVE3), des protéines Sra-1, Nap1, Abi1 (ou Abi2 ou Abi3) et également de HSPC300 (Innocenti et al. 2004, Steffen et al. 2004). L'interaction de ce complexe avec Rac1 permet son activation et l'initiation de la nucléation par Arp2/3 (Pollitt and Insall 2009). Le rôle prépondérant de ce complexe dans la formation de lamellipodes et de filopodes est très illustré au sein de la littérature scientifique (Korobova and Svitkina 2008, Wu et al. 2012).

Les formines (divisées en classe I et II), constituent un second groupe de protéines nucléatrices de l'actine. Ce sont des protéines homodimériques capables de se fixer sur l'extrémité positive des filaments d'actine par leurs domaines FH2 (formin

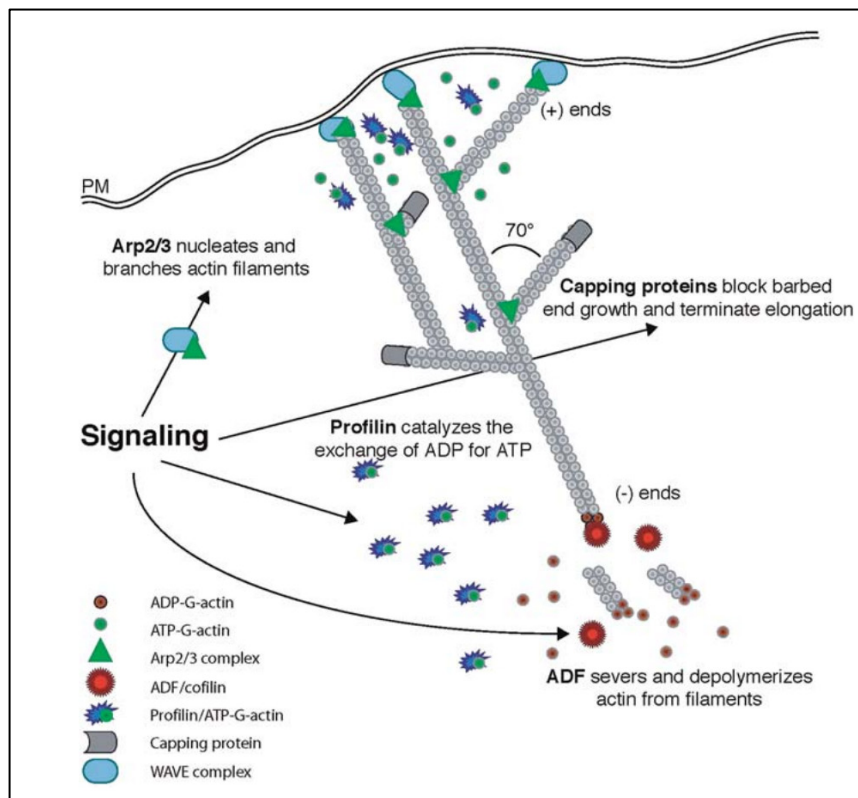
homology 2) et de stabiliser cette structure qui agira comme amorce à la formation d'un nouveau filament (Baker et al. 2015). Une grande partie des protéines de cette familles sont à l'état basal auto-inactivées par l'interaction intramoléculaire de deux de leurs domaines (DAD et DID) (Alberts 2001). Il existe une grande diversité de formines avec 15 isoformes chez les mammifères chacun ayant une affinité spécifique avec certaines Rho GTPases activatrices. Par exemple, Il a été montré que la formine Dia2 était impliqué dans la formation de filopodes et que cette protéine est régulée par Cdc42 (Peng et al. 2003, Block et al. 2008). Cependant elle semble aussi jouer un rôle dans la formation de lamellipodes (Yang et al. 2007). De plus, certaines formines, notamment de la famille Dia, sont capable de se lier aux lipides, en particulier à PI(4,5)P2 (Rouso et al. 2013). Dia2 ne ferait pas exception et une analyse in silico lui prédit la même affinité (Bucki et al. 2019). Ainsi l'un des modèles actuels serait que l'activation des formines à la membrane plasmique par les Rho GTPases serait impliquée dans la croissance polarisée des filaments d'actine et permettant la liaison actine-membrane.

### **e. Lamellipodes et BCPs**

Les lamellipodes sont des protrusions cellulaires larges et aplaties qui sont généralement associées à la migration cellulaire (Abercrombie et al. 1970). On parle d'ailleurs de lamellipode sur une surface en deux dimensions mais on préfère le terme général pseudopodes dans des surfaces en trois dimensions.

La structure des lamellipodes consiste en l'extension de la membrane plasmique poussée par la polymérisation du cytosquelette d'actine au niveau d'un front de migration (Petrie and Yamada 2012). Il a été montré par la microscopie électronique, qu'un réseau de filaments d'actine en arborescence était présent à la base des lamellipodes, dont la croissance est dirigée vers la membrane plasmique (Small et al. 1978). La longueur de ces filaments influence le comportement des lamellipodes. En effet, les protrusions riches en filaments long permettant une progression plus rapide et facilitent le phénomène de ruffling. A l'inverse des filaments courts favorisent une croissance lente mais stable du lamellipode (Bear et al. 2002). La dynamique de ce réseau est dépendante d'un équilibre constant entre polymérisation et dépolymérisation. Un effet de tapis roulant a été observé au niveau des lamellipodes pour en favoriser la croissance (Theriot and Mitchison 1991). Ce phénomène se base

sur la notion de nucléation dendritique c'est-à-dire la formation en continue de brins fille par le complexe Arp2/3 à partir de brins mères (Mullins et al. 1998). Les lamellipodes peuvent de la sorte générer une force de traction supérieure à celles d'autres protrusions comme les filopodes. Ce procédé a pour avantage de permettre une croissance rapide et efficace ainsi qu'une meilleure transmission de l'énergie mécanique des filaments d'actines à la membrane plasmique (Mogilner and Oster 2003).



**Fig. 37 Formation de lamellipodes et nucléation d'actine.**

Le complexe Arp2/3 activé permet la nucléation et la ramification des filaments d'actine au niveau du front de migration, repoussant la membrane cellulaire vers l'avant. Les protéines de coiffe contrôlent la demi-vie de filaments d'actine en bloquant les extrémités positives et favorisent l'élongation dirigée des filaments non coiffés. L'ADF/cofiline favorise la dissociation de l'ADP-actine des extrémités négatives des filaments et sectionne les filaments préexistants, générant ainsi de nouvelles extrémités positives. La profiline catalyse l'échange d'ADP vers l'ATP sur les molécules d'actine monomériques, qui deviennent disponibles pour une nouvelle polymérisation aux extrémités barbelées. Modifié à partir de (Disanza et al. 2005).

La régulation de l'activation du complexe Arp2/3 reste encore en grande partie énigmatique. Cependant on sait que son activation semble dépendante de facteurs promoteurs de la nucléation comme les protéines VASP et SCAR/WAVE. On sait par exemple que le complexe régulateur WAVE (WRC) a un rôle important dans



l'activation de ce complexe dans le cas des lamellipodes et est localisé à l'extrémité des lamellipodes. Cette activation semble dépendante de plusieurs facteurs notamment le recrutement de la protéine adaptatrice IRSP53 qui va permettre l'activation de ce complexe par la RhoGTPase Rac1 (Suetsugu et al. 2006). Cette activation aurait lieu au niveau de la membrane plasmique dans des régions lipidiques riches en PIP3 permettant ainsi la localisation précise de ce phénotype (Takahashi and Suzuki 2010). L'observation récente de la formation de lamellipodes en absence de WRC remet toutefois en cause la nécessité de WRC dans la lamellipodogénèse (Kage et al. 2022).

Un autre acteur primordial sont les protéines Ena/VASP qui apparaissent elle-même comme essentielle à ce processus (Damiano-Guercio et al. 2020). Ces protéines que l'on retrouve aux extrémités des lamellipodes et des filopodes et sont impliquées dans la régulation de la densité du réseau d'actine des lamellipodes (Svitkina 2018). En effet il a été observé qu'en cas d'inhibition des protéines Ena/VASP, ce réseau était composé de filaments plus courts et en denses tandis qu'une surexpression entraînait la présence de long filaments plus instables (Bear et al. 2002). La communication entre le WRC et Ena/Vasp semble assurée par une protéine du nom de lamellopodin capable d'interagir avec les deux complexes et de stimuler leur activation au niveau du front des lamellipodes (Carmona et al. 2016). Un rôle de la formine Dia2 dans l'élongation et la nucléation est également supposé, via une interaction avec la sous unité Abi1 du MRC (Yang et al. 2007).

De plus il a été observé que la formation de lamellipodes se produisait au niveau de membranes enrichies en PI(4,5)P2 (van Rheenen et al. 2007). Il est supposé que ces zones dont on sait qu'elles sont affinitaires pour les cofilines, permettent la mise en place d'un cycle d'activation/inactivation de ces protéines de découpes. Ceci aurait pour fonction de permettre un phénomène de recyclage nécessaire à la mise en formation de filaments nombreux et courts par le complexe Arp2/3 (Svitkina and Borisy 1999). Ce modèle est encore largement incomplet.

Comme dit précédemment, on associe majoritairement la formation de lamellipodes à l'activation de Rac1. Néanmoins il a été montré que d'autres RhoGTPase pouvaient être impliquées dans ce phénomène, RhoG et CDC42 (Schaks et al. 2021). En effet ces deux RHoGTPases ne pouvant pas interagir avec le WRC contrairement à RAC,

elles ne peuvent pas initier la formation de lamellipodes. Cependant il a été prouvé qu'en l'absence de RAC, et en présence de WRC pré-activés, ces deux GTPases participent à la formation de lamellipodes.

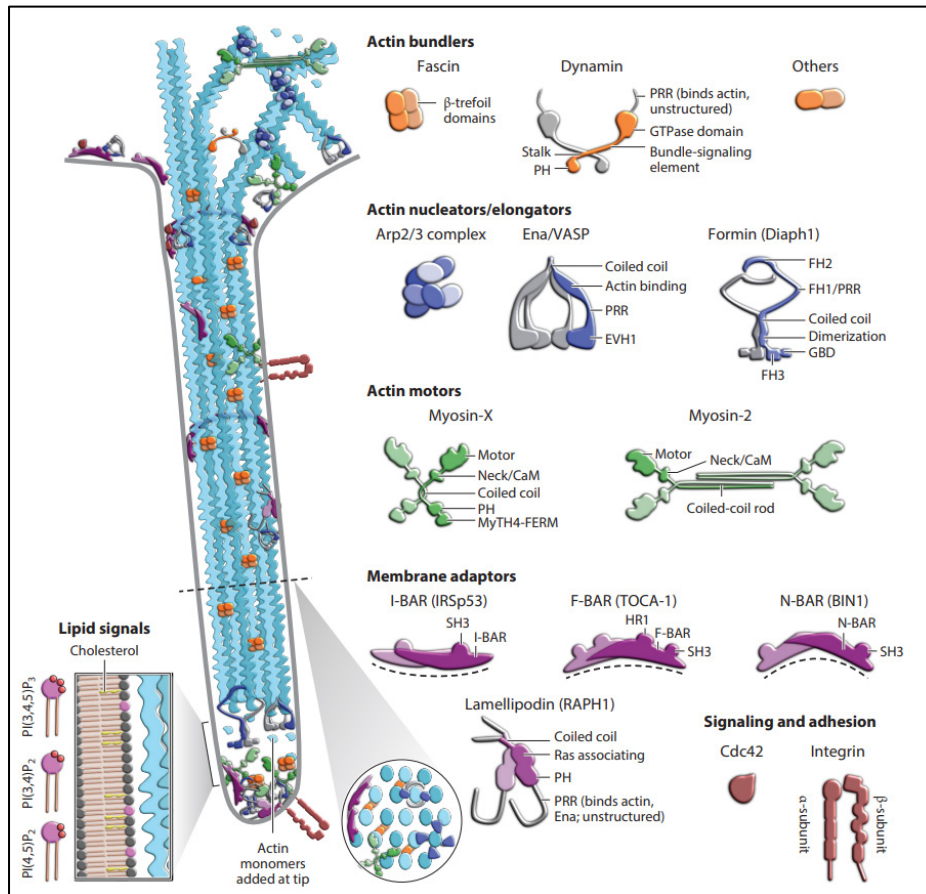
## **f. Filopodes et FLPs**

### **Structure**

La formation de filopodes peut apparaître à première vue comme un phénomène physiologique complètement distinct de la lamellipodogénèse. Ces extensions qu'on qualifie de « finger-like » (semblables à des doigts), pouvant atteindre entre 5 et 35  $\mu\text{m}$  de long et 60 à 400 nm de diamètre (Jacinto and Wolpert 2001). Elles sont la résultante de la polymérisation coordonnée et parallèle de filaments d'actine à la membrane. Ce phénotype semble être déployé par les cellules dans différents cadres. Dans la migration cellulaire par exemple, les filopodes ont pour rôle de contribuer au sensing et à l'orientation de la migration cellulaire (Xue et al. 2010). Également, dans le cadre de la neurogénèse la formation de filopodes permet aux neurones la mise en place des connections cellulaires que constituent les synapses (Wit and Hiesinger 2023).

Le cytosquelette d'actine au sein des filopodes est caractérisé par sa grande plasticité. Il a en effet été mesuré que l'extension et la rétractation de filopodes pouvaient être comprises entre 2  $\mu\text{m}/\text{min}$  et 25  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Dobramysl et al. 2021). Les filaments d'actine y sont organisés en faisceaux de 10 à 30 filaments maintenus par l'action de fascines. Ces protéines agissent comme agrégateurs entre deux filaments d'actines parallèles via deux domaines d'interactions opposés (Lamb and Tootle 2020).

Bien qu'un nombre important d'acteurs cellulaires responsables de ce phénotype aient été identifiés, leurs contributions respectives et leurs interconnexions sont encore largement questionnées. A l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus clair actuel sur le modèle de formation des filopodes. Trois propositions ont été faites pour tenter de répondre à cette question :



**Fig. 38 Architecture moléculaire des filopodes.**

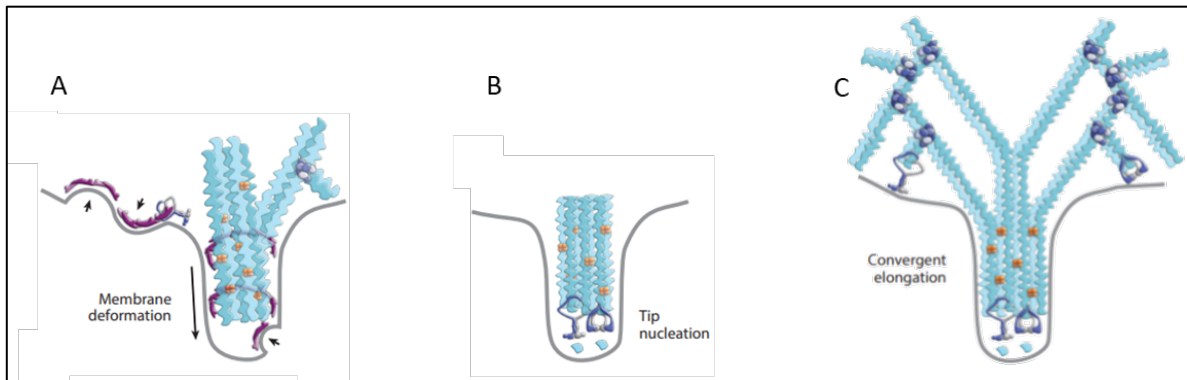
Les protéines de regroupement (orange) sont responsables de l'assemblage en faisceau des filaments d'actine (cyan) au sein des filopodes. Les nucléateurs et les élongateurs d'actine (bleu) interviennent principalement à la pointe et à la base d'un filopode émergent, notamment les protéines Ena/VASP et les formines. Les formines sont libérées de leur état d'auto-inhibition par les GTPases Rho qui lient le domaine de liaison à la GTPase (GBD). Par la suite le domaine d'homologie 2 de la formine (FH2) ajoute des monomères de profiline-actine à l'extrémité positive après qu'ils aient été recrutés par le domaine FH1. La myosine-X est enrichie à l'extrémité du filopode et circule dans l'arbre, la calmoduline (CaM) étant liée au bras de levier de la myosine, tandis que la myosine-2 joue un rôle dans le cortex d'actine à la base (en vert). Les filopodes présentent une courbure membranaire et des microenvironnements lipidiques distinctifs, mis en évidence en coupe transversale (les lipides phosphoinositides sont représentés en rose et le cholestérol en jaune), et sont stabilisés par des protéines adaptatrices membranaires (en violet), qui interagissent avec les membranes à l'aide de domaines BAR ou de domaines d'homologie de pleckstrine (PH). Diverses interactions protéine-protéine sont médiées par des interactions transitoires entre les domaines d'homologie Src 3 (SH3) et les régions riches en proline (PRR). Modifié à partir de (Blake and Gallo 2023).

Le premier modèle est basé autour de l'organisation lipidique de la membrane plasmique. De manière théorique, pour avoir lieu toute déformation membranaire nécessite une réorganisation de la distribution lipidique entre le feuillet interne et externe. Il a été observé dans le cas des filopodes que certaines protéines, possédant un domaine d'interaction lipidique appelé domaine BAR, pouvaient stabiliser les

déformations membranaires (Guerrier et al. 2009). Ces domaines d'interaction de forme convexe, ont la capacité d'interagir avec les membranes courbées en s'y insérant de manière amphipatique. In vitro, les protéines à domaine BAR telles que l'amphyphisine peuvent induire des courbures membranaires (Lee et al. 2002). Ainsi elles permettent dans bien des cas d'établir la liaison entre membrane plasmique et cytosquelette d'actine. Un candidat pour la formation de filopode dans ce modèle est par exemple la protéine IRSp53. Cette protéine possède un domaine I-BAR qui est capable de reconnaître les courbures membranaires (Prévost et al. 2015). Il a été montré que IRSp53 était capable de recruter les facteurs d'élongation et de nucléation VASP et d'induire la formation et l'élongation de filopodes lorsque recruté à la membrane plasmique (Jones et al. 2020b, Tsai et al. 2022). De plus IRSp53 est régulée par Cdc42, traditionnellement associé à la filopodogénèse (Kast et al. 2014). De ce fait, il est supposé dans ce modèle que c'est le recrutement du cytosquelette d'actine à des sites de courbures membranaires par les protéines BAR que se forment les filopodes. De plus la structuration de ces courbures par les protéines BAR formerait un échafaudage permettant par ailleurs de diminuer le seuil énergétique nécessaire à la poussée de la membrane (Mancinelli et al. 2021).

Le deuxième modèle suppose la formation de filopodes à partir de structures d'actine branchée préexistante. Dans ce modèle, la présence d'actine branchée par le complexe Arp2/3 à proximité de la membrane plasmique est nécessaire à l'initiation de croissance filopodienne. Cette idée peut paraître contre intuitive car le complexe Arp2/3 semble absent des filopodes (Svitkina and Borisy 1999). Toutefois, la perturbation de la localisation de ce complexe stimule la formation de filopodes chez les macrophages (Machesky and Insall 1998). Plus récemment, le rôle d'Arp2/3 dans la formation de filopodes a été mis en lumière par une étude fonctionnelle in vitro à partir de lysat cellulaire et de membrane artificielle (Lee et al. 2010). Dans cette étude, la protéine à domaine BAR Toca-1 recrute les protéines WASP dans des zones enrichies en PI(4,5)P2. Ce complexe recruterait par la suite le complexe Arp2/3 suivi des facteurs Dia2 et Ena/VASP et enfin la fascine. Ainsi ce modèle suppose que la formation de filopodes et de lamellipodes sont deux phénomènes liés. La présence d'un réseau d'actine dense favoriserait le regroupement de certains de ces filaments par des protéines aggregatrices comme la fascine, induisant par la suite la poussée rapide et localisée du faisceau d'actine. D'autres éléments viennent appuyer cette

proposition. On peut par exemple noter que bien que canoniquement associé à Cdc42, la formation de filopodes semble être dans certains cas régulée par Rac1 (Dumontier et al. 2000, Cohen et al. 2010).



**Fig. 39 Modèles de formation des filopodes**

*Les molécules et les mécanismes impliqués dans la formation des filopodes peuvent être envisagés de différentes manières. Les modèles présentés ici sont, (A) Modèle par déformations membranaires, (B) Modèle de nucléation localisée, (C) Modèle de nucléation convergente. Modifié à partir de (Blake and Gallop 2023).*

Enfin le troisième modèle consiste en la nucléation dirigée de l'actine au niveau de la membrane plasmique. Cette hypothèse est basée sur le fait que certaines formines, comme Dia2, capables d'induire nucléation et élongation de l'actine sont présentes aux extrémités de filopodes et nécessaires à leurs formation (Schirenbeck et al. 2005, Yang et al. 2007). Cependant ce modèle fait face à certaines contradictions. D'une part, l'étude plus approfondie de la localisation de Dia2 à montrer qu'initialement cette formine se trouve à l'extrémité de lamellipodes avant d'être recruté plus précisément au niveau de l'extrémité de filopodes naissants ou se rassemblent les faisceaux d'actine (Yang et al. 2007). Ainsi il est apparu que la nucléation précède le recrutement de Dia2 et donc, que celui-ci n'est pas à l'origine de ce phénomène. Cependant le modèle de la nucléation par les formines reste possible et n'exclut pas le modèle de nucléation branchée. Ceci expliquerait la persistance de filopodes dans les cas où Arp2/3 est inhibé (Steffen et al. 2006). On peut donc considérer que plusieurs types de filopodes coexistent au sein du processus cellulaire bien que l'utilité de plusieurs mécanismes redondants ne soit pas nécessairement évidente.

### **TNTs, des FLPs particuliers**

Les tunnelling nanotubes (TNTs) constituent un type de protrusion cellulaire qui peut à première vue, sembler similaire aux filopodes. Par certains aspects, ces extensions

tubulaires sont bien discernables des filopodes. D'un diamètre compris entre 50 et 700 nm et d'une longueur entre 20 et 100  $\mu\text{m}$ , les TNTs permettent d'établir une connexion entre deux cellules et de transporter des cargos cellulaires entre elles (Rustom et al. 2004). Contrairement aux filopodes, les TNTs sont composés de filaments d'actine mais également de microtubules (Zurzolo 2021). Leurs mécanismes de formation sont également radicalement différents. Ainsi la voie de signalisation Cdc42-VASP-IRSp53 contribuant à la formation des filopodes régule négativement la formation de TNTs. A l'inverse, on retrouve chez les TNTs la protéine Eps8 qui peut inhiber la formation de filopodes (Menna et al. 2009, Delage et al. 2016). Cependant, la découverte d'autres types d'extensions permettant le transfert intercellulaire a amplement complexifié la classification de ces structures. De ce fait, il est proposé de considérer ces extensions de transfert comme des « filopodes spécialisés ». On peut donc considérer que le critère principal permettant de discriminer ces filopodes spécialisés des filopodes canoniques soit leur capacité de transfert de cargo intercellulaire (Yamashita et al. 2018).

## **6.2. Protrusions membranaires et infections virales**

Au cours de l'infection, les espèces virales modulent les processus cellulaires à leur propre bénéfice. Ces modifications concernent en particulier les membranes des organelles cellulaires, et leur détournement est nécessaire à la réplication et à la propagation efficace de nombreux virus (Hernandez-Gonzalez et al. 2021). Ces modifications se traduisent en particulier par la formation de diverses protrusions cellulaires. La formation de ces protrusions est souvent de pair avec une prise de contrôle des voies de régulation du cytosquelette de la cellule hôte. Cela peut se faire de manière extra cellulaire, par la fixation à des récepteurs cellulaires, ou alors de manière intra cellulaire par l'association avec des facteurs cytoplasmiques. Malgré des descriptions nombreuses, il n'existe que très peu de travaux de synthèse sur ces modifications souvent spectaculaires d'un point de vue microscopique. Cette section est dédiée à la description succincte des protrusions les plus caractéristiques observées au cours des infections virales et à leur rôle fonctionnel au cours du cycle infectieux.

## a. Protrusions induites viralement

### Lamellipodes ou BCPs

Peu d'exemples de lamellipodes viralement induits ont été décrits. La plupart de ces observations sont associées au rôle des lamellipodes dans la migration cellulaire et ont donc été étudiée par ce biais.

Ce phénotype est en particulier observé au cours de l'infection par le Varicella Zoster Virus (VZV), membre des *Herpesvirus*. Ce virus, responsable de myélopathies et autres complications neurologiques, est capable de réarranger le cytosquelette des cellules qu'il infecte (Carpenter et al. 2008). Ainsi, les astrocytes infectés par le VZV se caractérisent par une augmentation de la formation de lamellipodes et de la motilité cellulaire (Meshki et al. 2011, Bubak et al. 2018). Bubak *et al* ont également pu montrer que ce phénotype est associé à la translocation nucléaire de la protéine réceptrice transmembranaire de type tachykinine nommée NK-1R (Neurokinin Receptor 1). Cette protéine, participe au réarrangement du cytosquelette d'actine et des microtubules via l'activation de la Rho-GTPase RhoA, et permet la formation de blebs à la surface de cellules neuronales. Cette activation de RhoA serait médiée par les protéine activatrices G<sub>12</sub> et G<sub>13</sub> (Meshki et al. 2009). L'Aprepitant et le Rolapitant, deux inhibiteurs chimiques de NK-1R, inhibent efficacement la formation de lamellipodes et soulignent son rôle prépondérant dans la formation de ces protrusions (Meshki et al. 2011).

Un phénotype proche a également été démontré dans le cas du virus de la Vaccine (VACV), de la famille des *Poxvirus*. L'infection y est associée à la formation de BCPs de type podosome et la migration des cellules hôtes (Sanderson et al. 1998). Les cellules infectées déploient des podosomes de migration dont la rétractation progressive laisse place à de longues et fines protrusions semblables à des filopodes. Dans cette forme de motilité, le virus prend le contrôle de la formation de fibres de stress via le ciblage de RhoA. En effet la protéine virale F11 via ses domaines PDZ se fixe sur les activateurs de la Rho GTPase, comme la myosine-9a, et de ce fait bloque l'activation de cette voie (Handa et al. 2013). Il en résulte ainsi une dépolymérisation des fibres de stress, qui permettrait la modulation de la migration cellulaire. On peut noter que l'action de F11 sur cette voie de régulation apparait comme redondante avec l'action d'une autre protéine virale, la protéine F10. En effet cette protéine kinase virale,

a montré en contexte hors infectieux la capacité de perturber la formation de fibres de stress. Ce phénotype est lié à la capacité de F10 de phosphoryler la formine Dia1, effectrice de RhoA (Greseth et al. 2017). Ainsi cette capacité apparaît comme importante pour virus, deux protéines y étant consacrées. Le ciblage des fibres de stress peut apparaître comme contre intuitif. En effet les fibres de stress sont généralement considérées comme des structures permettant l'adhésion et la traction de l'ensemble du corps cellulaire, essentielles à la migration. Cependant il a été observé que ces structures ne sont pas universellement nécessaires à la migration cellulaire (Valerius et al. 1981, Rubino 1984). Ainsi il est proposé que les fibres de stress pourraient jouer un rôle négatif sur la migration, dû à la forte stabilité de ces structures (Cheng et al. 2016). On ignore encore le rôle exact de l'inhibition de la voie de régulation des fibres de stress mais elle apparaît comme essentielle dans la migration cellulaire induite par VACV (Valderrama et al. 2006, Handa et al. 2013). En parallèle une autre protéine virale nommée VGF, est capable lorsque clivée par des protéases cellulaires d'agir sur la voie des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR) (Beerli et al. 2019). Cette voie, est capable dans un contexte cellulaire de transduire des signaux externes, comme la fixation du facteur de croissance TGF- $\alpha$  (transforming growth factor alpha), au reste de la machinerie de régulation cellulaire. Par conséquent cette voie permet la régulation et surtout la polarisation de la migration cellulaire. L'activation de cette voie via la protéine VGF est un autre moyen par lequel VACV induit et contrôle la migration de ses cellules hôtes.

Un dernier exemple de virus induisant la formation de BCPs lors du cycle infectieux réside dans le HIV. En effet, ce *Rétrovirus* est capable d'influencer grandement la migration des cellules qu'il cible. D'une part, *in vitro* il réduit la capacité de migration des lymphocytes T qu'il infecte via protéine accessoire Nef (Lu et al. 2008, Vérollet et al. 2015). A l'inverse, cette même protéine est capable de favoriser à migration des macrophages infectés à travers la membrane mésenchymateuse via la formation de podosomes (Vérollet et al. 2015). On ignore exactement comment Nef influence de manière sélective la migration cellulaire. Toutefois il a été identifié que cette protéine virale est capable d'interagir avec les protéines PAKs et avec la formine Dia1. Ces protéines régulent négativement RhoA ce qui favorise la formation de lamellipode à la surface des cellules infectées (Renkema et al. 1999, Lu et al. 2008). De plus Nef module également l'activité de la cofiline ou des protéines WASP, acteurs clés de la



formation de lamellipodes (Haller et al. 2006, Stolp et al. 2009). Il apparait également que cette modulation de la migration des lymphocytes T peut se faire de manière extracellulaire. En effet lors de contacts entre des lymphocytes T et des cellules dendritiques arborant à leur surface des particules virales non endocytées, la motilité des lymphocytes T est réduite (Koh et al. 2020). La source de ce phénomène reste encore mystérieuse, mais elle semble nécessiter l'interaction entre la protéine d'enveloppe virale gp120 et le récepteur cellulaire CD4.

### **Filopodes ou FLPs**

Contrairement aux lamellipodes, la formation de filopodes viralement induits, est souvent décrite dans la littérature scientifique. On observe ce phénotype pour une grande diversité d'espèces virales, notamment dans les cellules infectées par le VACV, les *Herpesvirus* tels que le cytomégalovirus humain (HCMV), les *Paramyxovirus* dont le virus respiratoire syncytial (RSV), les *Orthomyxovirus* avec le virus de la grippe A (IAV), les *Filovirus* avec le virus de Marburg (MARV) et le virus Ebola (EboV), et les *Asfarvirus* avec le virus de la peste porcine africaine (ASFV) (Alvarez and Agaisse 2015, Chang et al. 2022, Hunziker et al. 2022, Mehedi et al. 2016, Kolesnikova et al. 2007, Jouvenet et al. 2006). Pour illustrer la diversité de ces profils, seront présentés ici uniquement quelques exemples provenant de familles virales distinctes :

Pour la famille *Herpesvirus*, plus précisément les *Alphaherpesvirus* tels que VZV, la formation de lamellipodes par les astrocytes infectés induites par la translocalisation de NK-1R vers le noyau, décrite plus haut, est également concomitante de la formation de longues extensions de type filopodes (Bubak et al. 2018). Des accumulations de protéines virales et d'ARN viraux ont pu être observées le long de ses extensions membranaires (Carpenter et al. 2008).

Pour l'herpèsvirus porcin 1 ou PRV (Pseudorabies virus), la formation de projections cellulaires riches en actine et tubuline a été attribuée à la kinase virale US3 (Favoreel et al. 2005). En effet Favoreel *et al*, ont établi que cette protéine virale est capable, y compris dans un contexte non infectieux, d'induire des projections cellulaires actives, désignant des projections indépendantes de la rétractation de lamellipodes. Ces observations suggèrent alors un modèle de formation différent de la nucléation convergente. Il a par la suite été établi que la protéine US3 était capable d'activer les

voies de régulation du cytosquelette Cdc42 et Rac1 en activant la phosphorylation de Pak1 (Van den Broeke et al. 2009a).

Un autre exemple remarquable est celui des papillomavirus. En effet l'étude du papillomavirus humain 16 (HPV16) met en lumière la capacité de ce virus à induire la formation de filopodes en s'attachant à la membrane de ses cibles cellulaires (Biondo and Meneses 2022). Il émerge de ces résultats un modèle où la fixation des particules virales à leurs récepteurs membranaires induirait une transduction de signaux résultant en la formation de filopodes. Actuellement, la nature du récepteur permettant la transduction de ce signal reste inconnue. Cependant, en aval, le ciblage de Cdc42 *in vitro* via son inhibiteur ML-141 a montré un effet négatif sur la formation de ces protrusions (Schelhaas et al. 2008). Ce détournement a été imputé à la protéine d'enveloppe virale E6 capable d'interagir avec la GEF ARHGEF16, activatrice de Cdc42 (Oliver et al. 2011).

Le HIV est également un cas intéressant, capable de stimuler non seulement la formation de lamellipodes comme décrit plus haut, mais également de favoriser la formation de filopodes dans chez les cellules infectées (Nobile et al. 2010). Dans ce cas également c'est la protéine Nef qui en est responsable et qui est capable d'induire dans un contexte hors infection la formations de filopodes. Dans le contexte infectieux, une accumulation de matériel viral est observé au niveau de ces filopodes (Aggarwal et al. 2012). Les mêmes auteurs ont par la suite montré que le HIV mobilisait la voie Cdc42-IQGAP1-Arp2/3 pour former ces structures. Il est intéressant de noter que l'implication de plusieurs acteurs du cytosquelette d'actine comme IrsP53 et le complexe Arp2/3 sont impliqués dans le transport vésiculaire des particules de HIV vers la membrane plasmique ; supportant l'idée que la prise de contrôle du cytosquelette d'actine est significative dans le cas de l'infection HIV (de Poret et al. 2022).

## **b. Usages viraux des protrusions membranaires**

Si certains virus sont capables d'induire des déformations membranaires comme des filopodes ou des lamellipodes nous sommes en droit de nous questionner sur le bénéfice potentiel que ces protrusions fournissent au cycle viral. Bien que ces

phénomènes soient encore pour la plupart peu étudiés, on peut observer plusieurs cas de figure.

### **Entrée virale**

Dans un premier temps on peut supposer que le fait qu'une cellule infectée émettent des projections membranaires favorise l'entrée des particules virale.

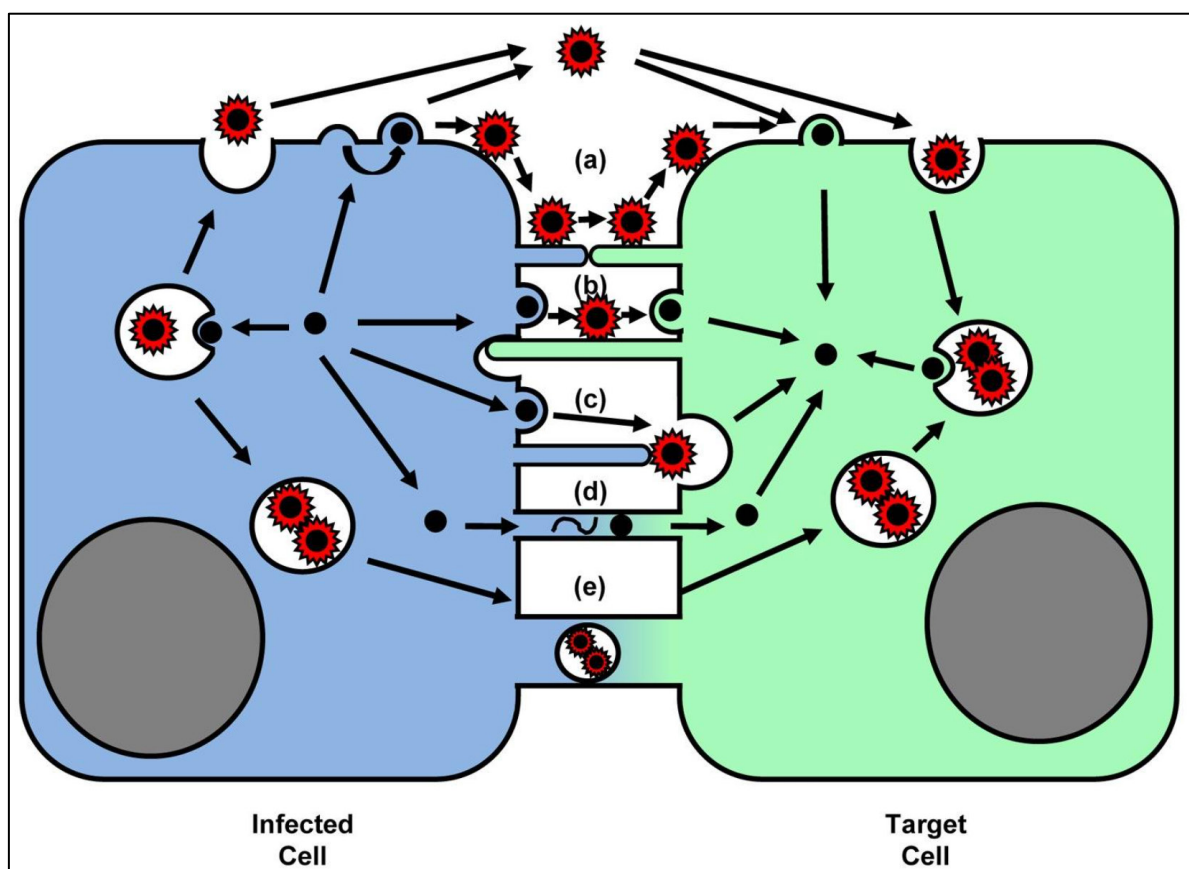
Si ces protrusions sont induites par les étapes intracellulaires de l'infection, ces structures facilitent alors la réinfection par de nouvelles particules virales, augmentant la charge virale. Ainsi on a pu observer que dans le cas de HSV, qu'en plus d'induire la formation de structures filopodiques, ce virus se fixe de manière préférentielle sur les filopodes de cellules déjà infectées que sur le reste du corps cellulaire (Oh et al. 2010). Les auteurs ont pu observer que la glycoprotéine virale d'entrée gB et la présence d'héparanes sulfates à la surface des filopodes semblent responsable dans ce processus. Il a été également observé dans ce cas de figure un phénomène de « surfing », ou les particules virales migrent le long des filopodes pour atteindre le corps cellulaire.

Un autre processus proche du surfing, est l'utilisation de la dynamique des filopodes pour se rapprocher du corps cellulaire (Fig. 40). Chez HPV, les particules virales HPV fixées aux FLPs induits par le virus sont attirées vers le reste du corps cible par la rétractation de ces structures (Smith et al. 2008).

La formation de protrusions peut être partie intégrante de processus d'endocytose alternatifs comme la macropinocytose. Dans ce cas, le remodelage membranaire est induit par les étapes extracellulaire du cycle viral. Ce phénotype a été observé chez HPV. Il apparait que l'induction de FLPs chez la cellule hôtes est bénéfique à l'entrée virale (Schelhaas et al. 2008, Biondo and Meneses 2022). *In vitro*, l'inhibiteur ML-141 prévient la formation de ces extensions et possède également un effet délétère sur l'infection virale. A l'inverse, la bradykinine connue pour stimuler la formation de filopodes induit une augmentation de l'infection virale (Schelhaas et al. 2008). Il est alors supposé que ces structures permettraient alors une meilleure entrée virale au sein des cellules cible, possiblement en stimulant la macropinocytose des particules infectieuses (Kay, 2021). Cette forme particulière d'endocytose virale a déjà été observée dans le cas d'autres virus tels que HIV, VACV ou HSV1 (Mercer and Helenius 2009). Néanmoins, l'entrée virale d'HPV ne mobilise pas certains facteurs

canoniques de cette voie particulière d'endocytose, suggérant un mécanisme proche mais néanmoins distinct (Schelhaas et al. 2012).

Le détournement par les virus de protrusion déjà formée par la cellule hôte est également possible. C'est par exemple le cas du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et du virus de la leucémie murine (MLV) (Lehmann et al. 2005). Lors du surfing, les particules virales mobilisent le moteur moléculaire qu'est la myosine II pour migrer le vers le corps cellulaires en suivant les filaments d'actine. Ce phénomène se déroule avant les étapes de fusion membranaires.



**Fig. 40 Propagation virale et déformations membranaires**

*(a, b) En plus de la propagation acellulaire, les virus peuvent rester associés à la surface de la cellule infectée et se propager à travers de longs ponts filopodiaux qui relient les cellules donneuses et les cellules cibles. (c) Le VACV reste associé à la cellule infectée pour induire une polymérisation de l'actine et se propulser vers les cellules voisines. (d, e) La connectivité cytosol à cytosol peut favoriser la transmission d'éléments viraux ou de particules virales. Modifié à partir de (Zhong et al. 2013).*

## **Sites de bourgeonnement**

La formation de protrusions cellulaires peut également favoriser la propagation virale en favorisant le contact avec des cellules non infectées (*Fig. 40*). Les protrusions cellulaires facilitent de ce fait le transfert de particules virales d'une cellule à une autre par le rapprochement des deux membranes plasmiques. La diminution de la distance entre cellule bourgeonnante et cellule cible, permet d'augmenter la probabilité de contact avec les récepteurs cellulaires.

Chez les *Herpesvirus* tels que VZV ou PRV, il a par exemple été observé que les FLPs induits par l'infection présentent une accumulation importante de particules virales bourgeonnantes, trafiquant depuis le cytoplasme sous forme « d'autoroutes virales » (Viral Highways) L'inhibition de la formation de ces extensions par l'utilisation de drogue est corrélée à une baisse significative de la propagation virale en culture (Favoreel et al. 2005, Carpenter et al. 2008).

Dans le cas des *Filovirus* MARV et du virus Ebola (EBOV) les filopodes semblent être des lieux de bourgeonnement privilégiés. C'est par l'utilisation de la myosine X que la nucléocapside virale est adressée aux filopodes (Schudt et al. 2013). Chez des *Rétrovirus* il a été montré que le virus de la tumeur mammaire de la souris (MMTV) était capable d'induire des filopodes et que ces filopodes étaient un site favorisé de bourgeonnement (Damsky et al. 1977). Cibler le cytosquelette d'actine a ainsi été corrélé avec une diminution dramatique du bourgeonnement viral (Maldarelli et al. 1987). Le même phénotype a été observé par la suite chez HIV (Carlson et al. 2010, Aggarwal et al. 2012).

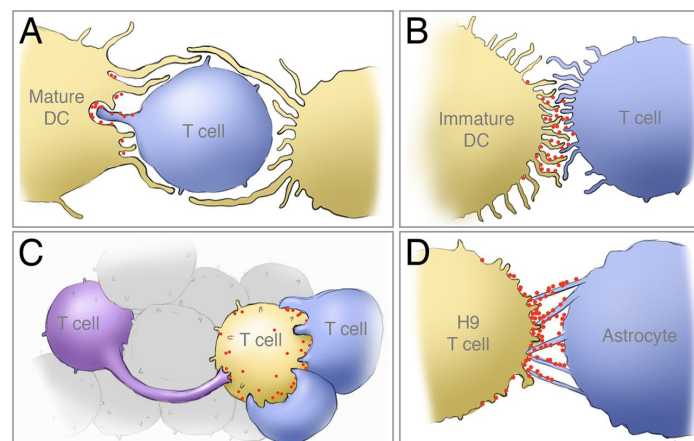
## **Rapprochements membranaires**

La présence de particules virales aux extrémités des protrusions virales peut faciliter l'accès d'une cellule voisine non infectée. La transmission de cellule à cellule permet d'éliminer les risques liés à la diffusion dans le milieu extracellulaire. Les mécanismes moléculaires derrière ces rapprochements sont encore mal compris.

Chez VACV ce phénomène a été décrit sous le terme de queue d'actine (« actin tails ») par homologie avec un phénotype proche chez certaines bactéries pathogènes intracellulaires (Welch and Way 2013). En effet il a pu être observé que des protrusions cellulaires étaient formées chez les cellules infectées, protrusions qui permettent la

projection de virions de l'extrémité de ces structures vers des cellules non infectées (Cudmore et al. 1995).

Un autre exemple de cette stratégie est l'établissement de synapses virologiques chez les *Rétrovirus*. En effet, certains virus sont capables de détourner la fonction de synapse immunologique pour favoriser le transfert entre cellules immunitaires. Ce cas a d'abord été rapporté chez le Virus T-lymphotrope humain (HTLV) pour permettre le transfert de particules virales entre lymphocytes (Bangham 2003). Ces observations ont par la suite été transposées au cas du HIV. En effet, que les filopodes viraux formés dans les cellules dendritiques (DC) facilitent le transfert de particules virales chez les lymphocytes CD4+ non infectés (Nikolic et al. 2011, Aggarwal et al. 2012). Ceci concorde avec plusieurs observations qui tendent à montrer que ces cellules infectées tendent à former de longues extensions vers d'autres cellules immunitaires, permettant la mise en place de synapses virales (Do et al. 2014) (Fig. 41).



**Fig. 41 Synapses virologiques établies par HIV**

Illustration schématique de quatre types distincts de synapses virologiques du HIV-1. Ces structures ont été déterminées par microscopie électronique 3D. (A) Encastrement de la cellule cible par une cellule dendritique (DC) mature et interaction des filopodes de la cellule T cible avec les réservoirs viraux dans les DC ; (B) réseau d'extensions filopodales dans la zone de contact cellule-cellule qui permet le transfert du virus de la surface des DC immatures vers les cellules T CD4+ non infectées ; (C) réarrangement et changement de forme des cellules T CD4+ non infectées permettant un contact étendu de la membrane avec les cellules T infectées par le HIV-1 ; (D) des ponts membranaires s'étendent des astrocytes aux régions de contact avec les cellules T infectées par le HIV-1, fournissant un mécanisme permettant aux virus de "surfer" de la cellule infectée à l'astrocyte. Modifié à partir de (Do et al. 2014).

## **Fusion cytosolique**

L'établissement de ponts cytoplasmiques entre cellules permet le trafic d'éléments pathogènes vers la cellule cible. L'utilisation de ces structures permettent alors de contourner les étapes d'endocytose du cycle viral et de ne pas être vulnérable aux éléments antiviraux extracellulaires. L'induction et l'utilisation de TNTs pour la propagation virale est un phénomène observé chez une grande diversité d'espèces virales.

Les *Rétrovirus* en font partie. Le HIV a tout d'abord été observé comme capable d'utiliser ces protrusions pour sa propre propagation entre lymphocytes T et est capable d'induire la formation de ces TNTs chez les macrophages (Sowinski et al. 2008, Eugenin et al. 2009). Ce phénotype est également présent chez HTLV et la protéine virale P8 semble en être responsable (Van Prooyen et al. 2010). Chez InV, cette capacité de former et utiliser des TNTs a été observé au sein de cellules respiratoires via le transfert de protéines et de génome viral via ces structures (Roberts et al. 2015, Kumar et al. 2017).

Un cas similaire a été décrit chez un autre virus respiratoire, le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV) (Guo et al. 2016). Enfin les *Herpesvirus*, tels que le PRV comme mentionné précédemment induit la formation de protrusions de transfert via sa protéine US3 (Favoreel et al. 2005). De plus le transfert de matériel infectieux se fait par le transit de virions au sein de vésicules de transport (Jansens et al. 2017).

## **Contrôle de la motilité cellulaire**

Les lamellipodes et filopodes étant fortement impliqués dans la motilité cellulaire, l'induction de ces protrusions par certains virus peut être liée à une prise de contrôle de la machinerie de migration. Les cellules infectées agissent alors comme cheval de Troie et permettent au virus d'avoir accès à certains compartiments organiques peu accessibles.

Dans les cas de VZV décrit plus haut, la migration cellulaire induite par l'infection semble avoir cette fonction. Les deux inhibiteurs chimiques de NK-1R Aprepitant et Rolapitant, inhibent ainsi que la propagation de VZV en culture et la formation de lamellipodes. De ce fait, on peut supposer que la formation de lamellipodes

influencerait la migration ces cellules infectées et aurait un rôle dans la propagation virale de cellule à cellule (Meshki et al. 2011). Cette hypothèse n'est cependant pour l'instant pas encore confirmée.

Dans le cas de VACV, l'induction de lamellipode est corrélée avec une augmentation de la migration chez les cellules infectées (Beerli et al. 2019). Cette capacité d'induire la migration cellulaire est apparue comme cruciale dans la propagation virale *in vivo* et *in vitro* (Cordeiro et al., 2009).

Chez DENV, il a par exemple été établi que chez certaines souches neurotoxiques étaient capables d'infecter des microglies et d'induire la formation de lamellipodes de migrations. La formation de ces structure favorise la migration cellulaire et pourrait être le moyen par lequel l'infection traverse la barrière hématoencéphalique (Jhan et al. 2017).

Chez les *Herpesvirus*, le virus du sarcome de Kaposi (KSHV) est capable d'induire la formation de filopodes via la protéine gB capable d'activer différentes RhoGTPases (Sharma-Walia et al. 2004). En parallèle ce virus cancérigène, favorise chez les cellules souches mésenchymateuses la migration cellulaire (Wang et al. 2020a).

Enfin il a été montré qu'en plus d'induire des protrusions cellulaires, l'infection par HIV permet la modulation de la migration cellulaires chez les Lymphocytes T, des macrophages et les DCs infectées (Lu et al. 2008, Vérollet et al. 2015, Koh et al. 2020). Le détournement de la migration cellulaire, est avantageux çà plusieurs aspects pour le virus. D'une part la migration de cellules immunitaires infectées permet la propagation virale dans différents compartiments, notamment les ganglions lymphatiques. D'autre part la stabilisation de l'interaction entre cellule dendritique et Lymphocytes T en inhibant la migration de ces derniers (Koh et al. 2020).

### **c. Chez CHIKV et les *Alphavirus***

Comme d'autres virus à ARN+, les *Alphavirus* induisent le réarrangement significatif et des membranes cellulaires et du cytosquelette lors de leurs cycles viraux. Ainsi on compte trois grandes déformations induites par les Alphavirus, la formation de structures filopodiennes, de vacuoles cytopathiques et d'organelles de réplication. La



formation des vacuoles cytopathiques et organelles de réplication est abordée dans la section suivante (0).

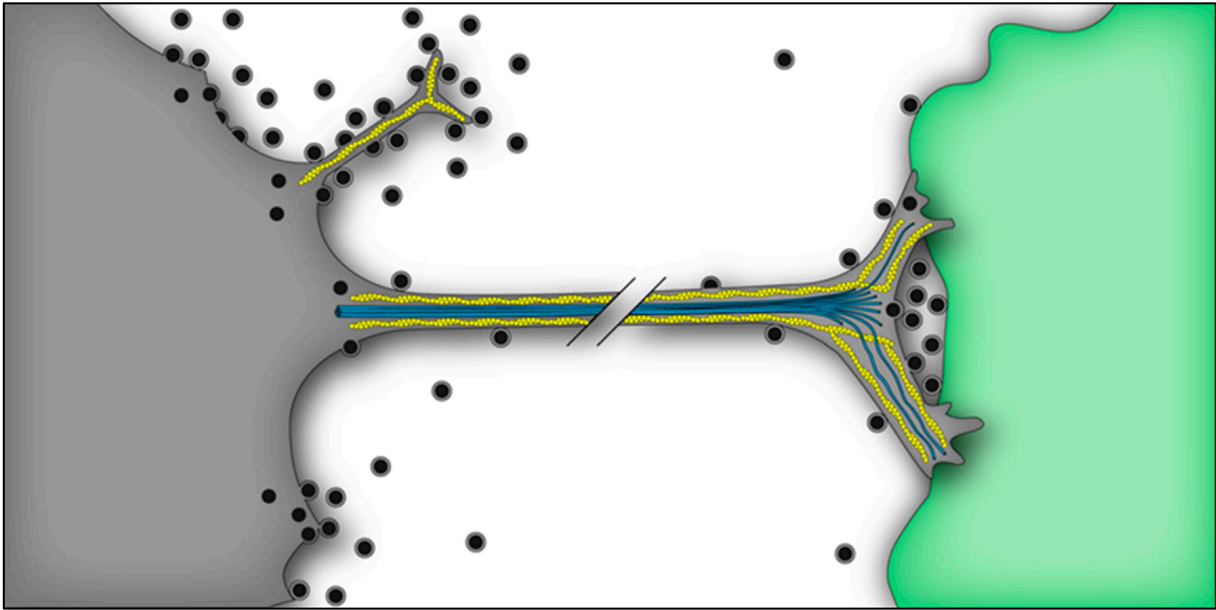
La capacité des *Alphavirus* à induire la formation de protrusions filopodienne a été pour la première fois décrite par Laakkonen *et al* en 1998 (Laakkonen et al. 1998a). Il était observé auparavant que l'infection de cellules mammifères par les *Alphavirus* entraîne la formation de protrusions membranaires similaires à des filopodes. Il a été proposé par Martinez *et al* que ces protrusions contiennent deux populations distinctes de protrusions aux profils distincts (Martinez et al. 2014a).

Dans un premier temps la formation de FLPs par les virus a été associée à l'expression de la protéine nsP1. Laakkonen *et al.* ont pu décrire que l'expression isolée de la protéine nsP1 de SINV et SFV suffit à reproduire ce phénotype sur des lignées humaines Hela. Ces protrusions contiennent la protéine nsP1 en elle-même qui colocalise avec les protéines cellulaires CD44 et ezrine (Laakkonen et al. 1998a). Ces deux protéines transmembranaires jouent un rôle clé dans la liaison entre le cytosquelette d'actine et la membrane plasmique (Wang et al. 2014). Ces protrusions entre 2 et 7 µm de longueur, ces structures contiennent la protéine nsP1, des filaments d'actine et sont dépourvues de microtubules (Martinez et al. 2014a). De plus ces courtes extensions contiennent l'ensemble des protéines structurales (Martinez et al. 2014a). Leur formation est associée à un remodelage significatif du cytosquelette d'actine, associé en particulier à la désorganisation des fibres de stress. Les traitements visant à inhiber la polymérisation de l'actine ou à perturber les microtubules avait également peu d'effet sur ces protrusions (Laakkonen et al. 1998a). A l'inverse le domaine de palmitoylation de ces virus est apparu comme critique à l'établissement de ces fonctions, ce qui est cohérent avec la localisation de nsP1 au sein des protrusions (Laakkonen et al. 1998a). Des protrusions similaires ont pu être observées chez d'autres *Alphavirus*, comme CHIKV ou VEEV ce qui laisse penser que cette caractéristique est conservée pour nombre d'entre eux (Martinez et al. 2014a, Reynaud et al. 2016).

Il est apparu plus tard que la protéine structurale d'enveloppe E2, a elle aussi la capacité d'induire des protrusions cellulaires lors du cycle infectieux de SINV (Martinez and Kielian 2016). Ces protrusions sont distinctes de celles induites par nsP1. Martinez et Kielian, les décrivent comme de fines et longues protrusions (10 - 60 nm)

apparaissant entre six et sept heures post infection et contenant des filaments d'actine et des microtubules. La formation de ces protrusions est abolie par la mutation (Y400K) protéine E2, ce qui inhibe le bourgeonnement viral. Dans le cadre de l'infection SINV ces extensions contiennent la protéines E2 ainsi que E2 et la nucléocapside (Martinez et al. 2014a). La formation de ces FLPs est encore peu élucidée, cependant il apparait qu'elles nécessitent la présence de E2 à la membrane plasmique de même que son interaction avec la capsid (Martinez and Kielian 2016, Brown et al. 2018). A l'inverse, l'interaction entre E1 et E2 ne semble pas affecter ce processus (Byrd and Kielian 2017). De ce fait, l'expression isolée des protéines structurales induit la formation de ses longues extensions, la production de particule pseudo virales mais pas la formation des protrusions courtes similaires à nsP1 (Martinez and Kielian 2016). Ces extensions longues ont été observées chez différents *Alphavirus* (SINV, SFV, CHIKV, VEEV) et à la fois chez des lignées cellulaires mammifères et insecte (CHO, Vero, U2-OS, BHK, C6/36) (Martinez et al. 2014a, Martinez and Kielian 2016, Jose et al. 2017a). Il est à noter qu'il existe des disparités dans l'apparition de ces phénotypes. Par exemple ces protrusions sont formées dans le cas d'infection de lignée CHO par SINV mais pas par CHIKV et SFV.

Le rôle de ces protrusions dans le cycle infectieux a cependant été en parti élucidé. Ces protrusions courtes et longues ont été observées comme des lieux de bourgeonnements des *Alphavirus* en cellules de mammifères ou d'insectes (Birdwell et al. 1973, Martinez and Kielian 2016, Jose et al. 2017a, Girard et al. 2023a). L'une des hypothèses envisagées pour expliquer ce phénotype serait les particules bourgeonnantes sont adressées au niveau de ces extensions pour diminuer la probabilité d'être endocytées avant libération par la formation de CPVs (Spuul et al. 2010).



**Fig. 42 Protrusions cellulaires induites par les Alphavirus**

*Un remodelage spectaculaire du cytosquelette se produit au cours de l'infection par les Alphavirus, et l'on observe de courtes extensions de type filopodes (en haut) et de longues extensions intercellulaires (au milieu). Les extensions courtes contiennent uniquement des filaments d'actine (jaune), tandis que les extensions intercellulaires contiennent des filaments d'actines et des microtubules (bleu). Les particules virales naissantes bourgeonnent le long des extensions courtes, ce qui peut faciliter la dissémination virale. Les extensions intercellulaires émergent de la cellule infectée et entrent en contact de manière préférentielle avec les cellules non infectées (vert). Le site de contact est stable et élargi au niveau de la membrane plasmique de la cellule cible (à droite), produisant une poche isolée où les particules naissantes bourgeonnent et sont ensuite internalisées par la cellule non infectée. D'après (Brown et al. 2018).*

Les longues protrusions induites par E2 ont, quant à elle, un rôle actif dans la transmission de cellule à cellule des *Alphavirus*. En effet ces structures permettent aux cellules infectées d'établir un contact avec les cellules avoisinantes non infectées (Martinez et al. 2014a, Martinez and Kielian 2016). Ces structures prennent une forme évasée au contact des cellules voisines. Ces contacts cellulaires stables n'amènent pas à un processus de fusion membranaire similaires aux TNTs et autres structures de fusions. De plus ces structures sont formées ou stabilisées de manière préférentielle au niveau de cellules non infectées. Les mécanismes cellulaires permettant ce ciblage restent encore mystérieux. Toutefois, dans le cas de SINV, l'implication du récepteur NRAMP2 et des facteurs d'attachements héparanes sulfates semble exclus (Martinez and Kielian 2016). On ignore si les protrusions courtes induites par nsP1 peuvent avoir une fonction similaire dans le cycle infectieux.

Les protrusions induites par l'infection des *Alphavirus* jouent un rôle dans la transmission cellule à cellule des particules virales. Tout d'abord les longues protrusions induites par E2 jouent manifestement ce rôle, comme cela a été démontré *in vitro* avec. En effet la formation de cette longue protrusion participe à la propagation virale en culture, malgré la présence d'anticorps neutralisants SINV. L'utilisation d'une souche mutante de SFV incapable de fusion, a permis de confirmer également que la propagation virale n'est pas due à une transmission d'éléments viraux par fusion cytoplasmique (Martinez and Kielian 2016).

Dans le cas de CHIKV, l'implication de transmission de cellule à cellule a été soulevée par le passé. Il a été observé de manière similaire à SINV que la propagation virale en culture était possible malgré la présence d'anticorps neutralisants (Lee et al. 2011). Cependant cette observation n'avait pas été mise en rapport avec l'induction de FLPs par le virus.

Très récemment Yin *et al*, ont pu mettre en avant ce lien (Yin et al. 2023b). Les auteurs ont observé que la transmission de cellule à cellule via la formation de longues extensions est significative en culture chez CHIKV. Le facteur de restriction tetherine (ou BST-2), inhibant la libération de particules virales est également néfaste à ce mécanisme de propagation. Ces résultats confirment que la propagation virale dépend d'une entrée virale depuis le milieu extracellulaire et non d'une fusion cytoplasmique. De plus, la transmission virale est apparue comme indépendante du récepteur Mxra8, suggérant l'implication d'autres récepteurs cellulaires dans cette voie de propagation. L'endocytose des particules virales est médiée par la voie d'internalisation dépendante de la dynamine et du facteur Rab5 de manière similaire à l'entrée virale des particules libres. Enfin les auteurs ont mis en avant l'implication de cette transmission *in vivo*. Ainsi, le maintien de l'infection de CHIKV malgré le traitement par anticorps neutralisants chez les souris infectées, est corrélé avec la formation de protrusions de transferts dans les tissus articulaires.

De nombreuses questions restent en suspens sur la biogénèse de ces protrusions. Bien que l'on puisse soupçonner une implication forte des voies de régulation du cytosquelette, on ignore quels acteurs sont mobilisés dans ce processus. L'identification des facteurs impliqués dans la biogénèse des FLPs induits par nsP1

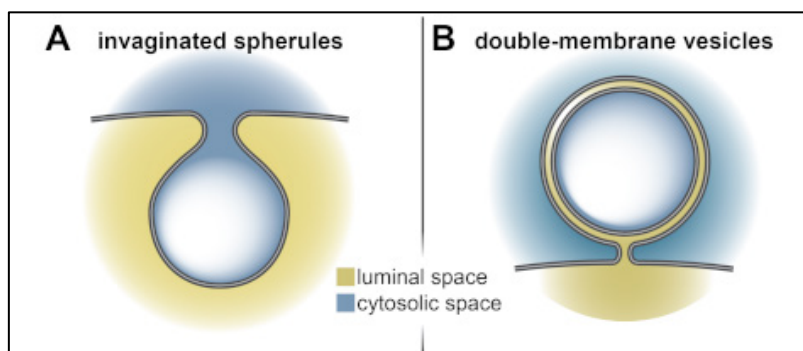
est au cœur de mes travaux de thèse et seront détaillés dans le chapitre suivant (Chapitre 2).

## 7. Organelles de Réplication

Le processus de réplication du génome viral est sans doute l'étape la plus cruciale du cycle viral. De son bon déroulement, dépendent la production efficace des protéines virales ainsi que la génération de nouveaux virions capables de propager l'infection. En réponse à la pression évolutive que constitue l'immunité cellulaire antivirale, de nombreux virus ont développé la capacité de former au sein de leurs cellules hôtes des niches répliquatives dérivées des membranes cellulaires que l'on appelle organelles de réplication. Cette capacité des virus à remodeler considérablement les membranes des cellules hôtes a tout d'abord été identifiée chez DENV en 1997 par microscopie électronique avant d'être observé par la suite chez d'autres virus (Grief et al. 1997). Ces structures ont désormais été caractérisées pour de nombreux virus à ARN(+) ainsi que pour quelques virus à ADN (Wileman et al. 2016). Au cœur de ces niches répliquatives se trouvent des complexes de réplication viraux (VRCs), des complexes ribonucléo-protéiques, permettant la multiplication du génome viral. Malgré de nombreuses descriptions microscopiques de ces organelles, l'organisation et la stœchiométrie des complexes de répliquations viraux qu'ils renferment, mais également les mécanismes responsables de leur biogénèse sont grandement lacunaires. Les caractéristiques de ces organelles ainsi que les connaissances relatives à leur biogénèse au travers des déformations seront le focus de cette partie.

### 7.1. Types d'organelles de réplication

Il est tout d'abord nécessaire de caractériser les formes que prennent les organelles de réplication virales. Ces niches répliquatives sont toutes issues de déformations membranaires de la cellule hôte. De ce fait, elles peuvent dériver des différents types de membranes cellulaires. Elles peuvent se former par exemple à partir du réticulum endoplasmique (*Arterivirus*, *Coronavirus*, *Flavivirus*, *Hepacivirus*), des membranes mitochondriales (*Nodavirus*), du golgi (*Enterovirus*) ou même de la membrane plasmique (*Alphavirus*) (Paul and Bartenschlager 2013). Le développement récent des techniques de microscopie électronique est à l'origine de la caractérisation structurelle de ces différentes organelles. Il a pu être identifié deux grands types de structure (*Fig. 43*).



**Fig. 43 Types d'organelles de réplication**

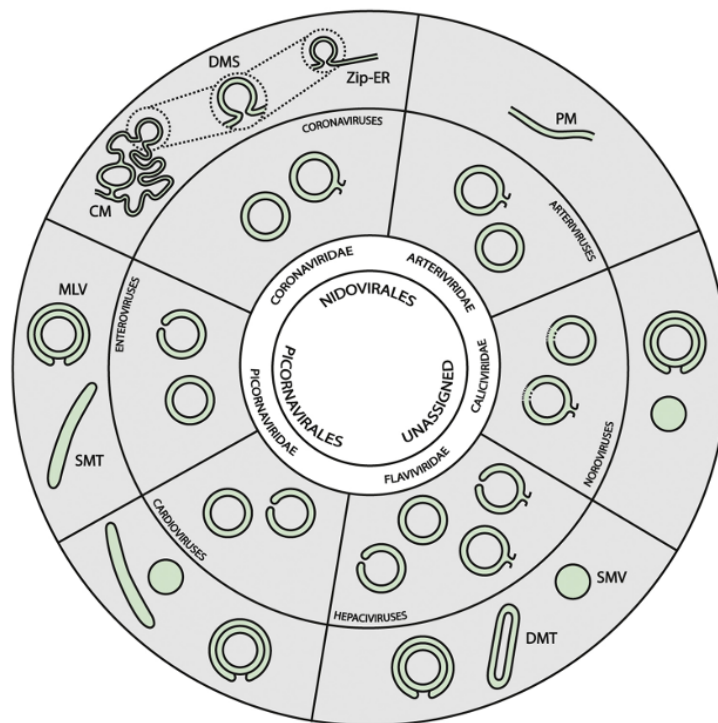
Les organelles de réplication induite par les virus à ARN peuvent être divisées en deux catégories : les sphérules invaginées (SMVs) et les réseaux vésiculaires contenant des vésicules à double membrane (DMVs). Les modifications membranaires induites par (A) les Nodavirus et (B) les Coronavirus sont des représentants de ces deux classes. Alors que les sphérules invaginées induites par les Nodavirus et d'autres virus à ARN+ présentent des ouvertures en forme de col qui relient leur intérieur au cytosol, les DMVs induites par les Coronavirus constituent des compartiments membranaires étroits. Modifié à partir de (Wolff and Bárcena 2021).

### a. Vésicules à doubles membranes

La première structure prend habituellement la forme de vésicules à double membrane (DMV). Ces organelles consistent en l'invagination positive de la membrane cellulaire vers le cytoplasme. On observe ce type d'organelle dans les cellules infectées par de nombreux virus à ARN(+) comme, les *Picornavirus*, les *Norovirus*, le virus de l'hépatite C (HCV), les *Arterivirus* et les *Coronavirus* (Limpens et al. 2011, Doerflinger et al. 2017, Romero-Brey et al. 2012, Knoops et al. 2012, 2008). Certain nombre de virus de plantes sont également dans ce cas comme le Tomato bushy stunt virus (TBSV) (Jin et al. 2018b).

Le développement de l'électron-tomographie a permis de résoudre leur structure 3D. De cette manière des traits communs et de nombreuses spécificités ont pu être identifiées dans leur structure. Ces organelles se présentent généralement comme des vésicules de 100 à 300 nm de diamètre, délimitées par deux membranes combinées. L'espace intermembranaire s'ouvre généralement vers le cytoplasme. Cependant, il a été observé que dans le cas des *Nidovirales* (*Coronaviridae* et *Arteriviridae*) les compartiments formés apparaissent comme des vésicules fermées au milieu extérieur dont la membrane externe est étroitement associée à d'autres DMVs ou au réticulum endoplasmique, aboutissant à la formation de très larges complexes réticulo-

vésiculaires (Knoops et al. 2008, 2012). A l'inverse dans les cas des *Picornavirus*, les DMVs induites semblent prendre une forme très ouverte au milieu extérieur semblable à un vase (Limpens et al. 2011). Enfin, le HCV et les *Norovirus* formeraient des DMV au phénotype intermédiaire en étant plus étroitement ouverts (Romero-Brey et al. 2012, Doerflinger et al. 2017). Un autre trait commun est le fait que ces virus forment en plus de DMVs d'autres structures membranaires qui apparaissent à différents stades du cycle infectieux (Fig. 44). Le rôle des DMV a longtemps été questionné, mais grâce aux techniques de marquages de génome viral il a pu être montré que ces organelles sont des lieux de synthèse de l'ARN viral (Gosert et al. 2002, Paul et al. 2013).



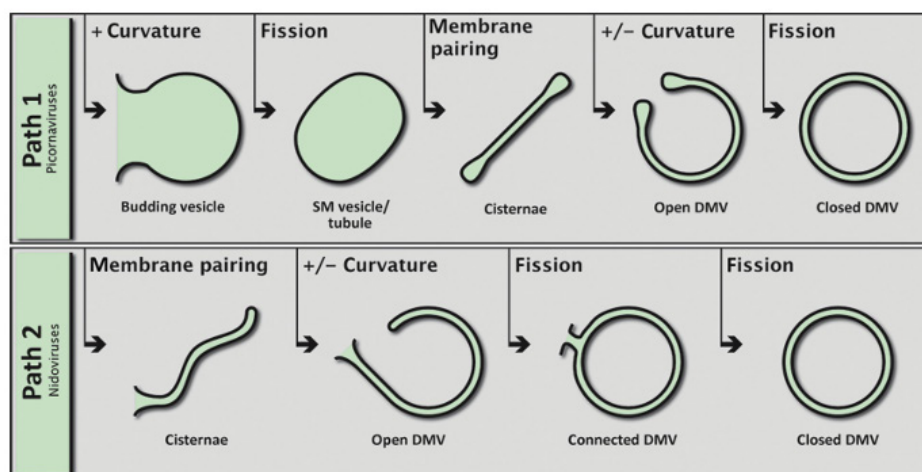
**Fig. 44 Diversité des DMVs chez les virus à ARN(+)**

L'ordre et la famille des virus sont indiqués respectivement dans l'anneau central et dans l'anneau intérieur. L'anneau suivant illustre les types d'architecture de DMVs qui ont été décrits pour les différentes familles de virus, qui comprennent des DMV ouvertes et/ou fermées, déconnectées ou continues avec d'autres structures membranaires. Dans la plupart des cas, ces connexions sont établies avec le réticulum endoplasmique (RE), mais les DMV des Nidovirus sont également connectées à d'autres structures membranaires induites par le virus. L'anneau extérieur représente les autres structures membranaires induites par le virus (vésicules à membrane unique (SMV), tubules à membrane unique (SMT), vésicules multilamellaires (MLV), membranes appariées (PM) parfois non ramifiées zippered ER (Zip-ER), membranes convolutées (CM)) qui apparaissent tardivement au cours de l'infection. De petites sphérules ouvertes à double membrane (DMS), rappelant fortement les sphérules invaginées induites par d'autres virus +ARN, sont formées en tant qu'invaginations dans Zip-ER ou CM. Les couleurs indiquent l'espace cytosolique (gris) ou luminal (vert). Modifié à partir de (Wolff et al. 2020b).



Si les différentes organelles de réplication virale peuvent dériver d'un grand panel de compartiments cellulaires, les virus induisant des DMVs semblent dans l'ensemble former ces derniers en ciblant les voies sécrétoires de la cellule hôte (Harak and Lohmann 2015). Ainsi, les organelles de réplication des *Nidovirus*, des *Norovirus* et de HCV dérivent de la membrane du réticulum endoplasmique. Ce n'est que récemment que le RE et le Golgi ont été identifiés comme à l'origine des DMVs formées par les *Entérovirus* qui se séparent de ces compartiments au cours du cycle viral (Melia et al. 2019).

Le processus de formation des DMVs est complexe. Il a principalement été identifié chez les *Picornavirus* et les *Nidovirus* (Limpens et al. 2011, Belov et al. 2012, Oudshoorn et al. 2016, van der Hoeven et al. 2016). Deux modèles distincts ont émergé, le premier où le bourgeonnement d'une vésicule précède la formation de la double membrane, et un autre où une cisterne membranaire est à l'origine de la vésicule (Fig. 45).



**Fig. 45 Voies de la biogenèse des vésicules à double membrane (VDM).**

La biogenèse des DMVs induite par différents virus +ARN peut se dérouler selon deux voies principales. (Voie 1) l'induction d'une courbure positive de la membrane, aboutissant au bourgeonnement de vésicules ou des tubules à membrane unique (SM) à partir de l'organelle donneuse. Grâce à l'appariement des membranes, ces structures forment des cisternes qui s'incurvent (en induisant une courbure positive de la membrane externe et négative de la membrane interne) pour finalement se sceller et se transformer en une DMV fermée. (Voie 2) Une voie différente de biogenèse de la DMV a lieu dans les cellules infectées par le Nidovirus. Ici, les membranes du RE s'apparieraient pour former des cisternes ; celles-ci se courberaient ensuite et subiraient des événements de fission pour aboutir à des DMV connectées ou flottantes. Modifié à partir de (Wolff et al. 2020b).

Pour pouvoir remanier la membrane de la cellule hôte à cette échelle, l'action coordonnée de protéines virales et de certains facteurs de la cellule hôte est primordiale.

Parmi les protéines virales, ce sont les protéines non structurales qui semblent essentielles à la formation de ces organelles. Dans le cas des DMV formées par les *Coronavirus*, cette formation repose sur le rôle des protéines nsP3 et nsP4 toutes deux contenant des domaines transmembranaires (Oudshoorn et al. 2017). C'est également le cas des protéines nsP2 et nsP3 dans les cas des *Arterivirus* (Snijder et al. 2001). Cependant les DMVs induites par ces protéines sont différentes de celles observées dans les cas d'infection suggérant une importance de la polyprotéine virale et de sa maturation séquentielle (Romero-Brey et al. 2015).

Un certain nombre de facteurs hôtes sont également nécessaires à la mise en place des organelles de réplication. D'une part certains acteurs protéiques comme par exemple la protéine à domaine BAR PSTPIP2 interagissant avec les protéines NS4B et NS5A dans les cas de HCV (Chao et al. 2012). Certains facteurs connus comme étant capable de remodeler les membranes ont également été identifiés comme les protéines réticulons. Ces protéines capables d'induire des courbures à la membrane du réticulum endoplasmiques interagissent avec la protéine 2C des *Entérovirus* et la protéine 1a du virus de la mosaïque du Brome (BMV) (Tang et al. 2007, Diaz and Ahlquist 2012). Cette protéine agit en partenariat avec la protéine NS4B de HCV. Dans ce cas précis, cette interaction est critique pour le remodelage membranaire et la résistance virale aux protéases cellulaire (Paul et al. 2011, Aktepe et al. 2017).

Enfin on retrouve également des acteurs lipidiques avec l'importance de PI4P et du cholestérol dans la formation des organelles de réplication d'HCV (Reiss et al. 2011, Stoeck et al. 2018).

Le caractère fonctionnel des DMVs est toutefois à questionner. Si de nombreuses structures sont fermées au reste du cytoplasme comment peuvent elle jouer un rôle dans la production d'ARNs néosynthétisés ? Certaines théories suggèrent qu'un système d'import de métabolites et d'export d'ARN serait présent dans ces structures. La détection de nucléoporines dans les DMVs induites par HCV est en faveur de cette hypothèse (Neufeldt et al. 2013). Dans ce contexte, la détection dans ces DMVs d'ARN viral par des techniques de très haute résolution restait jusqu'à il y a peu une nécessité

pour valider définitivement la fonctionnalité très débattue des organelles de réplication à double membrane.

Récemment, des avancées significatives ont été apportées par des approches de cryo-électro-microscopie très résolutive appliquées à l'étude de cellules infectées par le *Coronavirus* SARS-CoV2. Des niches répliquatives ont ainsi été observées sur les deux membranes de DMVs. De plus il a été possible d'identifier la présence d'un pore situé à la base de ces niches répliquatives. Cette structure en couronne est constituée d'un assemblage hexamérique d'une protéine transmembranaire qui pourrait être la protéine virale nsP3 (Wolff et al. 2020a).

## **b. Vésicules à simples membranes ou sphérules**

L'autre type d'organelle de réplication consiste en l'aménagement de membranes existantes pour former des niches répliquatives vers la lumière d'une organelle ou le milieu extracellulaire. Ces structures appelées vésicules à simples membranes (SMVs) ou sphérules sont retrouvées chez une certaine famille virale comme les *Nodavirus*, *Flavivirus*, *Bromovirus*, *Tombusvirus*, les *Alphavirus* ou encore le Rubella virus (Kopek et al. 2007, Gillespie et al. 2010, Schwartz et al. 2002, Fernández de Castro et al. 2017, Froshauer et al. 1988, Fontana et al. 2010).

Les sphérules ont pour la première fois été observées en 1968, dans des cellules infectées par SFV (Grimley et al. 1968). Depuis lors, des observations et reconstructions 3D chez les *Flavivirus*, notamment DENV et ZIKV, ont permis de formaliser ce type de structure (Welsch et al. 2009, Cortese et al. 2017). Ainsi ces structures apparaissent comme des bourgeonnements membranaires d'un diamètre compris entre 80 et 150 nm, connectés au milieu extérieur par un col de 8 à 11 nm. C'est par ce col, on le suppose, que se déroulent l'entrée des différents métabolites nécessaires à la synthèse des ARNs viraux de même que l'export cytoplasmique de ces derniers. Il apparaît également que ces sites de réplication sont situés à proximité des sites d'assemblages de virions ce qui suggère que les membranes cellulaires jouent un rôle dans la coordination des différentes étapes du cycle viral (Cortese et al. 2017).

La biogénèse de ces sphérules reste encore en grande partie inconnue. Néanmoins, les différentes membranes d'organelles ciblées pour la formation de sphérules ont été identifiées : Les sphérules des *Nodovirus* se forment à partir des mitochondries (Kopek

et al. 2007). Les *Flavivirus*, *Bromovirus* et *Tombusvirus* forment quant à eux leurs sphérules à partir des membranes du réticulum endoplasmique (Welsch et al. 2009, Schwartz et al. 2002, Fernández de Castro et al. 2017). Les sphérules de Rubella virus sont localisées au niveau d'endo-lysosomes (Fontana et al. 2010). Enfin les organelles de réplication des *Alphavirus* se forment à la membrane plasmique (Frolova et al. 2010).

Un intérêt particulier a été porté à l'étude de la structure du col des sphérules qui les connectent au reste du cytosol. L'étude du virus Flock house (FHV) a par exemple permis de montrer que dans le cas de ce virus, le col est composé d'un assemblage dodécamérique de la réplicase virale A. Cet assemblage serait un élément clé du maintien de la connexion de la sphérule avec le cytoplasme (Ertel et al. 2017).

La mise en place des sphérules nécessite, elle aussi, la mobilisation de protéines virales ainsi que de cofacteurs cellulaires.

Le profil lipidique des membranes cellulaires peut être un prérequis crucial à la formation d'organelles de réplication et la formation de SMV de fait pas exception. Chez les *Flavivirus*, il a été observé que le métabolisme lipidique est modulé par l'infection virale. Ainsi la relocalisation vers le RE et la surexpression de l'enzyme cellulaire HMGCR (3-hydroxy-méthylglutaryl-CoA réductase), permet au virus d'enrichir en cholestérol les membranes cellulaires servant de plateforme à la réplication virale (Mackenzie et al. 2007). En parallèle la protéine FASN (Fatty acid synthase) essentielle à la production du palmitate, précurseur aux phospholipides membranaires, est relocalisée aux sites de réplication virale et où son activité est augmentée via la protéine virale NS3 (dans le cas de DENV) (Heaton et al. 2010). De plus la FASN est indispensable à la réplication des *Flavivirus* (Heaton et al. 2010, Martín-Acebes et al. 2011). Cette dépendance à FASN pour la réplication est également présentes chez les *Alphavirus* (Bakhache et al. 2019, Zhang et al. 2019).

Certains facteurs de remodelage membranaires, ont été également identifiés comme participant à la formation d'organelles de réplifications. Les protéines de la famille réticulons, par exemple, ont été identifiées comme partenaires de la formation des sphérules des *Flavivirus* WNV, DENV et ZIKV. Ces protéines sont capables par l'insertion de deux domaines hydrophobes, d'induire des courbures membranaires. C'est l'interaction d'une de ces protéines, RTN3.1A, avec la protéine virale NS4A qui

permet le remodelage des membranes du RE nécessaires à la formations des sphérules (Aktepe et al. 2017). Chez les Alphavirus, la protéine BIN1 semble jouer un rôle similaire via leur interaction avec la protéine virale nsP3 (Neuvonen et al. 2011) (voir Chapitre 1.7.2.d).

Enfin, il a été identifié chez plusieurs de ces virus que le remaniement du cytosquelette de l'hôte était nécessaire à la réplication virale. (Ng and Hong 1989, Růžek et al. 2009, Teo and Chu 2014). Dans le cas de DENV par exemple, ce remaniement est médié par l'interaction des protéines virales NS5A et NS4A avec la vimentine, protéine constitutive des filaments intermédiaires (Le Breton et al. 2011, Teo and Chu 2014). Cette interaction semble essentielle à l'adressage de la vimentine vers les organelles de réplication et à son association à la protéine NS1. (Kanlaya et al. 2010).

## **7.2. Chez CHIKV et les *Alphavirus***

### **a. Biogénèse et morphologie**

Comme mentionné précédemment, les sphérules ont été observées pour la première fois chez les *Alphavirus* (Grimley et al. 1968). Observées initialement par des approches de microscopie électronique conventionnelles comme des sacs membranaires d'un diamètre de 50 à 60 nm dépourvus de structure interne, la connaissance de ces compartiments a significativement bénéficié du développement de la cryo-microscopie électronique et de la tomodensitométrie associée. Au cours des trois dernières années, plusieurs images de ces compartiments à très haute résolution ont permis de préciser que ces structures sont dépourvues de manteau interne, contrairement par exemple aux sphérules des *Nodavirus* tapissées par la protéine 1A (Kopek et al. 2010). Elles renferment un filament densément compacté supposé être l'ARN génomique viral (Laurent et al. 2022, Zhang et al. 2021, Girard et al. 2023a). Le col de ces sphérules assurant leur connexion au cytoplasme présente un complexe protéique discuté dans la section suivante. Historiquement, il était admis que la formation de ces sphérules dérivait des membranes d'endo-lysosomes. Ces sphérules, formées par les virus SINV et SFV ont en effet été observées dans des structures vacuolaires. Ces organelles ont par la suite été caractérisées comme des vacuoles cytopathiques de type 1 (CPV-I), des endosomes dont le diamètre varie entre 0.6 et 2  $\mu\text{m}$  et dont la membrane est enrichie en sphérules. Ces sphérules sont

orientées vers la lumière de la vacuole et toutes connectées au cytosol par un col fin de 8 nm de diamètre (Froshauer et al. 1988). Cependant l'étude plus approfondie de la formation de ces vacuoles sur des temps courts (2 à 4 heures) a démontré que les organelles de réplication sont tout d'abord formées à la membrane plasmique. Pour certains *Alphavirus*, comme SFV, SINV, RRV ou CHIKV, ces structures sont ensuite endocytées avant de fusionner avec les lysosomes. Cette internalisation a été reliée à l'activation de la voie de signalisation PI3K-Akt-mTOR. Les inhibiteurs de cet axe conduisent à une accumulation de sphérules à la membrane plasmiques et non dans des CPVs (Frolova et al. 2010), démontrant formellement le rôle de la membrane plasmique dans l'assemblage des compartiments de réplication des *Alphavirus*.

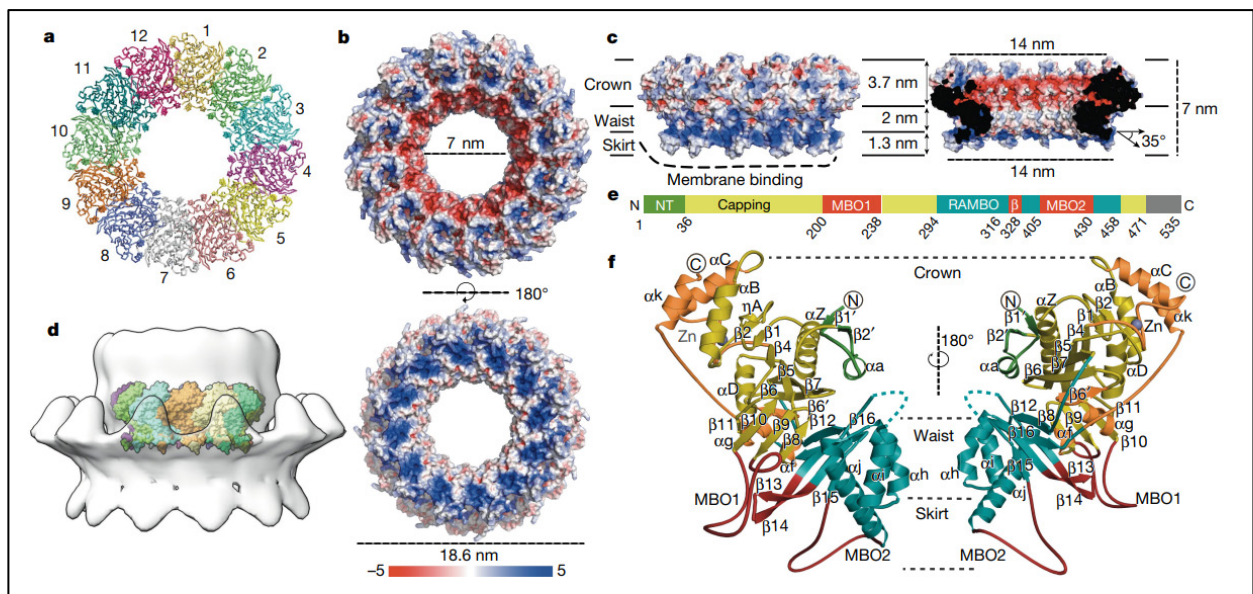
Néanmoins il apparait que la mobilisation de cette voie est modulaire suivant l'espèce virale étudiée. D'une part, certains virus mobilisent de manière importante cette voie comme RRV ou SFV. Cette suractivation est médiée par la présence de motifs YXXM, dans le domaine HVD de nsP3 qui permet l'hyper-phosphorylation d'Akt (Mazzon et al. 2018). Cette suractivation nécessite toutefois l'adressage à la membrane plasmique de nsP3 (Thaa et al. 2015). Ainsi ces deux espèces virales internalisent de manière importante les sphérules sous formes de CPV-II. L'utilisation d'inhibiteurs de cette voie tels que la wortmannine est délétère à la réplication virale dans les étapes tardives mais ne l'inhibe pas complètement (Mazzon et al. 2018). En comparaison CHIKV, active de manière beaucoup plus modérée la voie PI3K-Akt-mTOR. Ceci explique en partie pourquoi ce virus forme comparativement peu de CPV-II (Thaa et al. 2015). CHIKV ne possède pas de domaine YXXM et mobilise cette voie par un moyen encore inconnu. Bien que moins mobilisée la voie PI3K-Akt-mTOR reste importante pour le cycle viral, l'inhibition de cette voie n'étant pas néfaste à la réplication (Sharma et al. 2018a). On ignore à l'heure actuelle quels sont les effecteurs mobilisés par la voie de régulation pour induire l'internalisation des sphérules. De plus, le rôle de ces vésicules dans la réplication virale est encore mal compris.

La contribution respective des protéines non-structurales et de l'ARN génomique viral ainsi que d'éventuels cofacteurs dans la formation initiale de sphérules a fait l'objet d'une intense attention. Il apparait que la formation de ces compartiments peut être dirigée par l'expression isolée du précurseur polyprotéique P1234, y compris en absence d'ARN viral (Hellstrom et al. 2017). Toutefois, le génome, et sa taille jouent un rôle essentiel dans le développement de ces compartiments. En effet, l'expression

du précurseur non-structurel en association avec des pseudogénomés de longueur variable conduit à la formation de sphérules dont la taille est directement corrélée à celle de l'ARN génomique (Kallio et al. 2013).

## b. Structure du complexe de réplication

Bien que les techniques de cryo-électro-tomographies aient été appliquées avec succès dans la modélisation 3D des complexes de réplifications de plusieurs virus à



**Fig. 46 Structure cryo-électro-microscopique du complexe sphère-pore de CHIKV.**

(a) Représentation en ruban du complexe nsP1 en vue cytosolique (en haut). La symétrie à 12 plis est indiquée par la numérotation ; chaque protomère est représenté dans une couleur différente. (b) Représentation du complexe nsP1, face cytoplasmique (en haut), face membranaire (en bas). Les propriétés électrostatiques sont représentées par le code couleur de la barre inférieure. Les diamètres de l'anneau et de l'ouverture du pore sont indiqués. (c) Même représentation qu'en b, de la vue latérale du complexe (à gauche) et d'une section du complexe (à droite). Les trois régions (couronne, taille et jupe) sont délimitées par des lignes noires. Les dimensions de la hauteur, de l'ouverture supérieure du cône, de la hauteur du pore et du diamètre de la jupe inférieure sont indiquées. (d) Vue latérale de reconstructions tomographiques de cols de sphérules de FHV4 dans lesquelles le complexe nsP1 de CHIKV est superposé. nsP1 est représenté coloré par un protomère à l'intérieur du volume de FHV (représenté par une surface grise transparente). Modifié à partir de (Jones et al. 2020a).

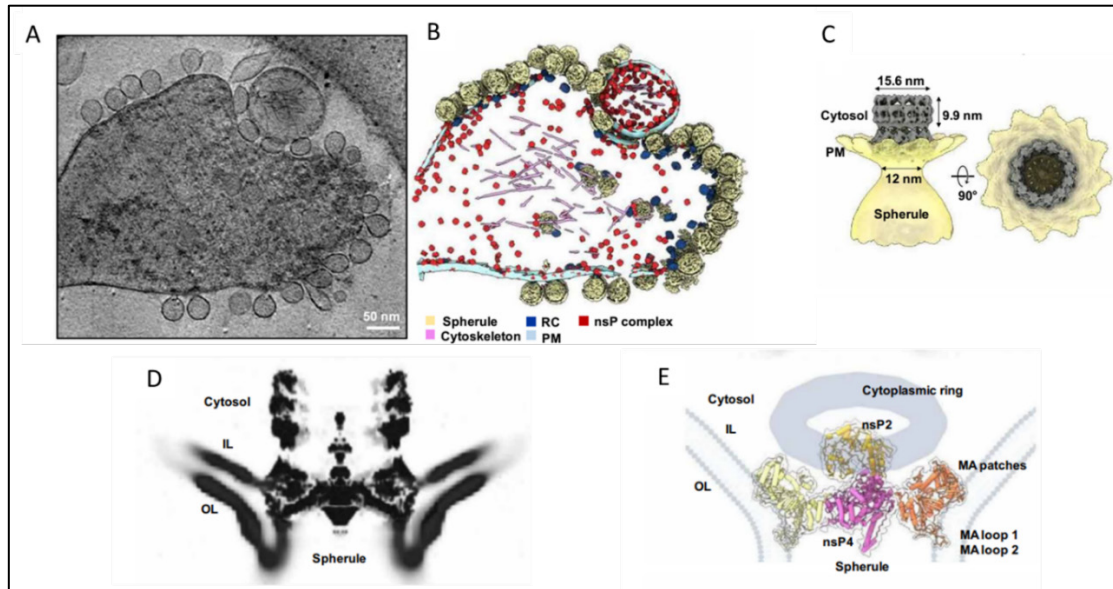
ARN (comme SARS-CoV ou HCV), la structure du complexe répliatif au sein des sphérules des *Alphavirus* en général et de CHIKV en particulier est restée un mystère de nombreuses années (Knoops et al. 2008, Romero-Brey et al. 2012). Récemment, une partie de la réponse a pu être apportée par les travaux de plusieurs équipes de recherche.

En 2020, Jones *et al* ont démontré que la protéine nsP1 de CHIKV produite sous forme recombinante s'oligomérisait en présence de membranes artificielles. Elles forment alors un anneau dodécamérique de 18,6 nm de diamètre et 7 nm de hauteur contenant un pore central de 7 nm (Jones et al. 2020a). On peut noter la similarité structurale de ce modèle avec l'oligomère de la protéine A observé au niveau du col des sphérules formées par le FHV (Ertel et al. 2017). Ainsi, il a été suggéré que le dodécamère de nsP1 pourrait former un pore à la jonction des sphérules du CHIKV avec les membranes lipidiques. Dans le modèle décrit par les chercheurs, cet anneau est constitué de trois sections. La section inférieure nommée la couronne est large (3,7 nm de hauteur pour 14 nm de diamètre), et tournée vers le cytoplasme. Elle correspond au domaine de coiffage de la protéine (résidus 1-294 et 459-472). La section intermédiaire où l'anneau est le plus fin (2 nm de hauteur pour 7 nm de diamètre) est nommée la jupe. Enfin, la section supérieure, tournée vers l'intérieur de la sphérule est nommée la jupe (1,3 nm de hauteur pour 14 nm de diamètre). C'est cette section qui permet l'ancrage membranaire de l'anneau. Les chercheurs ont identifié que les péplomères responsables cet ancrage, sont issus de l'association de trois peptides. Un peptide en boucle MBO1 (200-238) situé dans la région de coiffage s'associe à deux autres peptides de même structure MBO2 et MBO- $\beta$ . Ces deux derniers domaines sont situés au sein d'un domaine nommé RAMBO (Ring-aperture membrane-binding and oligomerization) compris dans les sections taille et jupe du complexe. L'association de ces trois peptides permet la formation d'un péplomère permettant l'ancrage amphipatique de l'anneau. Cependant, dans le modèle décrit l'oligomérisation est nécessaire à la formation de ces structures. Les chercheurs ont pu également mettre en avant la présence des trois cystéines de palmitoylation, situé au sein du peptide MBO2, se positionne à l'extrémité des péplomères. Dans le modèle utilisé par les chercheurs, les protéines nsP1 issues de cellules d'insectes présentaient un niveau faible de palmitoylation. Cette relative absence, n'était néanmoins pas nécessaire à la formation de pores cellulaires, ni à l'association membranaire de nsP1.

Les observations de la structure en anneaux de nsP1 de Jones *et al.* ont été confirmées quelques mois plus tard par Zhang *et al* (Zhang et al. 2021). Cette étude menée de manière indépendante et concomitante a également démontré la structuration en dodécamère de nsP1 mais avec quelques différences. Par exemple la structure identifiée par Zhang *et al.* est légèrement plus large ce qui implique la



formation d'un pore d'un diamètre interne plus grand de 0.5 nm. Cependant les auteurs ont proposé que les deux modèles sont inter-compatibles, représentant deux états transitoires de cette structure.



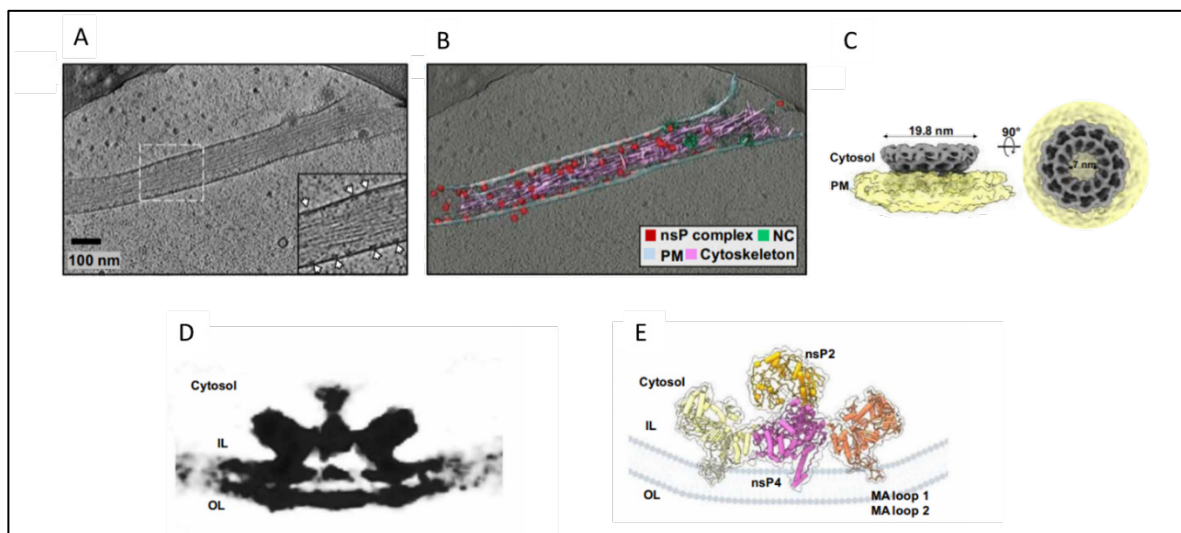
**Fig. 47 Structure de complexe de réplication mature in cellulo**

(A) Coupe tomographique de cellule infectées montrant les sphérules de réplication de CHIKV à la membrane plasmique. Barre d'échelle : 50 nm. (B) Segmentation 3D correspondante à l'image en (A). (C) Reconstruction en 3D des sphérules CHIKV par symétrie C12 et moyennage. (D) Vue en coupe centrale du volume tomographique de la sphérule virale active. On peut observer les sites de contacts de nsP1 avec la membrane plasmique : les boucles d'association membranaire (boucles MA 1 et 2) et les patches MA nouvellement identifiés de l'anneau supérieur nsP1, comme indiqué en (E). Modifié à partir de (Tan et al. 2022).

Ces travaux représentent des avancées considérables dans la compréhension de la structure et la stœchiométrie des sphérules. De plus, ces expériences ayant été réalisés *in vitro*, il n'était pas possible de s'assurer de la représentativité de ces modèles dans le cas d'une infection virale. En 2023 Tan et al, ont permis la confrontations du modèle *in vitro*, à celui d'un complexe de réplication incluant les autres protéines non structurales dans un contexte cellulaire (Tan et al. 2022). Leur étude a permis d'éclairer d'un nouveau jour la stœchiométrie du complexe de réplication. A partir de protéines fusions *in vitro*, les auteurs ont pu montrer qu'au regard de l'élongation d'ARN, l'association de nsP4 avec nsP1 et nsP2 permet une synthèse d'ARN très efficace. Dans ce cadre nsP2 et nsP4 permettent de stabiliser et

d'accroître l'activité de nsP4. nsP3 ne semble pas impliqué dans cette unité protéique. Lors de l'analyse par cryo-électro-microscopie de ce complexe les auteurs ont pu modéliser un complexe de réplication ou la protéine nsP1, en grand nombre comparativement aux autres nsPs, structure le col de la sphérule. De plus la protéine nsP4 se situe dans la partie intérieure de ce complexe pour permettre la synthèse d'ARN et la protéine nsP2 se situe à la sortie du pore.

Une fois transposés en modèle cellulaire infectieux, l'observation des sphérules a révélé la présence d'une deuxième structure circulaire, en aval de l'anneau dodécamérique du côté du cytoplasme. Les auteurs supposent au regard de sa structure que cet anneau secondaire pourrait correspondre à l'association de nsP3 avec des facteurs cellulaires. De plus, l'anneau dodécamérique nsP1, posséderait un deuxième site d'interaction membranaire permettant de renforcer la formation du col de la sphérule (Fig. 47). En parallèle, il a été observé la présence à la membrane plasmique de structures proches du complexe de réplication non associées à des sphérules (Fig. 48). Très proches du complexe de réplication, ces complexes non répliquatifs ne possédaient cependant pas d'anneau secondaire. Ces structures sont supposées correspondre à des formes immatures de complexes de répliquations. Cette étude permet d'envisager un modèle intégratif des sphérules.



**Fig. 48 Structure de complexes nsPs membranaires non répliatifs in cellulo**

(A) Coupe tomographique de cellule infectées montrant une structure de protrusion membranaire de type filopode à partir de la membrane plasmique. Les flèches blanches indiquent les complexes nsPs associés à la membrane. Barre d'échelle : 100 nm. (B) Segmentation 3D correspondante à l'image en (A). (C) Volume 3D du complexe nsPs de CHIKV par symétrie C12 et moyennage. (D) Vue en coupe centrale du volume tomographique d'un complexe nsP membranaire non répliatifs, qui est simplement arrimé au feuillet interne de la membrane plasmique, via les boucles MA 1 et 2 de l'anneau nsP1 comme indiqué en (E). Modifié à partir de (Tan et al. 2022).

### c. Modèle fonctionnel

A partir de ces observations, le modèle actuel de formation de sphérules est le suivant : la polyprotéine partiellement maturée s'associe à l'ARN génomique entrant. Ce complexe immature est adressé à la membrane à laquelle il s'ancre via les l'interaction de nsP1 avec la bicouche lipidique. L'association de l'ARN viral ne semble pas nécessaire à la biogénèse des sphérules mais elle est bien évidemment crucial à leur fonctionnalité (Hellstrom et al. 2017). L'association d'un dodécamère de nsP1 a la surface permet la mise en place du col des organelles de répliations, via deux sites d'interactions membranaires (Jones et al. 2020a, Zhang et al. 2021, Tan et al. 2022). L'ancrage de cet oligomère est médié par deux motifs d'interactions, et permet l'activation de la fonction enzymatique de méthyl-guanylyl-transférase de nsP1 (Tan et al. 2022, Jones et al. 2023). L'association de ce dodécamère avec avec nsP2 et nsP4, permet la mise en place d'une unité de synthèse d'ARN très efficace (Tan et al. 2022). Le col de la sphérule par son diamètre étroit permet le passage de protéines globulaires (70-90 kDa) comme par exemple des facteurs nécessaires à la répliation

(Jones et al. 2020a). La maturation séquentielle de P1234 initie la synthèse du brin complémentaire d'ARN négatif lors de la libération de la polymérase nsP4, puis la formation d'un intermédiaire de réplication ARN double brin par le complexe mature (Vasiljeva et al. 2003). La synthèse de brins d'ARNs est responsable de la formation de l'évagination des sphérules, la taille du génome étant corrélé avec le diamètre des sphérules (Kallio et al. 2013). L'export des ARNs néosynthétisés se fait par le passage du col de sphérules où la protéine nsP2, par sa fonction hélicase, permet la séparation avec le brin matrice, et les protéines nsP1 coiffent les ARNs sortants (Tan et al. 2022, Jones et al. 2023). La reconnaissance des extrémités 5' des ARNs sortant par nsP1 serait médiée par une affinité particulière pour le AUG présent à cette position (Zhang et al. 2022).

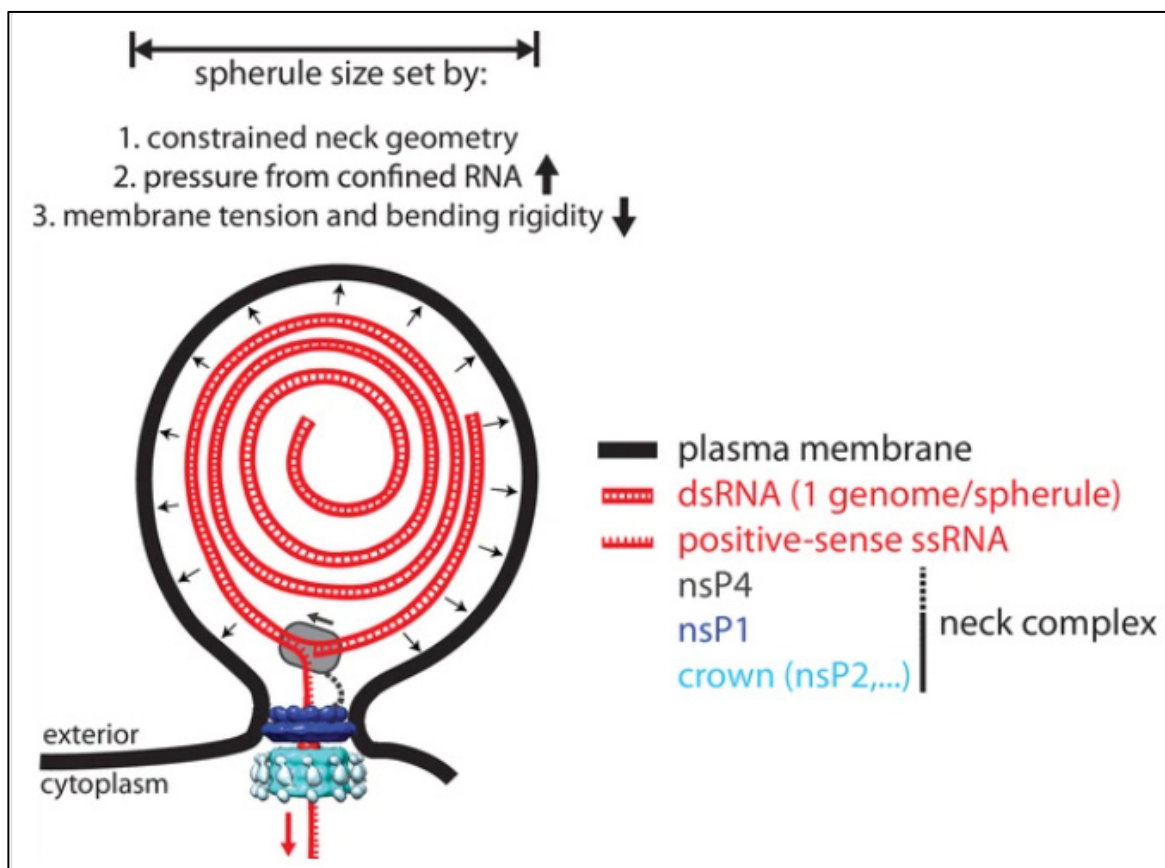
Il était supposé que l'export des ARNs viraux est un processus très efficace puisque les images de sphérules en début d'infection (6-8 hpi) présentent des sphérules de taille homogène (50-70 nm) ne possédant qu'une copie d'ARN en leur sein (Laurent et al. 2022). Cependant, les observations de notre laboratoire à des temps tardifs (17 hpi) ont montrées la présence de différentes sphérules de diamètre supérieur (140 nm) laissant supposer la présence de plusieurs copies d'ARN viraux (Girard et al. 2023a). Ceci indiquerait que le processus d'export des ARNs viraux semble être décroissant au cours de l'infection virale.

De plus, la présence de 12 monomères de nsP1 au col de la sphérule, laisse supposer une réaction de coiffage très efficace des ARNs sortants vers le cytoplasme. Toutefois, il a été observé chez les *Alphavirus* que seule une minorité d'ARNs viraux incorporés dans les virions sont coiffés (Sokoloski et al. 2015). Ainsi il a par exemple été montré que dans le cas de SINV, un coiffage trop efficace était préjudiciable à l'infection virale (LaPointe et al. 2018b). Ceci pose la question de l'utilité de ces ARNs non coiffés pour le cycle viral de même que du contrôle de ce coiffage par nsP1. En étudiant de manière structurale l'action enzymatique de coiffage de l'anneau nsP1, la même équipe a pu très récemment mettre en lumière qu'*in vitro*, cette réaction est réversible. Ainsi, cet anneau de nsP1 permettrait de libérer des ARNs partiellement coiffés, et qu'une réaction de décoiffage serait possible et coïnciderait avec l'ouverture du pore (Jones et al. 2023).

Ce modèle, a en quelques années pu être élucidé en partie, grâce à plusieurs contributions majeures relatives à la structure et la stœchiométrie du complexe de réplication. Cependant, certaines questions restent en suspens : Quelle est la place des intermédiaires de la polyprotéine virale dans la formation des sphérules ? De quoi sont constituées les structures sous-jacentes à l'anneau de nsP1 ? Quel est le déroulé de la formation des différentes structures ? Des études complémentaires sont nécessaires pour pleinement comprendre ce phénomène. Néanmoins, ces résultats montrent le caractère central de nsP1 dans la structuration des sphérules chez les *Alphavirus* et CHIKV.

#### d. Intéreactants cellulaires du complexe de réplication viral

Bien que les constituants essentiels du complexe de réplication viral correspondant aux quatre protéines non structurales et l'ARN viral soient identifiés, les contributions potentielles de cofacteurs cellulaires ne sont pas encore complètement élucidées. Au



**Fig. 49** *Modèle de structuration de l'évagination des sphérules*

*La forme de la membrane est déterminée par la géométrie du col confiné, la pression exercée par le génome confiné, la tension et la rigidité de la membrane. Modifié à partir de (Laurent et al. 2022).*

fur et à mesure des années, un corpus de données a pu être constitué sur les différents interactants cellulaires, par des approches de protéomique ou le criblage génomique. La protéine nsP3 est apparue peu à peu comme des sites de recrutement privilégiés de facteurs cellulaires au niveau des organes. Cependant, certains de ces interactants ont été identifiés pour nsP2 et nsP4. A l'heure actuelle, les interactants de nsP1 aux sites de réplication virale sont encore largement inconnus

### **Protéines de liaison à l'ARN**

**Ribonucleoproteines** : Les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNP) sont une famille de protéines associées à l'ARN, qui possède diverses fonctions dans le métabolisme des acides nucléiques. Elles jouent un rôle dans la maturation de l'ARN néo synthétisé, mais aussi dans la stabilisation de l'ARNm et dans son transport vers la traduction cellulaire. C'est cette capacité de prise en charge des ARNs qui a amené à étudier le rôle de ces protéines dans la réplication virale (Geuens et al. 2016). Ces protéines ont tout d'abord été identifiées comme étant des interactants de nsP2 et de nsP3 (Bourai et al. 2012, Götte et al. 2018). Leur rôle dans la réplication des Alphavirus a été suggéré ensuite par le fait que certaines hnRNPs sont enrichies dans des cellules infectées par des alphavirus (Varjak et al. 2013). Au cours de l'infection, les protéines hnRNP C, hnRNP K, hnRNP M, PCBP1 sont relocalisées du noyau vers les complexes de réplication. Bien que ces trois protéines aient été montrées comme contribuant à la réplication virale des Alphavirus, leur contribution respective s'est avérée hétérogène suivant les espèces virales étudiées. De plus, il semble que le niveau d'expression de certaines de ces protéines puissent avoir un effet inhibiteur ou catalyseur sur la réplication. Une étude ultérieure de ces différents acteurs a montré que ces hnRNPs étaient directement liés au génome viral dans le cadre de l'infection SINV. Ainsi, les hnRNPs K et M sont capables de se lier en particulier aux régions codantes du génome viral (LaPointe et al. 2018a). Cette étude a également confirmé le rôle de la liaison de ces protéines avec l'ARN viral dans la réplication.

**DHX9** : Une autre protéine de liaison à l'ARN qui a fait l'objet d'une caractérisation mécanistique plus poussée pour son rôle dans la réplication des Alphavirus est DHX9. La DExH-box RNA hélicase 9 (DHX9), comme son nom l'indique, est une hélicase d'ARN, mais aussi d'ADN, dont la fonction est de dissocier les doubles brins d'ADN et d'ARN. Cette enzyme trafique entre le noyau et le cytoplasme où elle régule de nombreux processus tels que la transcription, le transport et la traduction des ARNm

(Zhang and Grosse 2004). DHX9 a été identifié comme un cofacteur de nsP3 et du complexe de réplication chez CHIKV (Matkovic et al. 2019). Ainsi DHX9 serait recruté par la protéine nsP3, aux stades précoces de l'infection où cette association favoriserait la traduction des ARNs viraux au détriment de la réplication. On peut supposer que DHX9 en déroulant les structures secondaires de l'ARN génomique viral favoriserait la progression des ribosomes. Cette fonction serait très similaire à la fonction physiologique de DHX9 dans la traduction de certains ARNm cellulaires. Enfin, aux stades tardifs de l'infection, la dégradation de DHX9 induirait un basculement de la traduction à la réplication.

**G3BPs** : Les protéines G3BPs, régulatrices de métabolisme des ARNs cellulaires sont également présentes au niveau des organelles de réplication des *Alphavirus* (Kedersha et al. 2016). Ces protéines possèdent un domaine N-terminal de type NTF2, impliqué dans la dimérisation et l'interaction avec d'autres protéines, de longues séquences désordonnées, des motifs de reconnaissance de l'ARN (RRM) ainsi que des motifs RGG riches en arginine-glycine au niveau de l'extrémité C terminale (Kedersha et al. 2016). Lors du recrutement des protéines G3BPs par nsP3 lors de l'infection (Chapitre 1.5.2.c), il a été observé qu'une partie de ses facteurs sont relocalisés au niveaux des sites de réplication virale et que le domaine NTF2 en est responsable (Panas et al. 2012, Götte et al. 2019). On ignore encore le rôle exact des protéines G3BPs au niveau des sites de réplication outre leur séquestration. Dans le cas de SFV, dont l'absence de G3BP n'abolit pas totalement la réplication, il a été montré qu'une agrégation de CPV est induite par la présence de ces protéines via le domaine RGG (Götte et al. 2019). Des agrégats cytoplasmiques G3BP-nsP3 sont présents également en nombre à proximité de ces CPVs. Cette présence de G3BPs est également corrélée à une augmentation de l'initiation de la traduction des ARN viraux via la présence des domaines NTF2 et RGG. Ce constat est renforcé par le fait que les G3BPs peuvent interagir *in vitro* avec la sous unité ribosomale 40S (Götte et al. 2019). Ces observations n'ont cependant pas pu être entièrement transposées chez CHIKV, dont la réplication est totalement dépendante de la présence des domaines NTF2 et RGG. Dans la même étude, il est apparu que l'interaction G3BPs, nsP3 et sous unité 40S est conservée chez CHIKV.

## Remodelage membranaire

**Amphiphysines** : L'amphiphysine appartient à la famille des protéines BAR qui sont capables de reconnaître et d'induire des courbures membranaires. Une attention particulière a été portée à cette famille de protéines car on peut supposer qu'elles induisent éventuellement la courbure membranaire nécessaire à la formation des organelles de réplication. La principale preuve d'une implication des protéines BAR dans la réplication des Alphavirus provient d'une étude montrant que la protéine nsP3 de SFV était capable de recruter deux de ces protéines (Neuvonen et al. 2011). En effet il a été montré que les protéines BAR, amphiphysine-1 et amphiphysine-2 (Également nommée BIN1) sont recrutées via le domaine SH3 de ces protéines au niveau des sites de réplication. Cette interaction est essentielle au cycle viral, car lorsque ciblée, les virus produits ne sont pas répliatifs et montrent une virulence atténuée *in vivo*. Cependant, cette dépendance semble limitée aux Alphavirus de l'ancien monde, ces deux protéines n'étant pas retrouvée dans des analyse protéomiques des Alphavirus du nouveau monde (Frolov et al. 2017).

## Interaction avec le cytosquelette

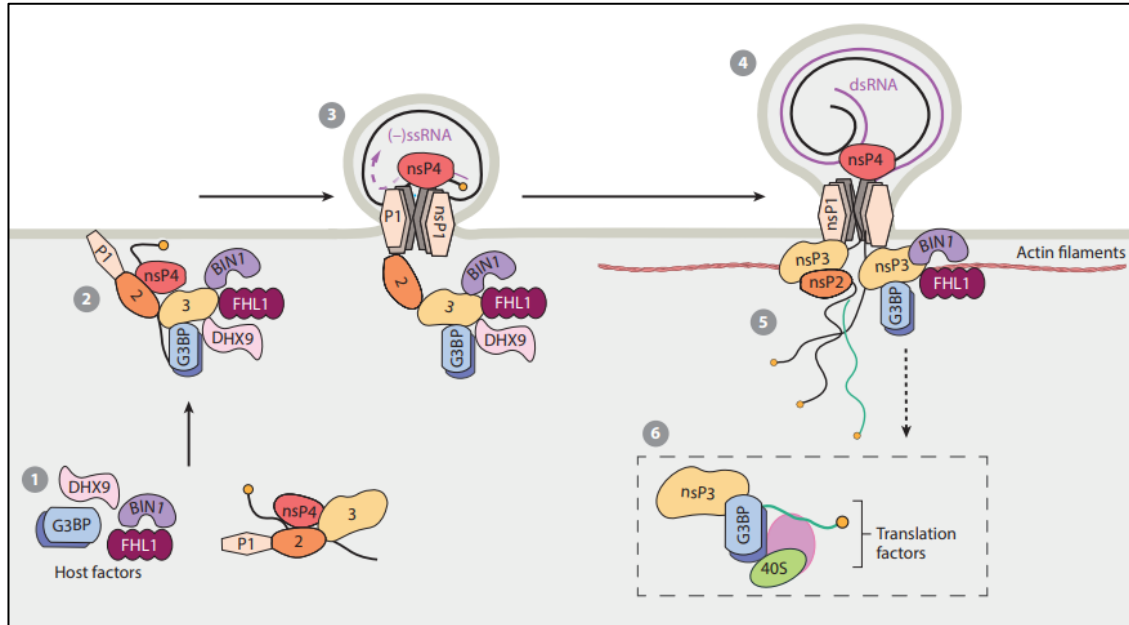
**CD2AP et SH3KBP1** : CD2AP est une protéine d'échafaudage qui régule le cytosquelette d'actine. Il a été décrit qu'elle remplit cette fonction en se liant aux filaments d'actine via trois domaines SH3 et en les coiffant via le recrutement de protéines de coiffe de l'actine (CAPZA1, CAPZA2, CAPZB) (Gaidos et al. 2007). Cette protéine est également capable de recruter la cortactine et ainsi de contribuer à la formation de lamellipodes (Zhao et al. 2013). Une étude de protéomique faites à partir du domaine HVD de nsP3 de CHIKV à permis d'identifier une interaction avec CD2AP et les protéines de coiffe d'actine CAPZA1, CAPZA2, CAPZB (Mutso et al. 2018). C'est la présence d'une séquence nommée M2 (423-PMASVR-428) qui permet l'interaction entre nsP3 de CHIKV et ces protéines. Cette interaction permet également un recrutement de ces protéines au niveau des sites de réplication chez CHIKV et SFV. SH3KBP1 (SH3 Domain Containing Kinase Binding Protein 1), est également présente aux sites de réplication (Mutso et al. 2018). Cette protéine, homologue de CD2AP, possède aussi trois domaines SH3 de liaison à l'actine. Elle aussi, interagit avec nsP3 via la séquence M2 du HVD et est localisée aux sites de répliations membranaires. Il a été montré que la mutation du domaine M2 du HVD abolit l'interaction de nsP3 avec CD2AP, SH3KBP1 et l'amphiphysine-2, ce qui laisse penser à un rôle conjoint de ces



deux protéines. De plus, cette mutation s'est avéré délétère à l'infection et la réplication de CHIKV (Agback et al. 2019).

### **Facteurs cytoplasmiques**

**FHL1** : La protéine FHL1 (Four-and-a-half LIM domain protein) ou SLIM1 est une protéine fortement exprimée dans les tissus cardiaques et musculaires, et joue un rôle dans de nombreux processus cellulaires. FHL1 a été identifié pour la première fois par spectrométrie de masse en tant que partenaire de nsP3 dans son domaine HVD (Meshram et al. 2018). C'est le criblage par CRISPR-Cas9 de cellules HAP1 pour l'infection de CHIKV et ONNV qui a permis d'en souligner l'importance pour le cycle viral (Meertens et al. 2019). Cependant, cet effet semble limité à ces deux virus. L'invalidation de FHL1 n'a pas montré d'effet sur l'infection par MAYV, SINV, SFV, WEEV, VEEV et RRV. Il est apparu que dans le cas de CHIKV, le knock-out de FHL1 inhibe la synthèse de l'ARN viral et la formation de sphérule. On peut poser l'hypothèse que la forte expression de cette protéine dans les cellules musculaire, n'est pas sans lien avec le tropisme viral de CHIKV (Meertens et al. 2019). Les études de cartographie des interactions de FHL1 avec le domaine HVD de nsP3 indiquent que ce domaine recouvre le site de liaison de (Lukash et al. 2020). Ainsi dans cette étude cibler FHL1 diminue l'infection sans totalement l'inhiber ce qui laisse supposer un rôle redondant avec CD2AP. Dès lors, le rôle central de FHL1 dans l'infection de CHIKV est à mitiger. Bien que certaines interactions avec des cofacteurs cellulaires aient été identifiés, l'implication de ces interagants dans la formation de sphérules est encore inconnue. De plus, malgré le caractère central du dodécamère de nsP1, à l'heure actuelle aucun interactome étendu de cette protéine n'a été effectué. Par conséquent, on ne peut à l'heure actuelle que proposer un modèle incomplet de formation des sphérules (Fig. 50).



**Fig. 50** Modèle d'assemblage du complexe de réplication du CHIKV

(1) G3BP, FHL1, DHX9 et BIN1/Amphiphysin2 s'associent à la polyprotéine virale (2) qui s'ancre à la membrane plasmique grâce à la liaison à la membrane de nsP1. (3) Ce complexe commence à répliquer le génome ARN, avec l'aide de DHX9, dont on pense qu'il régule la transition de la traduction à la réplication de l'ARN lors des phases précoces. Les facteurs hôtes sont recrutés dans le complexe de réplication CHIKV par interaction avec le domaine hypervariable nsP3 qui sert de plaque tournante pour les interactions entre l'hôte et le pathogène. (4) BIN1/Amphiphysin2, CD2AP, SH3KBP1 et FHL1 impliqués dans la flexion de la membrane et/ou l'organisation du cytosquelette d'actine peuvent contribuer à la biogenèse de sphérules en forme de bulbe séparant l'intermédiaire de réplication de l'ARNdb de la reconnaissance immunitaire innée de l'hôte. (5) Les ARN génomiques et subgénomiques synthétisés au sein de l'organelle de réplication sont ensuite exportés vers le cytoplasme et coiffés par l'anneau dodécamérique nsP1 qui relie la sphérule au cytoplasme. (6) Les molécules G3BP recrutées sur la face cytoplasmique de ces organelles sont proposées pour recruter la machinerie de traduction cellulaire à proximité des complexes de réplication virale afin d'assurer une synthèse optimale des protéines virales. Modifié à partir de (Krill et al. 2021).

## 8. Revue bibliographique

Au cours la durée de cette thèse de nombreux travaux ont permis de d'améliorer notre compréhension du cycle viral des *Alphavirus*, et de CHIKV en particulier. En association avec Vasiliya Kril et Ali Amara nous avons publié en 2021 une revue bibliographique résumant les dernières avancées dans ce domaine. L'article publié dans *Annual Reviews of Virology*, Fait l'état des lieux des avancées récentes dans le domaine et des points encore incompris dans la biologie du CHIKV tels que : Les facteurs cellulaires impliqués dans l'entrée du CHIKV dans ses cibles cellulaires, les mécanismes de biogenèse des organelles de réplifications ainsi que les cofacteurs cellulaires potentiellement impliqués dans leur formation et leur fonctionnement, le rôle de nsP3 dans le recrutement de ces facteurs, ainsi que le rôle fonctionnel de FHL1 dans le cycle infectieux et la pathogénèse.

# New Insights into Chikungunya Virus Infection and Pathogenesis

Vasiliya Kril,<sup>1,\*</sup> Olivier Aïqui-Reboul-Paviet,<sup>2,\*</sup> Laurence Briant,<sup>2</sup> and Ali Amara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biology of Emerging Viruses Team, INSERM U944, CNRS UMR 7212, Institut de Recherche Saint-Louis, Université de Paris, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France; email: ali.amara@inserm.fr

<sup>2</sup>RNA Viruses and Metabolism Team, CNRS UMR 9004, Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, University of Montpellier, 34090 Montpellier, France; email: laurence.briant@irim.cnrs.fr

**ANNUAL  
REVIEWS CONNECT**

[www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)

- Download figures
- Navigate cited references
- Keyword search
- Explore related articles
- Share via email or social media

Annu. Rev. Virol. 2021. 8:327–47

First published as a Review in Advance on July 13, 2021

The *Annual Review of Virology* is online at [virology.annualreviews.org](http://virology.annualreviews.org)

<https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919-102021>

Copyright © 2021 by Annual Reviews. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited. See credit lines of images or other third-party material in this article for license information

\*These authors contributed equally to this article



## Keywords

chikungunya virus, host cell interactions, nonstructural proteins, pathogenesis, musculoskeletal tissues, immune evasion

## Abstract

Chikungunya virus (CHIKV) is a re-emerging mosquito-borne alphavirus responsible for major outbreaks of disease since 2004 in the Indian Ocean islands, South east Asia, and the Americas. CHIKV causes debilitating musculoskeletal disorders in humans that are characterized by fever, rash, polyarthralgia, and myalgia. The disease is often self-limiting and nonlethal; however, some patients experience atypical or severe clinical manifestations, as well as a chronic rheumatic syndrome. Unfortunately, no efficient antivirals against CHIKV infection are available so far, highlighting the importance of deepening our knowledge of CHIKV host cell interactions and viral replication strategies. In this review, we discuss recent breakthroughs in the molecular mechanisms that regulate CHIKV infection and lay down the foundations to understand viral pathogenesis. We describe the role of the recently identified host factors co-opted by the virus for infection and pathogenesis, and emphasize the importance of CHIKV nonstructural proteins in both replication complex assembly and host immune response evasion.

**CHIKV:** chikungunya virus

**IOL:** Indian Ocean Lineage

**nsP:** nonstructural protein

**ORF:** open reading frame

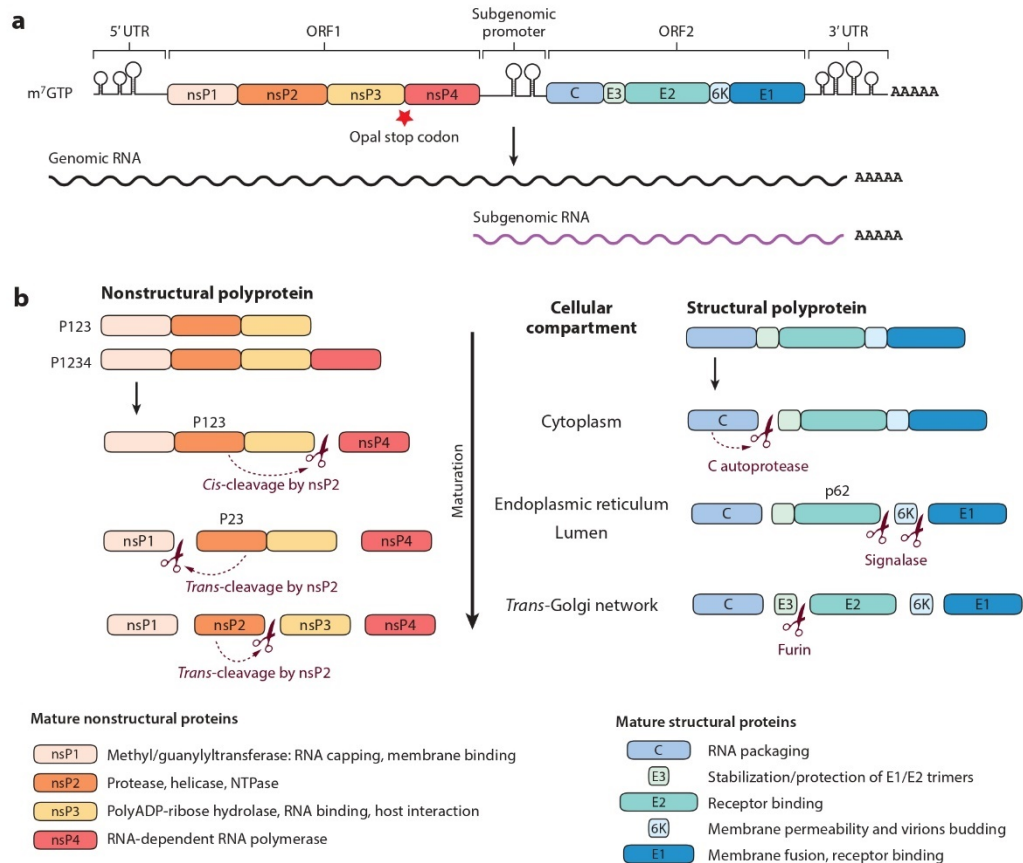
## INTRODUCTION

Chikungunya virus (CHIKV) is a mosquito-borne virus that belongs to the *Alphavirus* genus, a group of enveloped RNA viruses that cause severe diseases in humans and animals. CHIKV is the epidemiologically most prevalent alphavirus that is transmitted to humans by *Aedes* mosquitoes during the blood meal. Phylogenetic analysis identified three distinct lineages of CHIKV corresponding to their respective geographical origins: the West African, the East-Central-South African (ECSA), and the Asian lineages (1, 2). Before 2000, CHIKV circulation was restricted to Sub-Saharan Africa, where sporadic outbreaks have been described (2, 3). CHIKV transmission remained silent until 2004, when an ECSA strain re-emerged in Kenya (4), evolved, and rapidly disseminated to the Indian Ocean islands, causing outbreaks of unprecedented magnitude particularly on Reunion Island (5, 6). This epidemic strain, assigned now to a new lineage termed Indian Ocean Lineage (IOL), spread to Southeast Asia and India, causing more than 1.3 million cases (7), and autochthonous transmission was reported in southern Europe (Italy and France) (8, 9). A second major outbreak occurred when a strain from the Asian lineage emerged in the Caribbean Sea (Saint Martin Island) in December 2013 (10), causing more than one million cases in 50 countries of the South American continent (11). Prior to the 2004 Indian Ocean outbreak, CHIKV was vectored mainly by *Aedes aegypti* mosquitoes. However, the IOL strain contains an adaptive mutation within the sequence coding the E1 glycoprotein, causing an alanine-to-valine substitution at position 226 (E1-A226V), which is responsible for a 40-fold increase in transmission by *Aedes albopictus* without affecting viral fitness in the *A. aegypti* vector (12, 13). This and other *A. albopictus*-adaptive mutations (reviewed in 14) in the IOL CHIKV strain have promoted viral expansion in temperate regions colonized by this mosquito vector.

CHIKV belongs to the arthritogenic Old World alphaviruses (15, 16). CHIKV-infected persons experience a syndrome characterized by fever, rash, arthralgia, and myalgia (reviewed in 17). Importantly, CHIKV-infected patients develop chronic muscle and joint pains that last for months to years after acute infection (17). Currently, there is no CHIKV-specific antiviral or vaccine. Patient management relies only on symptom relief with analgics (paracetamol) and steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. The identification of new antiviral strategies relies on a better understanding of CHIKV host cell interactions and on the elucidation of the molecular mechanisms and cellular pathways co-opted by the virus to become a successful human pathogen. In recent years, significant progress has been made in the fields of CHIKV molecular and structural virology, immunology, entomology, and epidemiology. However, many aspects of CHIKV biology, including tissue tropism and pathogenesis, remain poorly understood. In this review, we focus on important insights that have emerged into how CHIKV interacts with the host cell and subverts host cellular pathways for productive infection. We discuss the molecular determinants of viral replication and persistence in musculoskeletal tissues and their effect on CHIKV pathogenesis. We also emphasize the recently discovered cellular factors mediating CHIKV infection and discuss the emerging roles of the CHIKV nonstructural proteins (nsPs) in viral replication and immune evasion.

## CHIKUNGUNYA VIRUS: GENOMIC ORGANIZATION AND INFECTIOUS CYCLE

CHIKV is a small (70 nm in diameter) enveloped virus with a single-stranded, message-sense, 5'-capped and 3'-polyadenylated RNA genome (11.8 kb) that is separated into two open reading frames (ORFs) (Figure 1a). The 5' ORF encodes a CHIKV nonstructural polyprotein (P1234) that is translated and cleaved in four nsPs forming the RNA replicase complex (18, 19). The 3' ORF is transcribed into a subgenomic positive-stranded RNA and encodes, after subsequent cleavage



**Figure 1**

CHIKV genomic organization and viral proteins. (a) The CHIKV genome consists of a 5'-capped and 3'-polyadenylated positive-stranded RNA molecule divided into two ORFs. Expression of ORF1 and ORF2, encoding for the nonstructural and structural polyproteins, is controlled by the genomic promoter in the 5' UTR and the internal subgenomic promoter, respectively. Genome replication and transcription are *cis*-regulated by RNA stem loops, referred to as conserved sequence elements, located in the 5' UTR, subgenomic promoter, and 3' UTR regions. CHIKV replication results in the accumulation of full-length RNA used as a genome for CHIKV progeny assembly. Subgenomic RNA is transcribed and used as a template for translation of structural polyproteins. (b) Translation of the CHIKV genome and subgenomic RNA results in the accumulation of nonstructural (P1234) and structural (C-E3-E2-6K-E1) polyproteins. The presence of a leaky opal stop codon at the end of the nsP3 sequence directs the translation of a partial nonstructural polyprotein (P123). P123 and P1234 are sequentially processed in *cis*- and *trans*-reactions by the cysteine protease nsP2 to produce mature nsPs (nsP1–4) forming the replication complex. The structural precursor is first matured by the C protein that possesses *cis*-proteolytic activity and then by cellular proteases (signalases and furin), resulting in the production of E1, E2, and E3 glycoproteins and 6K protein, all contributing to viral particle assembly and budding. Abbreviations: C, nucleocapsid; CHIKV, chikungunya virus; E, envelope; nsP, nonstructural protein; ORF, open reading frame; UTR, untranslated region.

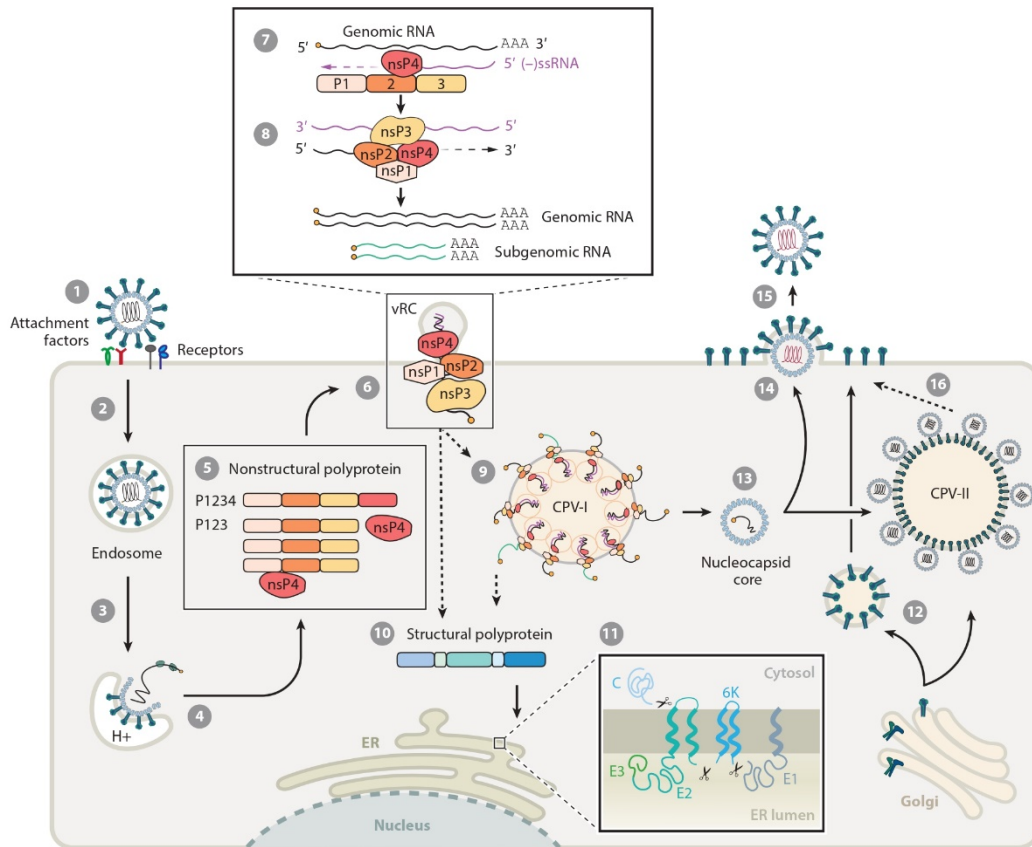
**C:** nucleocapsid  
**E:** envelope protein  
**vRC:** viral replication complex  
**dsRNA:** double-stranded RNA  
**CPV-I:** type I cytopathic vacuole  
**CPV-II:** type II cytopathic vacuole

and maturation steps, six structural proteins: C (nucleocapsid); E1, E2, and E3 envelope viral glycoproteins; 6K and its translational frameshift product, TF (transframe) (**Figure 1b**). A CHIKV virion consists of the viral RNA genome that is surrounded by 240 copies of the C protein and a host lipid bilayer with 80 embedded trimeric glycoprotein spikes. Each spike is formed by three E1-E2 heterodimers that are essential for receptor recognition and binding (E2) and membrane fusion (E1) (20).

CHIKV enters target cells by receptor-mediated endocytosis. Within the endosome, pH acidification triggers major conformational reorganization of E1/E2 heterodimers and unmasks the buried E1 fusion loop, leading to fusion of the viral and endosomal membrane (18, 19). Subsequently, the nucleocapsid disassembles in the cytoplasm, releasing the viral genomic RNA, which is directly translated into the P123 and P1234 precursors. (**Figure 2**). The P1234 polyprotein is rapidly processed at the nsP3/nsP4 junction by the nsP2 protease to release the active nsP4 RNA-dependent RNA polymerase. P123 and nsP4, along with the viral RNA, are recruited to the plasma membrane where, in association with host factors, they form an early short-lived replicase complex. A negative-stranded RNA complementary to the viral genome is synthesized and serves as an intermediate for viral replication (21, 22) (**Figure 2**). P123 accumulation leads to the complete polyprotein processing, and the replicase activity switches to the transcription of new positive-stranded RNA genomes and subgenomic RNA-encoding viral structural proteins. These steps take place in bulb-shaped, viral-induced vesicular structures formed at the plasma membrane, termed replicative spherules or viral replication complexes (vRCs), which isolate the accumulating double-stranded RNA (dsRNA) from innate immune sensing (**Figure 2**). Upon internalization, these compartments can fuse with endosomes, resulting in the formation of large vacuolar structures of 600 to 2,000 nm in diameter, termed type I cytopathic vacuoles (CPV-I), where RNA synthesis continues before diffusion to the cytoplasm through a connecting pore (23). Once in the cytoplasm, the subgenomic RNA is translated into a structural polyprotein. It is processed by the autocatalytic activity of the C protein, which is released in its mature form (22). Direct interaction with the newly synthesized genomes catalyzes C oligomerization and nucleocapsid assembly. The remaining polyprotein (pE3-E2-6K-E1) is translocated and inserted in the endoplasmic reticulum (ER) membrane for processing (**Figure 2**). Release of the accessory 6K protein mediated by host ER signalases allows the association of E1, E2, and E3 into an immature trimeric spike complex, which traffics through the secretory pathway while undergoing conformational changes and post-translational modifications (palmitoylation, N-linked glycosylation). Alternatively, E glycoproteins are arranged and transported from the *trans*-Golgi network to the plasma membrane in type II cytopathic vacuoles (CPV-II), which recruit assembled nucleocapsids on their cytoplasmic face (24). The E3 protein, which stabilizes the E2/E1 trimers by preventing the activation of the E1, is released by a furin-dependent cleavage in the *trans*-Golgi (22). At the plasma membrane, CHIKV particle budding is finally promoted by the interaction of the E2 cytoplasmic domain with the hydrophobic domain of the C protein (**Figure 2**).

### THE KEY ROLE OF THE MUSCULOSKELETAL TISSUE IN CHIKUNGUNYA VIRUS PATHOGENESIS

Viral tropism has a direct effect on pathogenesis, including the nature of symptoms, the duration of infection, and the establishment of a chronic phase (25). In vertebrates, CHIKV displays a large cell and tissue tropism that covers endothelial cells, fibroblasts from almost all organs, and brain cells (26–30). However, viral pathogenesis mainly reflects CHIKV capacity to actively replicate in joints and muscle tissues (29, 31–37). In joints, chondrocytes, osteoblasts, and bone marrow mesenchymal stem cells, which serve as precursors for osteogenic cells, are susceptible to CHIKV



**Figure 2**

CHIKV replication cycle in vertebrate cells. CHIKV infection is initiated by the interaction of E1/E2 glycoprotein heterodimers with cell surface Mxra8 receptor and attachment factors (Step 1). The viral particle is internalized by endocytosis and trafficked to endosomes (Step 2). Acidification of the vacuolar pH results in the unmasking of the E1 fusion peptide and fusion of viral and endosomal membranes (Step 3). The viral C is released in the cytoplasm and rapidly uncoated (Step 4). The CHIKV genome is translated to produce P123 and P1234 polyproteins (Step 5). nsP4 is matured and forms a complex with P123 and an RNA template that traffics to the plasma membrane. This complex reshapes the cell membrane to promote the formation of replication organelles, or spherules (Step 6), in which a negative-stranded full-length RNA [(-)ssRNA] is synthesized (Step 7). Then, P123 is sequentially processed to produce the four mature nsPs, resulting in a shift of replication complex activity toward the synthesis of a positive-stranded RNA [(+)ssRNA] genome and subgenomic RNA (Step 8). To some extent, CHIKV replication compartments are endocytosed and fused with endo-lysosomes to form CPV-I in which internalized spherules remain active (Step 9). Structural proteins are translated from subgenomic RNA in the form of a polyprotein translocated to the ER (Step 10). C is liberated by autocatalytic processing. E glycoproteins and 6K protein are matured by host proteases (Step 11) and trafficked to the plasma membrane through the secretory pathway (Step 12). The C protein and RNA genome form an icosahedral nucleocapsid (Step 13). Viral assembly takes place at the plasma membrane where mature E glycoproteins and nucleocapsids are targeted (Step 14). C/E2 interaction promotes CHIKV particle budding and release (Step 15). Alternative recruitment of assembled nucleocapsids and E glycoproteins to CPV-II additionally contributes to CHIKV virion assembly and budding (Step 16). Abbreviations: C, nucleocapsid; CHIKV, chikungunya virus; CPV-I, type I cytopathic vacuole; CPV-II, type II cytopathic vacuole; E, envelope; ER, endoplasmic reticulum; nsP, nonstructural protein; ORF, open reading frame; ssRNA, single-stranded RNA; UTR, untranslated region; vRC, viral replication complex. Figure adapted from Cell Background Straight by BioRender.com (2020), retrieved from <https://app.biorender.com/biorender-templates>.



**IFN:** interferon

**RANKL:** receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B

infection (38–40). Cellular damages account for CHIKV-induced arthritis and joint pain. As an example, infection of osteogenic cells impairs mineralization and repair capacity, resulting in the dysregulated dynamics of bone homeostasis often reported in patients (40). Muscles are also a privileged site for CHIKV replication as supported by the presence of viral antigens and signs of necrosis, vacuolization, and fibrosis from patients with acute and chronic CHIKV disease (41). In vitro, muscle fibroblasts, satellite cells, and myoblasts (muscle progenitors) are highly susceptible to CHIKV infection (37, 41, 42). Initial reports suggested that terminally differentiated myotubes are poorly infected by CHIKV (41). However, murine skeletal muscle fibers were recently proven to be efficiently infected with effect on the severity of CHIKV infection in mice (43–45). A few studies also suggested that recent epidemic strains could differ in their ability to infect muscle cells and to induce a myopathic syndrome, although it is not formally demonstrated (42, 45). The isolate from the Reunion Island outbreak was shown to induce more severe muscle disease in neonatal mice as compared to an isolate from Senegal circulating in 1983 (45). Whereas both strains equally spread from the inoculation site to distal muscle by infecting connective tissue fibroblasts, the epidemic strain replicates more efficiently in myofibers, resulting in increased muscle disease characterized by severe myonecrosis (45). Whether the increased muscle pathology is due to a more robust immune response is not clear, as no differences were observed in the induction of type I interferon (IFN-I) and proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  or IL-6 (45). Recently, Lentscher and colleagues (44) definitively established that viral replication in muscle cells is determinant for CHIKV disease pathogenesis. They engineered a CHIKV strain exhibiting restricted replication in muscles via incorporation of target sequences for skeletal muscle cell-specific miR-206. This microRNA is expressed at detectable levels in skeletal muscle progenitor satellite cells, strongly induced upon differentiation, and then stably expressed at high levels throughout the life of the muscle fiber. Using this tool, Lentscher and colleagues demonstrated that replication in skeletal muscle cells does not affect the overall viral titers and the global inflammatory status. Instead, it results in attenuated muscle damages reflected by diminished necrosis and local induction of IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , and IP10, which are biomarkers of disease severity in humans and mice (44, 46).

Besides tissue damage, the attraction of infiltrating monocytes/macrophages is also critical to local inflammation and viral persistence (39, 47–49). More specifically, infection of fibroblast-like synoviocytes results in the secretion of IL-6, IL-8, and CCL2, which attracts phagocytes. It also stimulates secretion of RANKL (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B), which may contribute to bone loss and to the occurrence of arthritis/arthralgia by stimulating the differentiation of monocytes into bone-resorbing osteoclasts (39, 50). In muscles, monocytes/macrophages could be part of the dynamics of CHIKV-induced myositis. The modulation of the monocyte-driven infiltration reduces muscle inflammation while allowing the accumulation of a macrophage subset enhancing muscle repair and recovery (48).

Musculoskeletal tissues are also proposed to participate in CHIKV persistence and chronic condition (34, 38, 51–53). Multiple studies reported that CHIKV RNA persists long after viremia declines (38, 53, 54). Besides synovial macrophages, which are proposed to be a niche for viral persistence (38, 54), muscle fibroblasts and also myofibers that survive acute infection are potential reservoirs for persistent CHIKV RNA in mice (34). Nevertheless, actively replicating CHIKV has not been evidenced so far in tissues exhibiting chronic inflammation, and CHIKV surface antigens failed to be detected in muscle fibroblasts harboring persistent viral RNA (17, 34, 55). Instead, the chronic CHIKV-induced immunopathology seems to be the prolongation of the acute inflammatory process, which persists until clearing of the viral material (17, 56). It is still unknown how CHIKV RNA persists in joints and muscles and to what extent it contributes to chronic CHIKV disease.

## **Mxra8, AN IMPORTANT BUT NOT EXCLUSIVE DETERMINANT OF CHIKUNGUNYA VIRUS ENTRY AND PATHOGENESIS**

CHIKV entry into target cells is a complex multistep process that begins with the interaction of the viral E2 glycoprotein with specific receptor(s) expressed on the host cell surface. The cellular receptor mediating viral entry remained elusive until Zhang and colleagues (57) identified Mxra8 (also called limitrin, DICAM, or ASP3) as a CHIKV entry factor using a CRISPR/Cas9 genome-wide screening strategy. Mxra8 is an adhesion molecule mainly expressed on epithelial and mesenchymal cell types targeted by CHIKV (dermal and synovial fibroblasts, osteoblasts, chondrocytes, and skeletal muscle cells). Mxra8 is the first CHIKV entry molecule identified so far that fulfills the criteria of a virus receptor. Structural studies have revealed that it interacts with the envelope spike in a complex 3:3 binding interaction (58, 59). In this complex, Mxra8 contacts both E2 and E1 proteins to facilitate virus attachment and internalization in the cell. Overexpression of Mxra8 in poorly susceptible cells renders them permissive to CHIKV (57). Conversely, preventing the Mxra8-CHIKV interaction by CRISPR-Cas9-mediated depletion of the *Mxra8* gene or by using neutralizing antibodies or fusion of extracellular Mxra8 domains with an immunoglobulin Fc fragment (Mxra8-Fc) blocked infection in both murine and human cells and reduced CHIKV pathogenesis in experimentally infected mice (57, 60, 61). This indicates that Mxra8 is required for optimal infection, dissemination, and articular pathogenesis (joint swelling and neutrophil infiltration). Interestingly, this function is conserved for arthritogenic alphaviruses, such as Ross River, Mayaro, and o'nyong-nyong viruses (57). The lack of Mxra8 on the surface of some CHIKV permissive cells (57) strongly indicates that other CHIKV receptors exist and remain to be discovered. Consistent with this, some pathogenic IOL strains (e.g., LR-2006) display limited dependency on Mxra8, conversely to Asian CHIKV strains (181/25 and AF15561 strains) (57). Glycosaminoglycans (GAGs), a family of negatively charged polysaccharides, interact with a structurally conserved and positively charged domain in E2. These membrane proteins were proposed to enhance infection by promoting E1/E2 dissociation (62, 63). The functional importance of GAGs was recently reassessed in genome-wide loss of function screens performed in HAP1 cells that identified GAGs' biosynthesis enzymes (B3GAT3, SLC35B2, PAPSS1, NDST1) as critical factors for CHIKV infectivity (64, 65). The need for GAGs binding in order to achieve efficient infection was recently demonstrated for all CHIKV clades (62). Interestingly, the comparison of viruses from the ECSA and Asian lineages revealed that the requirement of GAGs for CHIKV binding and infection was inversely correlated with Mxra8 dependency (62). This suggests that GAG binding may be a compensatory mechanism for the entry of CHIKV strains poorly interacting with Mxra8 (62). However, this model does not seem to be the only scenario allowing for viral entry, as infection was still observed to some extent in the absence of GAGs and Mxra8 (62). The vast array of cell factors reported to facilitate CHIKV entry, including C-type lectins (DC-SIGN and L-SIGN), immunoglobulin and mucin domain-containing proteins 1 and 4 (hTIM1 and hTIM4), and the AXL receptor, which all have also been described to stimulate CHIKV infection (66–68), could be part of the complex mechanism accounting for CHIKV entry and wide tropism.

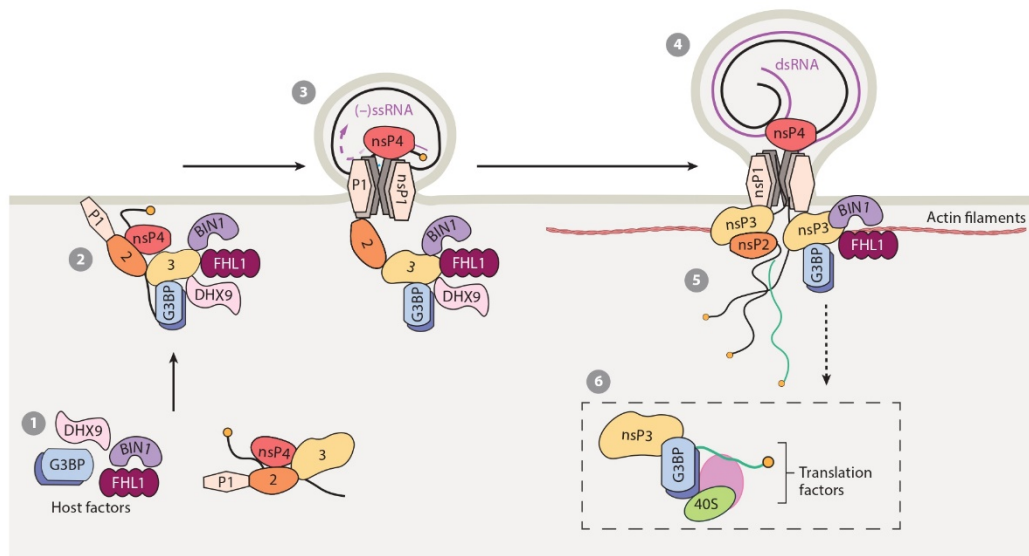
## **BUILDING MEMBRANE SPHERULES TO ENSURE VIRAL REPLICATION**

Like other alphaviruses, CHIKV remodels the host plasma membrane into bulb-shaped protrusions of approximately 50 nm in diameter, referred to as spherules. These compartments create an optimal microenvironment for viral replication because they concentrate the viral nsP, genomic RNA, and dsRNA used as genome replication forms (69). Spherules are also supposed to protect

dsRNA and nascent uncapped RNAs from innate sensing and degradation by cellular RNases (69, 70). In this context, the inner spherule is connected to the cytosol by a 7-nm opening that allows the import of metabolites and cofactors and the export of newly synthesized genomic and subgenomic RNAs. Inside the spherule, the CHIKV replication complex (RC) associates with the inner face of membranes through nsP1, the viral capping enzyme that contains unique membrane binding capacity and displays membrane-dependent methyl/guanylyltransferase activities (71–74). Three-dimensional (3D) cryo-electron tomography was successfully applied to resolve the complex spatial organization of replication membranes formed by many positive-stranded RNA viruses (75–81). Conversely, the 3D architecture and biogenesis of alphavirus spherules remain enigmatic. Particularly, the exact localization of the RC within the spherule, stoichiometries of the nsPs in these compartments, and the nature of cellular factors contributing in spherule biogenesis are all questions that remain unanswered.

Jones and colleagues (82) recently solved the structure of the CHIKV nsP1 assembly by single-particle cryo-electron microscopy. They found that, upon membrane binding, recombinant nsP1 assembles in a dodecameric ring, forming a pore-like structure compatible with the trafficking of globular proteins up to 70–90 kDa in size. In this membrane-bound complex, nsP1 is switched from an enzymatically inactive monomer to a methyl/guanylyltransferase dodecameric active form, NsP1, a monotopic membrane protein. Therefore, by interacting with the inner phospholipid leaflet, nsP1 forms a capping pore that may corral the replication vesicle neck and therefore be critical for spherule structure maintenance (**Figure 3**). Further, nsP1 macroassembly might potentially function as a bioreactor simultaneously capping 12 nascent RNA molecules during their export to the cytosol, thereby contributing to the exceptionally high alphavirus replication rate. Striking similarities also exist with the crown-like assembly of nodavirus-encoded replicase at the neck of Flock House virus spherules, which favors the hypothesis of an evolutionarily conserved replication organelle pore structure among alpha-like viruses (83, 84). This information, which provides an incomparable breakthrough to our understanding of alphavirus replication compartment assembly, needs to be refined in CHIKV-infected cells, considering the simultaneous expression of all four nsPs in the context of a sequential matured nonstructural polyprotein. Overall, this model questions the stoichiometry of other nsPs within and near the spherules. It also raises new important questions regarding the role of nsP1 in spherule biogenesis. Indeed, the minimal requirement for alphavirus spherule formation is the expression of a partially cleaved nonstructural polyprotein in the form of nsP4 + P123 (85) (**Figure 3**). This process is modulated to some extent by the viral RNA template length that determines the spherule shape and size (86). nsP1, whose complex interaction with membranes dramatically reshapes synthetic lipid bilayers or cell membranes in the absence of any other viral factor, is certainly pivotal to spherule creation (72, 82, 87–89). Nevertheless, morphological differences in CHIKV spherules and nsP1-induced membrane deformation, seen as filopodia-like protrusions, suggest additional players (**Figure 3**). For instance, the contribution of nsP1-interacting cellular factors in membrane reshaping during spherule biogenesis awaits investigation (90, 91). CHIKV nsP3 was proposed to be involved in spherule assembly by recruiting BIN1/amphiphysin 2, an F-BAR protein involved in membrane curvature, but there is still a lack of clear evidence (92) (**Figure 3**). Furthermore, the contribution of defined membrane lipid species should be considered with a special attention to fatty acid molecular species that determine the fluidity or curvature of the lipid bilayer, depending on the length and saturation of their fatty acyl chains, and to negatively charged phospholipids and cholesterol that regulate nsP1 capping activity and membrane affinity, respectively (74, 93), and could alternatively promote host cofactor coalescence to the replication site to assist spherule assembly.

Finally, the exact replication steps taking place in proximity to CHIKV spherules at the plasma membrane remain poorly defined. In contrast with other alphaviruses, which internalize



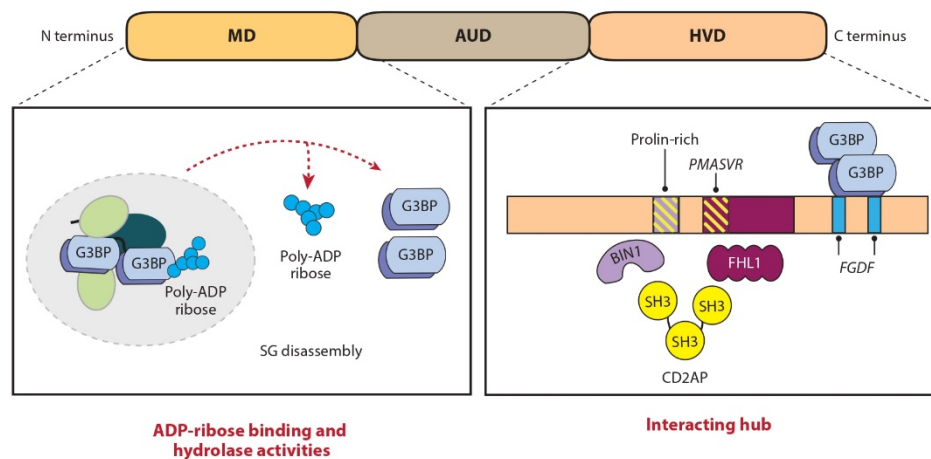
**Figure 3**

Model of CHIKV replication complex assembly. (*Step 1*) G3BP, FHL1, DHX9, and BIN1/Amphiphysin2 (and other SH3 domain replicase and associated host factors) anchor to the plasma membrane through nsP1 membrane-binding properties. (*Step 2*) This complex starts replicating the RNA genome-containing proteins such as CD2AP and SH3KBP1 are recruited to the CHIKV replication complex through interaction with the nsP3 hypervariable domain, which serves as a hub for host/pathogen interactions. (*Step 3*) CHIKV replicase and associated host factors anchor to the plasma membrane through nsP1 membrane-binding properties. This complex starts replicating the RNA genome, assisted by DHX9, which is proposed to regulate the early RNA translation-to-replication switch. (*Step 4*) BIN1/Amphiphysin2, CD2AP, SH3KBP1 and FHL1 involved in membrane bending and/or actin cytoskeleton organization may assist the biogenesis of bulb-shaped spherules separating the dsRNA replication intermediate from host innate immune recognition. (*Step 5*) Genomic and subgenomic RNAs synthesized in the replication organelle are then massively exported to the cytoplasm and capped by the nsP1 dodecameric ring connecting the spherule to the cytoplasm. (*Step 6*) G3BP molecules recruited to the cytoplasmic face of these organelles are proposed to recruit the cellular translation machinery in close proximity to membrane vRCs to ensure optimal viral protein synthesis. Abbreviations: CHIKV, chikungunya virus; dsRNA, double-stranded RNA; nsP, nonstructural protein; ssRNA, single-stranded RNA; UTR, untranslated region; vRC, viral replication complex. Figure adapted from images created with BioRender.com.

membrane spherules by activation of the phosphatidylinositol-3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling, CHIKV replication compartments are mostly maintained at the plasma membrane. This feature was assigned to the poor capacity of CHIKV to activate this pathway (94). Currently, the clear benefit of spherule endocytosis is not clearly understood (23). Altogether, viral protein assembly, contributing cell factors, and metabolism pathways involved in spherule biogenesis and architecture represent new promising targets for the development of therapeutics to control CHIKV infection in humans.

### CHIKUNGUNYA VIRUS NONSTRUCTURAL PROTEIN 3: A MULTIFACETED VIRAL PROTEIN ESSENTIAL FOR VIRUS INFECTION AND PATHOGENESIS

The nsP3 molecule is probably the most fascinating and enigmatic CHIKV-encoded protein and has been recognized as essential for both viral replication and adaptation to its host. This viral



**Figure 4**

Organization of CHIKV nsP3 and associated functions. CHIKV nsP3 is structurally separated into three domains: an N-terminal MD that binds and hydrolyzes ADPr and poly-ADPr, a central zinc-finger-containing AUD, and a C-terminal HVD identified as a hub for host factor binding. Mapped binding domains in HVD are indicated. The concerted action of MD-associated ribosylhydrolase activity and HVD results in the removal of poly-ADPr conjugated to G3BP, dissociation of G3BP-positive SGs, and redirection of G3BP to the CHIKV replication complex and nsP3 aggregates. Abbreviations: ADPr, ADP-ribose; AUD, alphavirus unique domain; CHIKV, chikungunya virus; HVD, hypervariable domain; MD, macrodomain; nsP, nonstructural protein; SG, stress granule.

**MD:** macrodomain

**AUD:** alphavirus unique domain

**HVD:** hypervariable domain

**G3BPs:** Ras-GAP SH3 domain-binding proteins

**SG:** stress granule

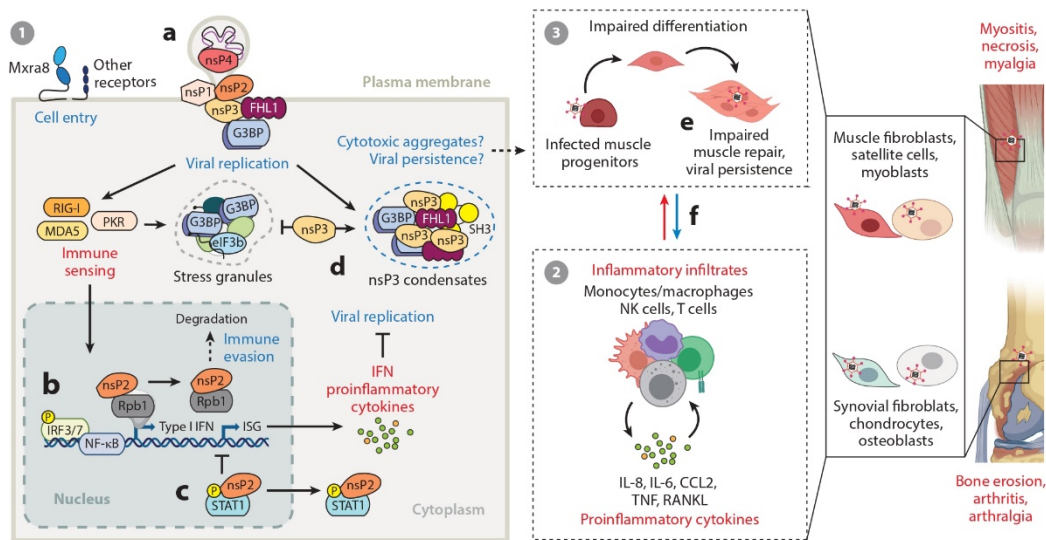
factor is a tripartite phospho-protein composed of a highly conserved N-terminal globular domain termed macrodomain (MD), a central domain forming the alphavirus unique domain (AUD) conserved among alphaviruses, and a C-terminal hypervariable domain (HVD) (Figure 4). During the early phase of the CHIKV life cycle, nsP3 localizes within the vRC and plays a critical role in viral replication (95–98). Several studies showed that nsP3 acts as a platform for the recruitment of multiple host factors through its HVD (91, 92, 95, 99–101). The HVD is intrinsically disordered and consists of multiple small peptides that interact with distinct sets of cellular proteins, which vary depending on both the alphavirus species and the infected cell type (101) (Figure 4). For CHIKV, the major HVD binding molecules identified so far are the G3BP (Ras-GAP SH3 domain-binding proteins, G3BP1 and G3BP2) family proteins, FHL1, DHX9, and several SH3 domain-containing proteins including BIN1/Amphiphysin2, CD2AP, and SH3KBP1, which are involved in membrane bending and cytoskeleton regulation. The roles of G3BP family members during CHIKV replication have been extensively studied. These are essential factors in the assembly of stress granules (SGs), which control viral replication by arresting viral protein translation (reviewed in 102). G3BPs contain RNA-binding domains that self-assemble in macromolecular complexes (103), driving the nucleation of cellular SGs. Disruption of the G3BP-nsP3 HVD interaction or the depletion of both G3BP1 and G3BP2 blocks CHIKV replication (98, 104, 105). According to the current model, in CHIKV-infected cells, G3BPs may interact with the viral P123 precursor and in turn bind the viral genomic RNA to form prereplicative complexes that drive membrane spherule formation and viral RNA synthesis (104). Furthermore, G3BPs interact with the 40S ribosomal subunit, which is thought to recruit the cellular translational machinery in the vicinity of the vRCs for viral protein synthesis (106).

Emerging evidence indicates that nsP3 may accomplish a yet-unknown function during the CHIKV life cycle that is distinct from its role in RNA replication and vRC assembly. Several studies showed that a large proportion of nsP3 proteins, expressed either alone or in the context of CHIKV infection, aggregate to form high-density rod-like structures and large spherical granules distinct from the vRC (95, 107, 108). These nsP3 condensates rapidly increase in size and number during virus replication (108). Importantly, CHIKV nsP3 aggregates also contain G3BPs, yet they are different from SGs in morphology and composition (97, 109). Moreover, cells harboring nsP3 aggregates are not able to form bona fide SGs in response to cellular stress, suggesting a role of nsP3 in SG disassembly by trapping G3BPs (97, 98). Importantly, other nsP3 binding proteins such as FHL1, CD2AP, and SH3KBP1 are also found within these condensates (64, 110, 111). By using subdiffractional multicolor microscopy and human cells persistently replicating a CHIKV replicon, Remenyi and colleagues (108, 112) assessed nsP3 spatial and temporal distribution. They demonstrated that nsP3 clusters of different sizes and morphology coexist in cells and can persist for hours to days. The nsP3 clusters contain genomic RNA and are localized either near dsRNA- and nsP1-enriched foci or close to the nuclear envelop and nucleoporins. Moreover, they are detergent resistant and exert liquid-liquid phase separation properties also proposed for SGs (108, 113). Recent studies revealed that, besides the HVD region, the nsP3 MD is important for aggregate formations (Figures 4 and 5). The N-terminal MD of nsP3 binds and removes ADP-ribose (ADPr) or poly-ADPr (114, 115), a reversible post-translational modification known to regulate SG formation/disassembly. In CHIKV-infected cells, this activity reverses G3BP-ribosylation, and favors SG disassembly, and recruitment of translation initiation factors within nsP3 condensates (109). Indeed, in the absence of MD ribosylhydrolase activity, nsP3 condensates contain both RNA-binding proteins (G3BPs, TIA-1, TIAR, and others) and translation initiation factors (eIF3, RACK1, and others), thereby corresponding to SGs (109). An important question raised by the abovementioned studies is how these nsP3 aggregates contribute to virus pathogenesis (Figure 5). One possibility is that these nsP3 structures might participate in viral persistence by trapping CHIKV RNA or contribute in the attenuation of the antiviral responses by sequestering key players of the innate immunity, thereby facilitating CHIKV replication. Given the importance of nsP3 in CHIKV replication, further studies providing a precise description of the formation, composition, and functions of the nsP3 condensates are required to understand their biological relevance in CHIKV pathogenesis.

ADPr: ADP-ribose

### FHL1, A BRIDGE BETWEEN CHIKUNGUNYA VIRUS REPLICATION AND PATHOGENESIS?

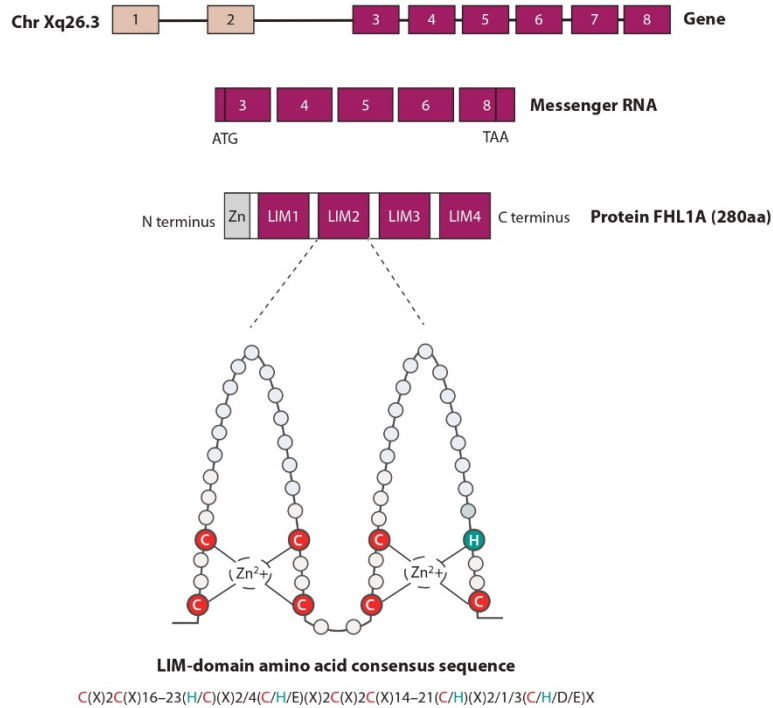
Little is known about the host cellular factors that dictate CHIKV tropism for muscles and joints. A recent genome-wide CRISPR-Cas9 screen identified the FHL1 protein as an important host factor for CHIKV infection and pathogenesis (64). FHL1 is a member of the FHL protein family, which is characterized by the presence of an N-terminal half LIM domain followed by four complete LIM domains (116, 117) (Figure 6). Infection studies in FHL1 knock-out cell lines, as well as in primary cells from patients suffering from Emery–Dreifuss muscular dystrophy that lack functional FHL1 proteins, demonstrated that FHL1 is important for CHIKV replication and cell permissiveness (64). Interestingly among the *alphavirus* genus, only CHIKV and its close relative o'nyong-nyong virus use FHL1 for infection. These observations suggest that FHL1 dependency was acquired late during alphavirus evolution. FHL1 interacts with the nsP3 HVD and is important for viral RNA amplification (64). Indeed, ablation of the *fhl1* gene severely reduced both CHIKV negative-stranded RNA synthesis and viral spherule formation. Further investigation is required to decipher the exact molecular mechanisms by which FHL1 mediates CHIKV infection



**Figure 5**

Hypothetical model for CHIKV-induced muscular and articular pathogenesis. (*Step 1*) Successful CHIKV replication in muscle and joint cells relies on the concerted action of host factors and viral proteins. CHIKV nsPs allow efficient viral RNA synthesis within the replicative spherules (*a*). CHIKV nsP2, translocated to the nucleus of infected cells, shuts down antiviral genes transcription by (*b*) redirecting the RNA polymerase II Rpb1 subunit to proteasomal degradation and (*c*) inhibiting phospho-STAT1 nuclear accumulation. By sequestering G3BPs, nsP3 counteracts the assembly of cytosolic stress granules and contributes to translational shutoff (*d*). (*Step 2*) The release of cytokines and immune mediators by infected cells attracts monocytes/macrophages to muscles and joints, leading to local inflammation, muscle myositis, and bone resorption. (*Step 3*) CHIKV replication and persistence in muscle progenitor cells impairs muscle repair, contributing to musculoskeletal disease (*e*). Viral material persistence in infected tissues can exacerbate host immune responses, leading to chronic rheumatic symptoms (*f*). Abbreviations: CHIKV, chikungunya virus; IFN, interferon; IRF, interferon regulatory factor; ISG, interferon-stimulated gene; nsP, nonstructural protein; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; NK, natural killer; PKR, protein kinase R; RANKL, receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B; STAT1, signal transducer and activator of transcription 1. Figure adapted from images created with BioRender.com.

and to determine whether FHL1 is directly involved in the assembly of spherules or regulates a step in the viral RNA synthesis process. The importance of FHL1 in CHIKV pathogenesis is further supported by *in vivo* studies showing that FHL1 knock-out mice are resistant to CHIKV infection and do not develop disease. Interestingly, FHL1 tissue expression reflects CHIKV tropism. Indeed, FHL1 protein is highly abundant in skeletal muscle and fibroblasts (118, 119). FHL1 is known to participate in muscle development and homeostasis. It is involved in myogenesis, which consists of the activation of satellite cells and their differentiation in myoblasts, which then fuse to create myotubes that finally differentiate in mature myofibers. Muscle satellite cells express high levels of FHL1, which could explain their susceptibility to CHIKV infection. One can speculate that, upon FHL1 hijacking by nsP3, infected muscle satellite cells might be unable to properly regenerate damaged muscle fibers, contributing to CHIKV-induced musculoskeletal disorders (**Figure 5**). An indirect link between FHL1 expression and CHIKV disease severity is supported by the observation that FHL1 seems to be differentially used by CHIKV strains (64, 111). For instance, the pathogenic CHIKV-21 strain isolated from a patient infected during the 2005–2006 CHIKV outbreak on Reunion Island is highly dependent on FHL1 for infection *in vitro* and



**Figure 6**

FHL1 gene and protein organization. FHL1A is encoded by human chromosome Xq26.3 and is expressed with high levels in striated muscle cells and fibroblasts. Exons 1 and 2 (*beige boxes*) are noncoding; exons 3 to 8 (*purple boxes*) encode the full-length FHL1 protein, organized into an N-terminal half LIM domain followed by four complete LIM domains. Each domain consists of two zinc-finger motifs, proposed to be a protein/protein binding interface ensuring the assembly of multimeric protein complexes. The LIM domain amino acid consensus sequence is indicated.

induces severe muscular pathology in mice (64). Conversely, the requirement for FHL1 was less pronounced for the sylvatic CHIKV 37997 strain from the West African genotype (64) and the attenuated CHIKV 181/25 strain (111), which are less pathogenic in mice (45). Understanding the molecular basis for FHL1 usage by CHIKV strains may provide important insights into the muscular pathology associated with CHIKV infection. Furthermore, a study on FHL1 polymorphisms in cohorts of CHIKV-infected individuals could add considerable weight to the *in vivo* relevance of this host factor to CHIKV pathogenesis.

### INHIBITION OF HOST INNATE IMMUNITY BY THE CHIKUNGUNYA VIRUS NONSTRUCTURAL PROTEINS

The ability of CHIKV to successfully establish infection and pathogenesis in its host hinges upon its capacity to counteract the host immune responses. Early after infection, CHIKV elicits the massive secretion of IFNs and numerous proinflammatory chemokines and cytokines that are



**ISG:**  
interferon-stimulated  
gene

**STAT1:** signal  
transducer and  
activator of  
transcription 1

critical to the control of viremia and pathogenesis (37, 120) (**Figure 5**). Mice deficient for the IFN  $\alpha/\beta$  receptor rapidly succumb to CHIKV infection, showing that IFN-I signaling is critical in controlling infection (121). This response, initiated by primary sensing of viral RNA via pattern recognition receptors (PRRs) of the RIG-1-like helicase family (RIG-1 and MDA5), controls the expression of hundreds of interferon-stimulated genes (ISGs) (e.g., ISG15, BST2) capable of interrupting CHIKV replication (121–124) (**Figure 5**). As a countermeasure, CHIKV has evolved various strategies to disrupt IFN signaling. In contrast to New World alphaviruses that usually use their C protein to evade innate immunity, the strategies developed by CHIKV to prevent IFN signaling and ISG antiviral effects have been mainly assigned to the viral protease nsP2. In infected cells, CHIKV nsP2 is detected close to the plasma membrane, where it takes part in the RC, and in the nucleus, where it translocates early after infection, thanks to the presence of a noncanonical nuclear localization motif (125, 126). In the nucleus, nsP2 rapidly targets the Rpb1 catalytic subunit of the RNA polymerase II to proteasomal degradation, thereby shutting down cellular gene transcription and avoiding activation of innate immune genes (127) (**Figure 5**). NsP2-mediated Rpb1 degradation is independent of nsP2 enzymatic activities but is abolished by mutation of Proline 718 in the nsP2 C terminus (90, 125–127). Besides this mechanism, proposed as the main strategy to evade the cellular antiviral response, it now appears that nsP2 specifically interrupts IFN signaling independent of general transcriptional shutdown. The nuclear fraction of nsP2 was indeed found to prevent the nuclear accumulation of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) (128) by promoting its re-export in the cytoplasm through the chromosome region maintenance 1-mediated pathway. This activity involves the nsP2 methyltransferase-like domain (129) (**Figure 5**). Besides nsP2, recent evidence suggests that other nsPs, namely nsP1 and nsP3, also play a role in immune evasion. In this context, nsP3-MD ADP-ribose hydrolase activity was recently reported to reverse nsP2 mono-ADP-ribosylation by the ADP-ribosyltransferase ARTD10, interfering with its auto-proteolytic function (130). In this model, nsP3 ADP-ribose hydrolysis activity would therefore be critical for immune evasion by antagonizing the antiviral activity of the IFN-inducible ARTD10 that efficiently restricts CHIKV protein maturation and efficient replication. nsP1 also appears as one of the countermeasures deployed by CHIKV to avoid the cellular antiviral system, thus contributing to CHIKV-induced musculoskeletal inflammation in mice (131). nsP1 has recently been described as counteracting the IFN-I response by interacting with the cyclic GMP-AMP synthase (cGas), an effector of the cGas-stimulator of IFN genes signaling axis that restricts CHIKV infection (132). Considering these recent reports, CHIKV has seemingly acquired diverse countermeasures to limit host antiviral responses (**Figure 5**). While the most recent investigations suggest redundant mechanisms, the respective importance of nsP1-, nsP2- and nsP3-dependent scenarios in CHIKV global control strategy remains unknown.

## CONCLUDING REMARKS

CHIKV causes a debilitating acute disease that results in persisting arthralgia and myalgia in a large proportion of infected individuals. The mechanisms of CHIKV pathogenesis are complicated and multifactorial, involving both viral and host factors. In the past decades, genomics, proteomics, and structural studies as well as forward genetic screens have generated a plethora of new information about the CHIKV host cell molecular interactions, leading to the identification of several key host molecules important for viral infection. Most of these studies have been performed in immortalized cell lines. In the future, exploring the function of these cellular factors in relevant cellular systems such as primary fibroblasts, musculoskeletal tissues, and animal models of disease will undoubtedly unlock new paradigms of viral pathogenesis. In addition, research will need to uncover the mechanisms of viral RNA persistence in musculoskeletal tissues and joints in

order to uncover at a molecular level why CHIKV frequently evolves to a chronic phase. Studies on CHIKV immunobiology have outlined several elegant mechanisms developed by the virus to counteract host innate immune responses. A detailed understanding of the involved molecular processes and the identification of novel immune evasion strategies would certainly refine our understanding of CHIKV pathogenesis and may be the starting point for the generation of attenuated vaccine candidates and therapeutics to combat CHIKV disease.

### DISCLOSURE STATEMENT

The authors are not aware of any affiliations, memberships, funding, or financial holdings that might be perceived as affecting the objectivity of this review.

### ACKNOWLEDGMENTS

We apologize to all authors whose work could not be cited due to space restrictions. A.A.'s lab received funding from the French Government's Investissement d'Avenir program, Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (grant n°ANR-10-LABX-62-IBRID), the Fondation pour la Recherche Médicale (grant FRM - EQU202003010193), the AFM-Téléthon (grant R20082HH), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-AAPG2020 Projet CHIKHOST), and the consortium REACTing. L.B.'s team is funded by the Agence Nationale de la Recherche TOMOCHIKV grant (ANR-18-CE11-0026-01) and by the CNRS. V.K. and O.A.-R.-P. are funded by a scholarship from the French Ministry of Research.

### LITERATURE CITED

1. Brault AC, Tesh RB, Powers AM, Weaver SC. 2000. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J. Gen. Virol.* 81(2):471–79
2. Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, et al. 2006. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLOS Med.* 3(7):e263
3. Powers AM, Logue CH. 2007. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J. Gen. Virol.* 88(9):2363–77
4. Chretien J-P, Anyamba A, Bedno SA, Breiman RF, Sang R, et al. 2007. Drought-associated chikungunya emergence along coastal East Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76(3):405–7
5. Gérardin P, Guernier V, Perrau J, Fianu A, Le Roux K, et al. 2008. Estimating Chikungunya prevalence in La Réunion Island outbreak by serosurveys: two methods for two critical times of the epidemic. *BMC Infect. Dis.* 8:99
6. Jossier L, Paquet C, Zehgnoun A, Caillere N, Le Tertre A, et al. 2006. Chikungunya disease outbreak, Reunion Island. *Emerg. Infect. Dis.* 12(12):1994–95
7. Arankalle VA, Shrivastava S, Cherian S, Gunjekar RS, Walimbe AM, et al. 2007. Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963–2006) with special reference to the 2005–2006 explosive epidemic. *J. Gen. Virol.* 88(7):1967–76
8. Angelini P, Macini P, Finarelli AC, Pol C, Venturelli C, et al. 2008. Chikungunya epidemic outbreak in Emilia-Romagna (Italy) during summer 2007. *Parasitologia* 50(1–2):97–98
9. Delisle E, Rousseau C, Broche B, Leparac-Goffart I, L'Ambert G, et al. 2015. Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Eurosurveillance* 20(17):21108
10. Cassadou S, Boucau S, Petit-Sinturel M, Huc P, Leparac-Goffart I, Ledrans M. 2014. Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. *Eurosurveillance* 19(13):20752

11. Van Bortel W, Dorleans F, Rosine J, Blateau A, Rousset D, et al. 2014. Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe. *Eurosurveillance* 19(13):20759
12. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. 2007. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 3(12):e201
13. Volk SM, Chen R, Tsetsarkin KA, Adams AP, Garcia TI, et al. 2010. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *J. Virol.* 84(13):6497–504
14. Weaver SC, Chen R, Diallo M. 2020. Chikungunya virus: role of vectors in emergence from enzootic cycles. *Annu. Rev. Entomol.* 65:313–32
15. Azar SR, Campos RK, Bergren NA, Camargos VN, Rossi SL. 2020. Epidemic alphaviruses: ecology, emergence and outbreaks. *Microorganisms* 8(8):1167
16. Chen R, Mukhopadhyay S, Merits A, Bolling B, Nasar F, et al. 2018. ICTV virus taxonomy profile: *Togaviridae*. *J. Gen. Virol.* 99(6):761–62
17. Suhrbier A. 2019. Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions. *Nat. Rev. Rheumatol.* 15(10):597–611
18. Khan AH, Morita K, Parquet MDC, Hasebe F, Mathenge EGM, Igarashi A. 2002. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J. Gen. Virol.* 83(12):3075–84
19. Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C. 2009. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology* 393(2):183–97
20. Voss JE, Vaney MC, Duquerroy S, Vonrhein C, Girard-Blanc C, et al. 2010. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 468(7324):709–12
21. Ahola T, Merits A. 2016. Functions of chikungunya virus nonstructural proteins. In *Chikungunya Virus: Advances in Biology, Pathogenesis, and Treatment*, ed. CM Okeoma, pp. 75–98. Cham, Switz.: Springer
22. Okeoma CM, ed. 2016. *Chikungunya Virus: Advances in Biology, Pathogenesis, and Treatment*. Cham, Switz.: Springer
23. Thaa B, Biasiotto R, Eng K, Neuvonen M, Gotte B, et al. 2015. Differential phosphatidylinositol-3-kinase-Akt-mTOR activation by Semliki Forest and chikungunya viruses is dependent on nsP3 and connected to replication complex internalization. *J. Virol.* 89(22):11420–37
24. Soonsawad P, Xing L, Milla E, Espinoza JM, Kawano M, et al. 2010. Structural evidence of glycoprotein assembly in cellular membrane compartments prior to alphavirus budding. *J. Virol.* 84(21):11145–51
25. Rall GF, Racaniello VR, Skalka AM, Flint J. 2015. *Principles of Virology*, Vol. 2: *Pathogenesis & Control*. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol.
26. Abraham R, Mudaliar P, Padmanabhan A, Sreekumar E. 2013. Induction of cytopathogenicity in human glioblastoma cells by chikungunya virus. *PLoS ONE* 8(9):e75854
27. Abraham R, Singh S, Nair SR, Hulyalkar NV, Surendran A, et al. 2017. Nucleophosmin (NPM1)/B23 in the proteome of human astrocytic cells restricts chikungunya virus replication. *J. Proteome Res.* 16(11):4144–55
28. Abere B, Wikan N, Ubol S, Auewarakul P, Paamee A, et al. 2012. Proteomic analysis of chikungunya virus infected microglial cells. *PLoS ONE* 7(4):e34800
29. Sourisseau M, Schilte C, Casartelli N, Trouillet C, Guivel-Benhassine F, et al. 2007. Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog.* 3(6):e89
30. Wikan N, Sagoonwatanyoo P, Ubol S, Yoksan S, Smith DR. 2012. Chikungunya virus infection of cell lines: analysis of the East, Central and South African lineage. *PLoS ONE* 7(1):e31102
31. Briant L, Desprès P, Choumet V, Missé D. 2014. Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. *Virology* 464–465:26–32
32. Bernard E, Hamel R, Neyret A, Ekchariyawat P, Molès J-P, et al. 2015. Human keratinocytes restrict chikungunya virus replication at a post-fusion step. *Virology* 476:1–10
33. Ekchariyawat P, Hamel R, Bernard E, Wichit S, Surasombattana P, et al. 2015. Inflammasome signaling pathways exert antiviral effect against Chikungunya virus in human dermal fibroblasts. *Infect. Genet. Evol.* 32:401–8

34. Young AR, Locke MC, Cook LE, Hiller BE, Zhang R, et al. 2019. Dermal and muscle fibroblasts and skeletal myofibers survive chikungunya virus infection and harbor persistent RNA. *PLoS Pathog.* 15(8):e1007993
35. Wichit S, Diop F, Hamel R, Talignani L, Ferraris P, et al. 2017. *Aedes Aegypti* saliva enhances chikungunya virus replication in human skin fibroblasts via inhibition of the type I interferon signaling pathway. *Infect. Genet. Evol.* 55:68–70
36. Broeckel R, Haese N, Messaoudi I, Streblow D. 2015. Nonhuman primate models of Chikungunya virus infection and disease (CHIKV NHP model). *Pathogens* 4(3):662–81
37. Couderc T, Chrétien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M, et al. 2008. A mouse model for Chikungunya: Young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathog.* 4(2):e29
38. Hoarau J-J, Bandjee M-CJ, Trotot PK, Das T, Li-Pat-Yuen G, et al. 2010. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. *J. Immunol.* 184(10):5914–27
39. Phuklia W, Kasisith J, Modhiran N, Rodpai E, Thannagith M, et al. 2013. Osteoclastogenesis induced by CHIKV-infected fibroblast-like synoviocytes: a possible interplay between synoviocytes and monocytes/macrophages in CHIKV-induced arthralgia/arthritis. *Virus Res.* 177(2):179–88
40. Roy E, Shi W, Duan B, Reid SP. 2020. Chikungunya virus infection impairs the function of osteogenic cells. *mSphere* 5(3):e00347–20
41. Ozden S, Huerre M, Riviere J-P, Coffey LL, Afonso PV, et al. 2007. Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection. *PLoS ONE* 2(6):e527
42. Lohachanakul J, Phuklia W, Thannagith M, Thongsakulprasert T, Smith DR, Ubol S. 2015. Differences in response of primary human myoblasts to infection with recent epidemic strains of Chikungunya virus isolated from patients with and without myalgia: viral factor in CHIKV-induced myalgia. *J. Med. Virol.* 87(5):733–39
43. Roberts GC, Zothner C, Remenyi R, Merits A, Stonehouse NJ, Harris M. 2017. Evaluation of a range of mammalian and mosquito cell lines for use in Chikungunya virus research. *Sci. Rep.* 7(1):14641
44. Lentscher AJ, McCarthy MK, May NA, Davenport BJ, Montgomery SA, et al. 2020. Chikungunya virus replication in skeletal muscle cells is required for disease development. *J. Clin. Invest.* 130(3):1466–78
45. Rohatgi A, Corbo JC, Monte K, Higgs S, Vanlandingham DL, et al. 2014. Infection of myofibers contributes to increased pathogenicity during infection with an epidemic strain of chikungunya virus. *J. Virol.* 88(5):2414–25
46. Nair S, Poddar S, Shimak RM, Diamond MS. 2017. Interferon regulatory factor 1 protects against chikungunya virus-induced immunopathology by restricting infection in muscle cells. *J. Virol.* 91(22):e01419–17
47. Herrero LJ, Nelson M, Srikiatkachorn A, Gu R, Anantapreecha S, et al. 2011. Critical role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in Ross River virus-induced arthritis and myositis. *PNAS* 108(29):12048–53
48. Zaid A, Tharmarajah K, Mostafavi H, Freitas JR, Sheng K-C, et al. 2020. Modulation of monocyte-driven myositis in alphavirus infection reveals a role for CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> macrophages in tissue repair. *mBio* 11(2):e03353–19
49. Chow A, Her Z, Ong EKS, Chen J, Dimatatac F, et al. 2011. Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J. Infect. Dis.* 203(2):149–57
50. Chen W, Foo S-S, Rulli NE, Taylor A, Sheng K-C, et al. 2014. Arthritogenic alphaviral infection perturbs osteoblast function and triggers pathologic bone loss. *PNAS* 111(16):6040–45
51. Borgherini G, Poubeau P, Jossaume A, Gouix A, Cotte L, et al. 2008. Persistent arthralgia associated with chikungunya virus: a study of 88 adult patients on Reunion Island. *Clin. Infect. Dis.* 47(4):469–75
52. Davenport BJ, Bullock C, McCarthy MK, Hawman DW, Murphy KM, et al. 2020. Chikungunya virus evades antiviral CD8<sup>+</sup> T cell responses to establish persistent infection in joint-associated tissues. *J. Virol.* 94(9):e02036–19

53. Hawman DW, Stoermer KA, Montgomery SA, Pal P, Oko L, et al. 2013. Chronic joint disease caused by persistent Chikungunya virus infection is controlled by the adaptive immune response. *J. Virol.* 87(24):13878–88
54. Labadie K, Larcher T, Joubert C, Mannioui A, Delache B, et al. 2010. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *J. Clin. Invest.* 120(3):894–906
55. Couderc T, Lecuit M. 2015. Chikungunya virus pathogenesis: from bedside to bench. *Antivir. Res.* 121:120–31
56. Wilson JAC, Prow NA, Schroder WA, Ellis JJ, Cumming HE, et al. 2017. RNA-Seq analysis of chikungunya virus infection and identification of granzyme A as a major promoter of arthritic inflammation. *PLoS Pathog.* 13(2):e1006155
57. Zhang R, Kim AS, Fox JM, Nair S, Basore K, et al. 2018. Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature* 557(7706):570–74
58. Basore K, Kim AS, Nelson CA, Zhang R, Smith BK, et al. 2019. Cryo-EM structure of chikungunya virus in complex with the Mxra8 receptor. *Cell* 177(7):1725–37.e16
59. Song H, Zhao Z, Chai Y, Jin X, Li C, et al. 2019. Molecular basis of arthritogenic alphavirus receptor MXRA8 binding to chikungunya virus envelope protein. *Cell* 177(7):1714–24.e12
60. Zhang R, Earnest JT, Kim AS, Winkler ES, Desai P, et al. 2019. Expression of the Mxra8 receptor promotes alphavirus infection and pathogenesis in mice and *Drosophila*. *Cell Rep.* 28(10):2647–58.e5
61. Powell LA, Miller A, Fox JM, Kose N, Klöse T, et al. 2020. Human mAbs broadly protect against arthritogenic alphaviruses by recognizing conserved elements of the Mxra8 receptor-binding site. *Cell Host Microbe* 28(5):699–711.e7
62. McAllister N, Liu Y, Silva LM, Lentscher AJ, Chai W, et al. 2020. Chikungunya virus strains from each genetic clade bind sulfated glycosaminoglycans as attachment factors. *J. Virol.* 94(24):e01500-20
63. Sahoo B, Chowdary TK. 2019. Conformational changes in Chikungunya virus E2 protein upon heparan sulfate receptor binding explain mechanism of E2–E1 dissociation during viral entry. *Biosci. Rep.* 39(6):BSR20191077
64. Meertens L, Hafirassou ML, Couderc T, Bonnet-Madin L, Kril V, et al. 2019. FHL1 is a major host factor for chikungunya virus infection. *Nature* 574(7777):259–63
65. Tanaka A, Tumkosit U, Nakamura S, Motooka D, Kishishita N, et al. 2017. Genome-wide screening uncovers the significance of N-sulfation of heparan sulfate as a host cell factor for chikungunya virus infection. *J. Virol.* 91(13):e00432-17
66. Klimstra WB, Nangle EM, Smith MS, Yurochko AD, Ryman KD. 2003. DC-SIGN and L-SIGN can act as attachment receptors for alphaviruses and distinguish between mosquito cell- and mammalian cell-derived viruses. *J. Virol.* 77(22):12022–32
67. Jemielity S, Wang JJ, Chan YK, Ahmed AA, Li W, et al. 2013. TIM-family proteins promote infection of multiple enveloped viruses through virion-associated phosphatidylserine. *PLoS Pathog.* 9(3):e1003232
68. Moller-Tank S, Maury W. 2014. Phosphatidylserine receptors: enhancers of enveloped virus entry and infection. *Virology* 468–470:565–80
69. Grimley PM, Berezsky IK, Friedman RM. 1968. Cytoplasmic structures associated with an arbovirus infection: loci of viral ribonucleic acid synthesis. *J. Virol.* 2(11):1326–38
70. Salonen A, Ahola T, Kääriäinen L. 2005. Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Membr. Traffick. Viral Replication* 285:139–73
71. Decroly E, Ferron F, Lescar J, Canard B. 2011. Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. *Nat. Rev. Microbiol.* 10(1):51–65
72. Peranen J, Laakkonen P, Hyvonen M, Kaariainen L. 1995. The alphavirus replicase protein nsP1 is membrane-associated and has affinity to endocytic organelles. *Virology* 208(2):610–20
73. Tomar S, Narwal M, Harms E, Smith JL, Kuhn RJ. 2011. Heterologous production, purification and characterization of enzymatically active Sindbis virus nonstructural protein nsP1. *Protein Expr. Purif.* 79(2):277–84
74. Ahola T, Lampio A, Auvinen P, Kaariainen L. 1999. Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. *EMBO J.* 18(11):3164–72
75. Belov GA, Nair V, Hansen BT, Hoyt FH, Fischer ER, Ehrenfeld E. 2012. Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes. *J. Virol.* 86(1):302–12

76. Knoops K, Kikkert M, Worm SH, Zevenhoven-Dobbe JC, van der Meer Y, et al. 2008. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol.* 6(9):e226
77. Kopck BG, Perkins G, Miller DJ, Ellisman MH, Ahlquist P. 2007. Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. *PLoS Biol.* 5(9):e220
78. Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, Chlanda P, et al. 2012. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog.* 8(12):e1003056
79. Sachse M, Fernández de Castro I, Tenorio R, Risco C. 2019. The viral replication organelles within cells studied by electron microscopy. *Adv. Virus Res.* 105:1–33
80. Snijder EJ, Limpens RWAL, de Wilde AH, de Jong AWM, Zevenhoven-Dobbe JC, et al. 2020. A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: tracking down RNA synthesis. *PLoS Biol.* 18(6):e3000715
81. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, et al. 2009. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* 5(4):365–75
82. Jones R, Bragagnolo G, Arranz R, Reguera J. 2021. Capping pores of alphavirus nsP1 gate membranous viral replication factories. *Nature* 589(7843):615–19
83. Ertel KJ, Benefield D, Castano-Diez D, Pennington JG, Horswill M, et al. 2017. Cryo-electron tomography reveals novel features of a viral RNA replication compartment. *eLife* 6:e25940
84. Unchwaniwala N, Zhan H, Pennington J, Horswill M, den Boon JA, Ahlquist P. 2020. Subdomain cryo-EM structure of nonviral replication protein A crown complex provides mechanistic insights into RNA genome replication. *PNAS* 117(31):18680–91
85. Hellstrom K, Kallio K, Utt A, Quirin T, Jokitalo E, et al. 2017. Partially uncleaved alphavirus replicase forms spherule structures in the presence and absence of RNA template. *J. Virol.* 91(18):e00787–17
86. Kallio K, Hellstrom K, Balistreri G, Spuul P, Jokitalo E, Ahola T. 2013. Template RNA length determines the size of replication complex spherules for Semliki Forest virus. *J. Virol.* 87(16):9125–34
87. Ahola T, Kujala P, Tuittila M, Blom T, Laakkonen P, et al. 2000. Effects of palmitoylation of replicase protein nsP1 on alphavirus infection. *J. Virol.* 74(15):6725–33
88. Gottipati K, Woodson M, Choi KH. 2020. Membrane binding and rearrangement by chikungunya virus capping enzyme nsP1. *Virology* 544:31–41
89. Laakkonen P, Ahola T, Kaariainen L. 1996. The effects of palmitoylation on membrane association of Semliki Forest virus RNA capping enzyme. *J. Biol. Chem.* 271(45):28567–71
90. Bouraï M, Lucas-Hourani M, Gad HH, Drosten C, Jacob Y, et al. 2012. Mapping of Chikungunya virus interactions with host proteins identified nsP2 as a highly connected viral component. *J. Virol.* 86(6):3121–34
91. Cristea IM, Carroll JW, Rout MP, Rice CM, Chait BT, MacDonald MR. 2006. Tracking and elucidating alphavirus-host protein interactions. *J. Biol. Chem.* 281(40):30269–78
92. Neuvonen M, Kazlauskas A, Martikainen M, Hinkkanen A, Ahola T, Saksela K. 2011. SH3 domain-mediated recruitment of host cell amphiphysins by alphavirus nsP3 promotes viral RNA replication. *PLoS Pathog.* 7(11):e1002383
93. Bakhache W, Neyret A, Bernard E, Merits A, Briant L. 2020. Palmitoylated cysteines in chikungunya virus nsP1 are critical for targeting to cholesterol-rich plasma membrane microdomains with functional consequences for viral genome replication. *J. Virol.* 94(10):e02183–19
94. Van Huizen E, McInerney GM. 2020. Activation of the PI3K-AKT pathway by Old World alphaviruses. *Cells* 9(4):970
95. Gorchakov R, Garmashova N, Frolova E, Frolov I. 2008. Different types of nsP3-containing protein complexes in Sindbis virus-infected cells. *J. Virol.* 82(20):10088–101
96. Wang YF, Sawicki SG, Sawicki DL. 1994. Alphavirus nsP3 functions to form replication complexes transcribing negative-strand RNA. *J. Virol.* 68(10):6466–75
97. Fros JJ, Domeradzka NE, Baggen J, Geertsema C, Flipse J, et al. 2012. Chikungunya virus nsP3 blocks stress granule assembly by recruitment of G3BP into cytoplasmic foci. *J. Virol.* 86(19):10873–79
98. Scholte FEM, Tas A, Albulescu IC, Žusinaite E, Merits A, et al. 2015. Stress granule components G3BP1 and G3BP2 play a proviral role early in Chikungunya virus replication. *J. Virol.* 89(8):4457–69

99. Varjak M, Saul S, Arike L, Lulla A, Peil L, Merits A. 2013. Magnetic fractionation and proteomic dissection of cellular organelles occupied by the late replication complexes of Semliki Forest virus. *J. Virol.* 87(18):10295–312
100. Frolova E, Gorchakov R, Garmashova N, Atasheva S, Vergara LA, Frolov I. 2006. Formation of nsP3-specific protein complexes during Sindbis virus replication. *J. Virol.* 80(8):4122–34
101. Meshram CD, Agback P, Shiliaev N, Urakova N, Mobley JA, et al. 2018. Multiple host factors interact with the hypervariable domain of chikungunya virus nsP3 and determine viral replication in cell-specific mode. *J. Virol.* 92(16):e00838-18
102. Onomoto K, Yoneyama M, Fung G, Kato H, Fujita T. 2014. Antiviral innate immunity and stress granule responses. *Trends Immunol.* 35(9):420–28
103. Tourrière H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, et al. 2003. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J. Cell Biol.* 160(6):823–31
104. Kim DY, Reynaud JM, Rasaloukaya A, Akhrymuk I, Mobley JA, et al. 2016. New World and Old World alphaviruses have evolved to exploit different components of stress granules, FXR and G3BP proteins, for assembly of viral replication complexes. *PLoS Pathog.* 12(8):e1005810
105. Götte B, Utt A, Fragkoudis R, Merits A, McInerney GM. 2020. Sensitivity of alphaviruses to G3BP deletion correlates with efficiency of replicase polyprotein processing. *J. Virol.* 94(7):e01681-19
106. Götte B, Panas MD, Hellström K, Liu L, Samreen B, et al. 2019. Separate domains of G3BP promote efficient clustering of alphavirus replication complexes and recruitment of the translation initiation machinery. *PLoS Pathog.* 15(6):e1007842
107. Foy NJ, Akhrymuk M, Akhrymuk I, Atasheva S, Bopda-Waffo A, et al. 2013. Hypervariable domains of nsP3 proteins of New World and Old World alphaviruses mediate formation of distinct, virus-specific protein complexes. *J. Virol.* 87(4):1997–2010
108. Remenyi R, Gao Y, Hughes RE, Curd A, Zothner C, et al. 2018. Persistent replication of a chikungunya virus replicon in human cells is associated with presence of stable cytoplasmic granules containing non-structural protein 3. *J. Virol.* 92(16):e00477-18
109. Jayabalan AK, Adivarahan S, Koppula A, Abraham R, Batish M, et al. 2021. Stress granule formation, disassembly, and composition are regulated by alphavirus ADP-ribosylhydrolase activity. *PNAS* 118(6):e2021719118
110. Mutso M, Morro AM, Smedberg C, Kasvandik S, Aquilimeba M, et al. 2018. Mutation of CD2AP and SH3KBP1 binding motif in alphavirus nsP3 hypervariable domain results in attenuated virus. *Viruses* 10(5):226
111. Lukash T, Agback T, Dominguez F, Shiliaev N, Meshram C, et al. 2020. Structural and functional characterization of host FHL1 protein interaction with hypervariable domain of chikungunya virus nsP3 protein. *J. Virol.* 95(1):e01672-20
112. Remenyi R, Roberts GC, Zothner C, Merits A, Harris M. 2017. SNAP-tagged chikungunya virus replicons improve visualisation of non-structural protein 3 by fluorescence microscopy. *Sci. Rep.* 7:5682
113. Mollieux A, Temirov J, Lee J, Coughlin M, Kanagaraj AP, et al. 2015. Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. *Cell* 163(1):123–33
114. Abraham R, Hauer D, McPherson RL, Utt A, Kirby IT, et al. 2018. ADP-ribosyl-binding and hydrolyase activities of the alphavirus nsP3 macrodomain are critical for initiation of virus replication. *PNAS* 115(44):E10457–66
115. Eckeil L, Krieg S, Butepage M, Lehmann A, Gross A, et al. 2017. The conserved macrodomains of the non-structural proteins of Chikungunya virus and other pathogenic positive strand RNA viruses function as mono-ADP-ribosylhydrolases. *Sci. Rep.* 7:41746
116. Kadmas JL, Beckerle MC. 2004. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5(11):920–31
117. Zheng Q, Zhao Y. 2007. The diverse biofunctions of LIM domain proteins: determined by subcellular localization and protein–protein interaction. *Biol. Cell* 99(9):489–502
118. Cowling BS, McGrath MJ, Nguyen M-A, Cottle DL, Kee AJ, et al. 2008. Identification of FHL1 as a regulator of skeletal muscle mass: implications for human myopathy. *J. Cell Biol.* 183(6):1033–48

119. Domenighetti AA, Chu P-H, Wu T, Sheikh F, Gokhin DS, et al. 2014. Loss of FHL1 induces an age-dependent skeletal muscle myopathy associated with myofibrillar and intermyofibrillar disorganization in mice. *Hum. Mol. Genet.* 23(1):209–25
120. Ng LFP, Chow A, Sun Y-J, Kwek DJC, Lim P-L, et al. 2009. IL-1 $\beta$ , IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. *PLOS ONE* 4(1):e4261
121. Schilte C, Coudere C, Chretien F, Sourisseau M, Gangneux N, et al. 2010. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. *J. Exp. Med.* 207(2):429–42
122. Akhrymuk I, Frolov I, Frolova EI. 2016. Both RIG-I and MDA5 detect alphavirus replication in concentration-dependent mode. *Virology* 487:230–41
123. Olgner D, Scholte FEM, Chiang C, Albuлесcu IC, Nichols C, et al. 2014. Inhibition of dengue and chikungunya virus infections by RIG-I-mediated type I interferon-independent stimulation of the innate antiviral response. *J. Virol.* 88(8):4180–94
124. White LK, Sali T, Alvarado D, Gatti E, Pierre P, et al. 2011. Chikungunya virus induces IPS-1-dependent innate immune activation and protein kinase R-independent translational shutoff. *J. Virol.* 85(1):606–20
125. Fros JJ, van der Maten E, Vlak JM, Pijlman GP. 2013. The C-terminal domain of chikungunya virus nsP2 independently governs viral RNA replication, cytopathicity, and inhibition of interferon signaling. *J. Virol.* 87(18):10394–400
126. Utt A, Das PK, Varjak M, Lulla V, Lulla A, Merits A. 2015. Mutations conferring a noncytotoxic phenotype on chikungunya virus replicons compromise enzymatic properties of nonstructural protein 2. *J. Virol.* 89(6):3145–62. Erratum. 2016. *J. Virol.* 90(17):8030
127. Akhrymuk I, Kulemzin SV, Frolova EI. 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. *J. Virol.* 86(13):7180–91
128. Fros JJ, Liu WJ, Prow NA, Geertsema C, Ligtenberg M, et al. 2010. Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. *J. Virol.* 84(20):10877–87
129. Goertz GP, McNally KL, Robertson SJ, Best SM, Pijlman GP, Fros JJ. 2018. The methyltransferase-like domain of chikungunya virus nsP2 inhibits the interferon response by promoting the nuclear export of STAT1. *J. Virol.* 92(17):e01008–18
130. Krieg S, Pott F, Ecker L, Verheirstraeten M, Bütepage M, et al. 2020. Mono-ADP-ribosylation by ARTD10 restricts Chikungunya virus replication by interfering with the proteolytic activity of nsP2. bioRxiv 2020.01.07.896977. <https://doi.org/10.1101/2020.01.07.896977>
131. Jupille HJ, Oko L, Stoermer KA, Heise MT, Mahalingam S, et al. 2011. Mutations in nsP1 and PE2 are critical determinants of Ross River virus-induced musculoskeletal inflammatory disease in a mouse model. *Virology* 410(1):216–27
132. Webb LG, Veloz J, Pintado-Silva J, Zhu T, Rangel MV, et al. 2020. Chikungunya virus antagonizes cGAS-STING mediated type-I interferon responses by degrading cGAS. *PLOS Pathog.* 16(10):e100899



## Objectifs de la Thèse

Dans l'introduction de ce manuscrit, ont été abordés les thématiques de déformations membranaires induites par l'infection CHIKV, les organelles de réplifications formées par ce virus et le rôle central de nsP1 dans ces deux processus.

Pour ce qui concerne la formation de filopodes, la protéine nsP1 a été identifiée comme un acteur clé dans la formation de ces protrusions observées également dans les cellules infectées par le CHIKV. Malgré une description ancienne de ce phénotype, plusieurs questions essentielles restent sans réponse à l'heure de cette thèse : Quels sont les facteurs cellulaires impliqués dans ce type de déformation membranaire ? Ces déformations membranaires constituent elles un avantage évolutif pour le virus et si oui de quelle nature ?

Dans le cadre de la formation des compartiments de répllication, nsP1 vient d'être décrit comme un élément structurel des sphérules dans lesquelles la protéine est observés sous la forme d'un dodécamère situé dans le col de ces derniers. Notre compréhension de ce processus viral est encore largement incomplète. Il est légitime de se demander si ces deux types de déformations membranaires reposent sur un même mécanisme et des interactions nsP1 avec les facteurs de l'hôte identiques.

Les objectifs de ces travaux de thèse sont les suivants :

- Quelles interactions hôtes-pathogènes permettent le remodelage membranaire induit par nsP1 ?
- Ces mécanismes contribuent à la répllication virale dont la biogénèse des sphérules est une étape absolument nécessaire ?

# Chapitre 2. Résultats

## 1. Identification du rôle de l'axe de signalisation Rac1-PAK1-Arp2 dans la formation des filopodes par nsP1 de CHIKV

### 1.1. Sommaire de l'article

La protéine nsP1 de CHIKV est un acteur essentiel de la déformation membranaire. Son expression isolée induit des déformations de type FLP similaires à celles observées dans la cellule infectée. Ce phénotype est conservé chez les d'Alphavirus SFV et SINV. Il est lié à l'adressage membranaire de nsP1 par sa palmitoylation. De plus la formation de ces protrusions semble corrélée à une perturbation du cytosquelette d'actine.

Malgré ces observations plusieurs questions restent en suspens. Quels sont les processus cellulaires détournés pour permettre ce type de remodelage ? Les voies canoniques de formation des filopodes sont-elles mobilisées dans la formation de ces protrusions ? La formation de ces filopodes a-t-elle des conséquences fonctionnelles au cours du cycle viral ?

Dans cette première étude, nous avons tout d'abord caractérisé les protrusions formées par l'expression de nsP1 dans les cellules humaines. Ces extensions hautement dynamiques, caractérisées par la présence de filaments d'actine sont également positives pour VASP, Eps8 et à la Fascine, marqueurs canoniques des filopodes cellulaires. A l'aide d'inhibiteurs chimiques et de siRNA nous avons investigué la contribution des trois principales Rho GTPases Rac1, Cdc42 et RhoA connues pour participer au remodelage du cytosquelette d'actine. Nos résultats ont permis d'identifier que Rac1 et ses effecteurs Pak1 et Arp2 participant au complexe de polymérisation de l'actine, sont essentiels au remodelage de la membrane plasmique par nsP1. De façon intéressante, l'axe de signalisation Rac1-Pak1-Arp2 est également essentiel à la réplication virale. Ces résultats établissent donc un parallèle entre les mécanismes de déformation membranaire par nsP1 et la réplication du génome des

*Alphavirus*, processus dépendant de la création de sphérules par déformation membranaire. En prolongement de cette étude, nous posons également la question du rôle fonctionnel des extensions cellulaires induites par nsP1 dans l'infection et sa propagation en culture.

## 1.2. Article

**Rac1-PAK1-Arp2/3 signaling axis regulates CHIKV nsP1-induced filopodia and optimal viral genome replication**

Olivier Aïqui-Reboul-Paviet<sup>#</sup>, William Bakhache<sup>##</sup>, Eric Bernard, Lise Holstein, Aymeric Neyret, Laurence Briant<sup>§</sup>.

RNA Viruses and Metabolism Team, IRIM-CNRS UMR9004, Montpellier, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier, France

<sup>#</sup> Contributed equally to the work

<sup>§</sup> Corresponding author

\*Current address: Quantitative Virology and Evolution Unit, NIH-NIAID, Bethesda, MD

### **Author email:**

olivier.aiqui@irim.cnrs.fr

william.bakhache@nih.gov

eric.bernard@irim.cnrs.fr

aymeric.neyret@irim.cnrs.fr

lise.holsteyn@irim.cnrs.fr

laurence.briant@irim.cnrs.fr

### **Abstract**

Alphavirus infection induces dramatic remodelling of host cellular membranes resulting in the production of filopodia-like extensions. This phenotype has been historically partly assigned to the

replication protein nsP1 which, when expressed alone, has the capacity to bind and remodel cellular membranes. While frequently reported, the molecular mechanisms governing the induction of nsP1 induced filopodia remains poorly understood. Using mammalian epithelial cells and the Chikungunya virus (CHIKV) as models, we confirm the capacity of nsP1 expressed as an isolated protein to promote the formation of highly dynamic lamellipodia-like events and thin cell extensions containing actin fibers, very similar to that observed in infected cells. In an attempt to question the cellular mechanisms hijacked during this process, we identified the critical contribution of the Rac1 GTPase and its downstream effectors PAK1 and Arp2. Interestingly, we found that an intact Rac1-Pak1-Arp2 signaling axis is also required for optimal viral genome replication. Our results therefore identify Rac1-Pak1-Arp2 as a signaling node essential for CHIKV life cycle and suggest that nsP1-induced reshaping of the plasma membrane participates in the production of a functional replicative system in infected cells.

## **Introduction**

RNA viruses reconfigure and manipulate the cytoskeleton network of their host to optimize the different stages of the viral life cycle. This host-pathogen interaction specifically assists entry of incoming viral particles into their target cells by endocytosis or micropinocytosis. It also promotes genome replication, assembly and egress of progeny. Finally, it critically determines cell-to-cell contacts facilitating transmission of cellular and viral components while allowing immune evasion of viral particles due to low exposure to the extracellular space (reviewed in (1)). This reconfiguration involves a large repertoire of viral proteins and cellular pathways and often results in the formation of highly dynamic actin-rich plasma-membrane processes referred to as filopodia and lamellipodia. Filopodia consist of 10-100  $\mu\text{m}$  long finger-like plasma-membrane extensions containing tightly packed actin filaments, cross-linked by Fascin into a stiff structure. They extend at the leading edge of migratory cells, supposed to promote cell motility and adhesion, and to function as sensory probes or in the establishment of cell to cell contacts (2). Their highly dynamic protrusion and retraction is determined by the balance between actin polymerization at the filament tip and retrograde flow at

the base of filopodium (3, 4). Lamellipodia are sheet-like, broad (typically 1–5  $\mu\text{m}$ ) and thin (100–300 nm) membrane protrusions containing a network of branching actin filaments, essential for cell migration. Both extension types are critically regulated by small guanosine triphosphatases (GTPases) of the Rho superfamily involved in actin dynamics (5). These small monomeric proteins, that include at least 20 members, fluctuate between inactive and active state depending on binding either to GDP or to GTP (6). Active Rho GTPases then recruit and activate downstream effector molecules to the plasma membrane resulting in stimulation of a variety of cell signaling pathways (7). RhoA, Cdc42 and Rac1 are the best characterized GTPases contributing in actin organization during membrane reshaping. RhoA activation cascade involves the downstream ROCK kinase to regulate actin polymerization into stress fiber and focal adhesion but is also active at the front of lamellipodia (8, 9). Rac1 and Cdc42 regulate comparable downstream signaling events resulting in activation of the actin-related protein 2/3 (ARP2/3) complex via different/common effectors (e.g. N-WASP for Cdc42; WAVE complex for Rac1; IRSp53 for Rac1 and Cdc42), or instead promoting actin turnover via interaction with the serine/threonine kinase PAK1 (p21-activated kinase) (10). Functionally, Cdc42 and associated signaling is considered as the main mediator of filopodium extension, while Rac1 and Cdc42 both control pathways improving actin polymerization on the periphery of the cell producing membrane ruffles and lamellipodia (5, 11). Nevertheless, filopodia can form in absence of Cdc42 and protrude from growing lamellipodia (3, 12).

As with other viruses, Alphavirus dramatically reshape the cytoskeleton of their host (13–15). This family of mosquito-borne viruses includes the Chikungunya virus (CHIKV) that rapidly spread in the mid 2000's, illustrating the impact these viruses may have on human health and economy. CHIKV is transmitted through the bite of infected *Aedes* sp. mosquitoes. In humans, infection results in febrile illness with invalidating joint pain that can last for months (16, 17). At the cellular level, CHIKV infection is initiated by the intracytoplasmic release of its single-stranded, positive sense RNA genome of approximately 12 kb in length. This genome is separated into two ORFs encoding for four nonstructural

proteins (nsP1, nsP2, nsP3 and nsP4), two envelope glycoproteins (E1 and E2), one capsid protein (C), and two peptides (E3 and 6K) (18). Translation of the 5' ORF results in the accumulation of two nonstructural polyproteins P123 and P1234 which are sequentially processed by the viral nsP2 protease to produce the viral enzymes: nsP1, the viral methyl/guanylyl transferase involved in RNA capping; nsP2 that also displays helicase and NTPase activities; nsP3, mainly involved in interaction with cellular cofactors, and nsP4, the viral RNA-dependent RNA polymerase that catalyzes the synthesis of viral RNAs (19–21). These mature nonstructural proteins (nsPs) play canonical functions to form the viral replicase, an essential unit for viral genome replication, located in the cytoplasmic face of membranous replication organelles (22–25). These membranous compartments, referred to as spherules, are assembled by deformation of the plasma membrane. They are identified as specialized sites of genome replication, shielding the double stranded RNA used as replication intermediate from the host innate immune defenses (26). In these organelles, nsP1 assembles into a dodecameric ring forming a pore connecting the spherule to the cytoplasm (24), that anchors the replication complex to the cell membranes and actively caps the 5'-terminus of nascent RNA extruded from this compartment (24, 27–29). Notably, when expressed separately in mammalian cells, nsP1 is responsible for dramatic cellular membrane reshaping resulting in the formation of filopodia-like protrusions (14). nsP1 was early characterized as a peripheral membrane protein (28), capable to assemble in a contiguous coat on liposomes and induce certain structural reorganization in membranes (30). Its membrane binding capacity was assigned to a central putative amphipathic helix that determines nsP1 preference for anionic lipids (25, 30–33). nsP1 also contains a stretch of palmitoylated cysteines highly conserved across the Alphavirus genus (14) required for membrane deformations (14, 15, 33, 34). In infected cells, this motif critically determines the anchoring of nsP1 dodecameric ring to the cell membranes (23, 35) and controls affinity of the entire viral replication complex for cholesterol rich microdomains with consequences for genome replication (14, 15, 33, 34, 36). Despite major advances in nsP1 structural organization in the replication complex, the functional importance of nsP1-induced filopodial extensions reported decades ago still remain unknown and associated cellular machineries

have not yet been elucidated. NsP1-associated phenotype therefore remains one of the most enigmatic characteristics of Alphavirus infection.

To fill this gap in knowledge, we investigated in details nsP1-induced cell deformations and questioned the direct contribution of actors of the cytoskeleton regulatory pathway. Our observations define nsP1-induced cell extensions as highly dynamic structures positive for VASP, Eps8 and Fascin filopodia markers. Their biogenesis is directed by the actin cytoskeleton network. Using drug perturbation experiments and genetic invalidation with siRNAs we decipher the direct contribution of Rac1, Cdc42 and RhoA GTPases in nsP1-associated phenotype. Our results identify Rac1 as essential in the biogenesis and dynamics of nsP1-induced membrane deformations. Focusing on Rac1 downstream effectors, we identified Pak1 and the Arp2/3 complex as intermediates in actin cytoskeleton manipulation and membrane remodeling by nsP1. We also report a positive correlation between expression and function of actin regulators involved in nsP1-induced filopodia formation and CHIKV genome replication. Taken together, our data support that CHIKV requires an intact Rac1-PAK1-Arp2 signaling pathway to stimulate actin reorganization and subsequent filopodia formation upon nsP1 expression, a pathway also necessary for optimal genome replication.

## Results

**CHIKV nsP1 induces the formation of highly dynamic filopodia-like extensions depending on conserved palmitoylated cysteines.** . Alphavirus-infected cells are characterized by the formation of cell extensions (37, 38). We first reinvestigated this capacity for CHIKV-infected human epithelial cells. Infection of HeLa cells with the CHIKV LR-OPY1 strain (MOI = 0.1) resulted in dramatic membrane reshaping (Figure 1A). When compared with control cells, cells infected for 16 hrs displayed an elevated number of plasma membrane protrusions evocating lamellipodia and filopodia. The later appeared as thin and long filamentous protrusions that can rarely exceed 10  $\mu$ M in length. Interestingly, immunofluorescence studies revealed the accumulation of nsP1 at the plasma



membrane bordering these extensions (Figure 1A), suggesting that this protein may contribute in virus-induced membrane remodeling. nsP1 signal sometimes overlapped with nsP3 protein fluorescence and dsRNA staining, indicating the presence of CHIKV replication complexes assembled on membranes bordering these extensions, a result reminiscent of our cryo-electron microscopy analysis of CHIKV-infected cells (22). Interestingly, CHIKV-induced plasma membrane reshaping was recapitulated by the transfection of an nsP1 expression plasmid. Dramatic membrane deformations resembling those seen in CHIKV infected cells were visualized in cell expressing the nsP1 protein in its native form (Figure 1B). A similar phenotype was also recapitulated by nsP1 fused with a fluorescent protein either at its C-terminus (nsP1-DsRed) (Figure 1B) or at the N-terminus (GFP-nsP1) (Figure 1C-E) indicating that these fusion proteins retained the property of native nsP1 regarding membrane reshaping. Upon ectopic expression, nsP1 accumulated at the plasma membrane and in discrete intracellular compartments, and resulted in highly dynamic morphologic changes observed in time-lapse video microscopy (Figure 1C). At least two types of events were recorded at the plasma membrane using live confocal microscopy. First, filopodia-like extensions of 2-10  $\mu\text{m}$  in length, rapidly growing from the cell body of the transfected cell toward nsP1-negative cells were observed, resulting within second in extended contacts with the membrane of the neighboring cell (not shown). Besides, we also observed frequent lamellipodia-like membrane ruffling followed by retraction in the cytoplasm of nsP1-expressing cells (Figure 1D). These events resulted in the persistence of thin cell extensions appearing as tightly associated with the substrate (Figure 1D, red arrows). While lamellipodia formation are generally associated with cell motility, no significant modification in cell migration could be observed following nsP1 expression (not shown). Thin extensions and lamellipodia deformations were simultaneously observed from the same cell. Interestingly, filopodia sometimes extended from the lamellipodium (Figure 1D ; white arrows). These protrusions were not static, extending and retracting successively as apparent in time lapse capture of fluorescences (supplementary video 1). These phenotypes were significantly reduced in cells expressing a nsP1 mutant, referred to nsP1AAA, in which the triplet of palmitoylated cysteines at position 418-420 was replaced by alanine (Figure 1E). In these cells,

filopodia number quantified using the FIJI software was dramatically lower than following expression of the wild type nsP1 (Figure 1F). Moreover, the length of the remaining cell extensions observed in these cells was dramatically decreased when compared with the nsP1 condition (Figure 1G). In order to question the conservation of nsP1 phenotype across viral evolution, we repeated these experiments using nsP1 encoded by CHIKV distantly related Alphaviruses. nsP1 encoded by the Sindbis virus (AR339 strain) grouped as an Old World Alphavirus, or by Venezuelan equine encephalitis virus (TC-83 strain), a New World Alphavirus or by Eilat virus (EO329 isolate), an Alphavirus restricted to mosquito cells for replication were cloned in frame with GFP and transfected in HEK293T cells (Figure 2). Twenty four hours after transfection, the cells were imaged with a confocal microscope, showing, as for CHIKV, a dramatic induction of cell protrusions that comprised lamellipodia- and filopodia-like deformations. According to these results, nsP1 capacity to reshape the cell membranes resulting in the formation of highly dynamic filopodia- and lamellipodia-like structures is a common feature of Alphaviruses conserved across evolution, in which palmitoylated cysteines play a critical role.

**nsP1-induced membrane reshaping is mediated by actin cytoskeleton.** Morphological and mechanical changes at the plasma membrane are orchestrated by the coordinated activities of microtubules, actin filaments and stress fibers that comprise the cytoskeleton. Their respective contribution in nsP1-induced membrane reshaping was first questioned by confocal microscopy. Actin was stained by transfection of the LifeAct-TagRFP plasmid expressing a fluorescent peptide staining filamentous actin (F-actin) structures in eukaryotic cells without interfering with actin dynamics (39). When the cells were cotransfected with nsP1, the actin network of the cell was dramatically modified with respect to control cells expressing the GFP protein alone (Figure 3A). Indeed, stress fibers were dramatically decreased and actin appeared as mostly disorganized. By contrast, cortical actin appeared mostly intact beneath the plasma membrane. Interestingly, nsP1 fluorescence was frequently colocalized with actin fluorescence (Figure 3A). Both signals overlapped either in cytoplasmic foci (arrows) or along cytoplasmic filaments detected in the proximity of the plasma membrane. This filamentous colocalization of nsP1 with actin was even more obvious along filopodia-like structures and also in the

form of fibers in lamellipodia-like processes emerging from the cell body of transfected cells. These evidences, therefore suggest an intimate crosstalk between nsP1 expression and the actin cytoskeleton. Contrasting with this result the tubulin network detected with antibodies remained unaffected in nsP1-expressing cells. Moreover, nsP1-induced cell extensions were negative for tubulin staining in immunofluorescence experiments. In light of these observations, actin fluorescence was further tracked in live cells to determine its distribution during the formation of nsP1-induced cell processes. Time lapse series were carried out using cells co-expressing GFP-nsP1 and RFP-LifeAct. Overall, we observed intense actin foci colocalized at the basis of and along membrane protrusions (Figure 3B). The frame at 0 min, the time that cells were transferred to 37°C, shows a representative nsP1-positive filopodia-like protrusion staining positive for actin (white arrows). At 90 sec, a lamellipodia-like structure containing actin filaments in its center formed in the periphery of the cell (green arrows). The different position of the arrowheads shows the dynamics of these virus-induced protrusions. The respective functional contribution of actin filaments and microtubules in nsP1-induced filamentous projections was further evaluated using cytochalasin D, nocodazole or blebbistatin, depolymerization agents acting on actin, microtubules or actomyosin complex assembly into stress fibers respectively. Nontoxic concentrations of drugs were determined and added to the cells 16 hours after transfection with a GFP-nsP1 expression plasmid. In these conditions, cytochalasin D potently reduced the number of cellular extension per cell (Figure 3C and 3D). It resulted in persistence of longer filopodia, supporting an inhibition of de novo cell extensions (Figure 3E). Contrasting with this result, nocodazole only marginally changed the number of cell extension per cell, the number of short filaments remaining intact. Finally, considering that cellular myosins collaborate with actin to control cell extensions (40), we investigated their contribution in nsP1-induced membrane deformations using blebbistatin. In our experimental conditions, drug treatment did not modify the number or the length of nsP1-induced cell extensions (Figure 3C and 3D) thereby rejecting a possible contribution of the acto-myosin complex in nsP1 phenotype.

**Characterization of nsP1-induced cell extensions.** Filopodia are generally characterized as F-actin-rich in which the tightly packed actin filaments are cross-linked by Fascin into a stiff structure (2). These cell extensions also harbor a dense complex of actin-binding proteins at the tip regulating filopodial formation, maintenance and dynamics. This complex is characterized by the actin polymerase VASP (Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein) that accelerate actin filament growth and prevents filament capping (41) and Eps8 (epidermal growth factor receptor kinase substrate 8) that modulates actin dynamics and organization through its localization at the tip of growing filopodia (42). In order to further characterize nsP1-induced cell extensions, we investigated the co-localization of the above mentioned filopodia markers with membrane deformations. Cells were co-transfected to express a non-tagged nsP1 expression plasmid together with GFP-fused Fascin, Eps8, or VASP. Confocal imaging of the cells revealed that Eps8, VASP and Fascin are enriched in nsP1-positive cell extensions (Figure 4). While Fascin is detected along cell extensions, Eps8 protein is heavily concentrated at the tip of cell extensions. Interestingly, this signal colocalized with enriched nsP1 foci in many occasions as attested by the calculation of Pearson correlation coefficient ( $r= 0.643$ ) (Figure 4). VASP was also detected in these processes. However, it was not consistently observed at the growing extremity of these extensions as reported in conventional filopodia (Figure 4). Rather it concentrated at the base of filopodia and was also detected along the cell extension with a profile very similar to fascin fluorescence. Altogether these findings confirm the capacity of CHIKV nsP1 to form highly dynamic actin-rich processes contain canonical filopodia markers but devoid of VASP accumulation at the tip. NsP1 localization at filopodia extremities suggests the contribution of an unconventional assembly mechanism.

**Functional Rac1 GTPase is critical for nsP1-induced cell extension.** Actin cascades necessary for cell extension are primarily triggered by Rho GTPases. Physiologically, Cdc42 (cell division control protein 42) and RhoA (Ras homologue family member) promote the polymerization of actin into linear filaments during filopodia formation. Rac1 is a vital regulator of Arp2/3 actin polymerization complex producing branched actin meshwork necessary for lamellipodia formation. However, RhoA, Rac1 and

Cdc42 signaling branches are tightly interconnected (Figure 5A) (43). We therefore investigated the contribution of these GTPase in nsP1-induced membrane remodeling first taking advantage of pharmacological inhibitors. Transfected cells expressing the GFP-nsP1 protein were treated with NSC23766, ML141 or Y27632 inhibitors that target Rac1, Cdc42 or ROCK (downstream effector of RhoA) respectively. Drugs were added to the cell after 4 hours of transfection to avoid any potential inhibition of nsP1 transgene expression. Absence of drug toxicity was controlled in the culture in parallel experiments (not shown). After another 20 hours in culture, the cells were imaged with a confocal microscope and filopodia were counted and measured in length from stacked signals. Expression of GFP-nsP1 was detected in all condition tested to a level comparable with that observed in mock treated cells (Figure 5B). Counting revealed that the number and length of filopodia formed in the presence of ML141 and Y-27632 was comparable to that assembled in the control condition despite the number of filopodia by cell was slightly more heterogeneous in the presence of Y-27632 (Figure 5B and 5C). By contrast, a significant reduction in filopodia count was observed in cells treated with the Rac1 specific inhibitor NSC23766 that specifically prevents the conversion of the inactive Rac1-GDP to an active Rac1-GTP (44). Filopodia formed from these cells were also shorter than those observed in mock-treated cells (Figure 4D). To confirm the possible regulatory role of Rac1 in nsP1-induced membrane deformation, and avoid any off-target drug effect, the cells were transfected with Rac1 siRNA or nontargeting controls before transfection of the GFP-nsP1 plasmid. Reduced Rac1 expression was controlled by immunoblot (Figure 5E). When processed for confocal microscopy, these cells displayed significantly less membrane extensions as compared to control cells transfected with untargetting siRNA (Figure 5F). As observed in the presence of NSC23766, the remaining extensions were shorter than in control cells (Figure 5H). Finally, we confirmed the requirement for Rac1 activation in nsP1-associated phenotype by co-transfecting nsP1 expression plasmids with plasmids encoding either a Rac1 dominant negative mutant (Rac-N17) or a wild-type Rac1 fused with GFP. Cells expressing the green fluorescence were investigated for cell membrane deformations. As shown in Figure 5I, expression of the Rac1-N17 mutant impaired formation of nsP1-induced cell extensions

compared with cells expressing the wild type Rac1 GTPase. Interestingly a clear colocalization was detected between nsP1 and Rac1 fluorescence at the leading edge of cell extensions. Altogether these results illustrate the requirement for a functional Rac1 protein for the production and growth of actin-containing nsP1-induced filopodia-like extensions.

**Characterization of Rac1 downstream effectors.** In its GTP-bound form, activated Rac1 interacts with specific effectors to activate a multitude of signaling cascades regulating the cytoskeleton dynamic. Specifically, Rac1 effector proteins, including the p21 activating kinase (PAK1), the insulin receptor substrate of 53 kDa (IRS<sub>p53</sub>) and the IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1 (IQGAP), regulate the Arp2/3 actin polymerization complex (45). Rac1 also interacts with and activates the phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (PIP 5-kinase) a pivotal enzyme in the metabolism of phospholipids that regulates actin nucleation by the Arp2/3 complex (46). To decipher which pathway(s) may contribute to nsP1 activity in membrane deformation, Rac1 effectors were targeted with siRNA before nsP1 expression and counting of cell extension. Decreased expression of the targeted protein was controlled by Western blot analysis (Figure 6A). Overall, when the cells were processed for confocal imaging, we observed that nsP1-induced extensions formed less efficiently in cells invalidated for Rac1 effectors as compared with control cells (Figure 6B and 6C). indeed, siRNA against PIP5K1, IRS<sub>p53</sub> and IQGAP mildly reduced the number of nsP1-induced cell extensions per cell. A more pronounced reduction in filopodia number per cell was observed in cells transfected with siRNA against PAK1 (Figure 6C). Regarding the critical role of the Arp2/3 actin polymerization complex in filopodia biogenesis, we finally investigated its contribution in nsP1-associated phenotype. Cells were transfected with siRNA against Arp2 and GFP-nsP1 expression plasmid before confocal microscopy imaging. In these conditions the filopodia number per cell was significantly reduced when compared with control cells. These results therefore identify the Rac1 as pivotal in the formation of nsP1-induced cell extensions. While suggesting a possible redundant contribution of IRS<sub>p53</sub>, PIP5K1 and IQGAP in this phenotype, our observations designate PAK1/Arp2 as major effectors of nsP1-induced membrane deformation.

**Role of Rac1/PAK1/Arp2 pathway in CHIKV genome replication.** Filopodia assembled in cells infected by a variety of viruses from distinct families generally promote virus multiplication through various mechanisms. Having established the contribution of Rac1/PAK1/Arp2 signaling axis in nsP1-induced cell extensions, we questioned its contribution in CHIKV infection. Focusing on Rac1 pivotal role we investigated CHIKV infection in cells maintained in the presence of non toxic concentrations of NSC23766. The cells were preincubated with the drug for 1 hr and then infected with the CHIKV-luciferase reporter virus at a multiplicity of infection (MOI) of 10 plaque forming unit (PFU)/cell for 5 hours. Then, infection was monitored by quantification of CHIKV reporter-encoded luciferase activity in the cell lysates. This experimental design was selected to limit drug toxic effects. In these conditions, CHIKV infection was significantly reduced as compared with the control condition (Figure 7A). Of note, Y27632 and ML-141 also significantly decreased CHIKV infection when added to the cells before the viral challenge. Virus-induced filopodia have been reported to promote viral entry, egress and release, or cell-to-cell spread (47). To further identify the exact step assisted by Rac1 during CHIKV life cycle, we repeated this experiment using different drug addition scheme. Considering that CHIKV entry process is complete beyond 1h after the viral challenge, and progeny viruses are released for further propagation after 6 hrs, we evaluated whether drug activity is maintained when added to the cells between these timepoints. The cells were infected with CHIKV-luciferase reporter virus at a MOI of 1, then the viral inoculum was removed and replaced with fresh medium supplemented with increasing concentrations of NSC23766 for 6 hrs before quantification of CHIKV-encoded luciferase activity. As before, parallel investigations were performed in the presence of Y27632 or ML-141 GTPases inhibitors. For each drug concentration tested, viability of the cell culture was analyzed in parallel. In these conditions Y27632 and ML-141, while slightly reducing CHIKV infection when compared with the mock control condition, did not show any dose-dependent activity (Figure 7B). Contrasting with this observation, NSC23766 exhibited a potent dose-dependent inhibition on CHIKV intracellular replication. It was almost abolished using 75 $\mu$ M NSC23766, a concentration that induced no obvious toxic effect in the culture, and did not reduce CHIKV nsPs expression (Figure 7C), therefore suggesting

Rac1 requirement for intracellular CHIKV replication. This result was further confirmed taking advantage of a CHIKV transreplication system mimicking CHIKV intracellular steps of the viral cycle. The cells were co-transfected with a plasmid encoding the CHIKV nsPs and a pseudogenome template in which the structural proteins are replaced by a luciferase reporter gene (48). Six hours after transfection the medium was supplemented with NSC23766. Quantification of genome replication reflected by luciferase activity in the cell lysate confirmed that NSC2766 treatment results in a dose dependent reduction of CHIKV genome replication (Figure 7D). A final validation of this observation was obtained using cells transfected with Rac1-specific siRNA (siRac1) or a negative control siRNA (siCtrl). After 48 hrs, transfected cells were evaluated for Rac1 expression by immunoblot and then transfected with the CHIKV transreplication system. An 80 % decrease in Rac1 expression resulted in a 70 % decrease CHIKV genome replication when compared with the non-targeting siRNA. To evaluate Rac1 effector requirement for CHIKV genome replication these experiments were repeated considering PAK1 and Arp2 effectors previously identified in nsP1-induced membrane deformation. Activity of the CHIKV transreplication system determined in cells maintained in the presence of non-toxic concentrations of IPA3 or CK-666 using above-described conditions, was significantly decreased as compared with the mock treated condition (Figure 7C). In line with this observation, reduction of PAK1 or Arp2 protein level with siRNA decreased CHIKV genome replication (Fig 7F and 7G). According to these results, PAK1 and Arp2 effectors of Rac1 appear as essential intermediates for CHIKV intracellular replication. Altogether our results indicate that the requirement for a functional Rac1-PAK1-Arp2 axis for CHIKV genome replication step parallels the functional importance of this signaling axis for nsP1-induced membrane reshaping.

## **Discussion**

Alphavirus infection of mammalian cells has been long reported to profoundly reorganize the cell membranes (37, 38). These morphological changes have been documented as long distance extracellular extensions (>10  $\mu\text{m}$ ) staining positive for  $\alpha$ -tubulin and actin, specifically triggered by expression of the E2 envelope glycoprotein (49–51). Besides, shorter tubulin negative filamentous



processes of ~2 to 4  $\mu\text{m}$  long are also detected upon infection. This phenotype is recapitulated by the isolated expression of the viral methyl/guanylyltransferase nsP1 (28). While described decades ago, nsP1-induced cell extensions remain incompletely characterized. The cellular machineries hijacked for their production and functional consequences in Alphavirus life cycle remain poorly known. This study was therefore conceived to fill this gap in knowledge. Considering mammalian epithelial cells as a model, we confirmed that CHIKV nsP1 expressed as an isolated protein drives the formation of highly dynamic lamellipodia-like events and thin cell extensions containing actin fibers, very similar to that observed in infected cells. Our results highlight the critical contribution of actin regulatory signaling pathways in this process. Mainly, we identified the Rac1 GTPase and its downstream effectors PAK1 and Arp2 in the actin nucleator complex as critical players in nsP1-associated phenotype. Interestingly, the same Rac1-PAK1-Arp2 pathway was found critical for genome replication, therefore establishing a positive correlation between nsP1-induced reshaping of the plasma membrane and production of a functional replicative system in infected cells.

The mechanisms used by nsP1 to reshape the cell membrane has been the subject of a constant interest. While nsP1 direct interaction with liposomes was suggested by others to induce the profound reshaping of the lipid bilayer (30), our results rather point at the necessary contribution of actin cytoskeleton in mammalian cells. Indeed, nsP1-induced cell extensions stained positive for actin and for actin-bundling protein fascin and Eps8. On note, these markers differentiate filopodia from tunnelling nanotubes frequently observed in viral infections (52, 53). Nevertheless, we were unable to reproducibly detect the localization of VASP actin polymerase required for actin filament growth, at the tip of nsP1-induced cell projections. This results, reminiscent of observations performed in other viral models (54), suggests that alphavirus infection may enable the production of filopodia-like processes using unconventional mechanisms. Accumulated of nsP1 protein observed at the tip of these projections may be part of this mechanism. This hypothesis remains to be evaluated.

In physiological conditions, filopodia formation is mainly controlled by activation of Cdc42 (3) and RhoA (55) GTPases. Counterintuitively, in our experiments, Cdc42 or RhoA did not significantly contributed to nsP1-associated phenotype. Instead, considering the use of NSC23766, a specific inhibitor of Rac1 activation, and Rac1 siRNA, we observed a significant decrease in nsP1-induced filopodia number and size, therefore establishing the critical contribution of Rac1 in this process. We also identified the serine/threonine kinase PAK1, a well-known Rac1 downstream effector that associates with filamentous actin, and Arp2 in the Arp2/3 complex actin branching complex, as critical players in nsP1-associated phenotype. Rac1 is recognized as a privileged partner of human viruses contributing to morphological changes and filopodia formation in cell infected by various virus families including

Dengue virus, herpes simplex virus, human Immunodeficiency virus (56–59). Mainly, in Alphavirus infection Rac1 and Arp3, another constituent in the Arp2/3 complex, were previously reported to control actin filaments polymerization during late infection to assist the trafficking of the E2 envelope glycoprotein to the cell surface (60). Contrasting with this study involving PIP5K1 $\alpha$  as an intermediate in this pathway, our study did not conclude at the contribution of this lipid kinase in the biogenesis of nsP1-induced filopodia. Rather, it designates PAK1, a key regulator of cell morphology and polarity, as essential to this process. Accordingly, E2 induced late actin reorganization and nsP1-induced cell extensions mobilize distinct signaling pathways.

In physiological conditions this Rac1-dependant signaling axis rather regulates the formation of branched cortical actin structures during membrane ruffling, lamellipodia formation, and assembly of multimolecular focal complexes (5, 9). Nevertheless, Rac1 in cooperation with the Arp2/3 complex has also been involved in filopodia formation through through the convergent actin fibers elongation model (reviewed in (61)). In this model, branched actin network formed in lamellipodia involving the Arp2/3 nucleation complex are further extended by elongation factors resulting in the parallel elongation of converged actin fibers. These parallel filaments are cross-linked by fascin resulting in formation of an actin bundle. Here, consistent with this model, we noticed that nsP1-induced filopodia not only directly protrude from the body of transfected cells, but are frequently projected beyond the leading edge of lamellipodia. Rac1-PAK1 requirement may therefore reflect an original mechanism for nsP1 promotion of filopodia assembly in which these thin extensions emerge and grow from the polarized actin network formed via Arp2/3 at the leading of the lamellipodium.

The exact mechanism by which Rac1 may be recruited and activated to promote filopodia production is unknown. Along this study, Rac1 activation by nsP1 could not be clearly and repeatedly evidenced (results not shown). We and others clearly correlated nsP1 membrane deformation capacity with the presence of a triplet of palmitoylated cysteins in the central part of the protein (13, 36, 62). All nsP1 studied in this work, including that of Eilat virus, an Alphavirus exclusively replicating in mosquito cells promote the formation of membranous cell extensions. These proteins display either one (EILV) or two (SINV, VEEV) cysteine at the corresponding domain location. For CHIKV, palmitoylation critically regulates nsP1 membrane affinity for cholesterol enriched plasma membrane microdomain (36), a location where Rac1 also partitions and both proteins may therefore encounter (36, 63). The GTP/GDP state of Rac1 is modulated by specific guanine nucleotide exchange factors (GEFs) serving as nodes for upstream signals (64). Through associating with membrane-bound Rac1, GEFs convert the inactive guanosine diphosphate (GDP)-bound Rac1 into an active guanosine triphosphate (GTP)-bound state. Whether nsP1 may activate Rac1 upstream activator, or instead behave as a GEF, directly interacting

with Rac1 for manipulation as reported for other viral proteins is unknown (65, 66). Resolving nsP1 interactome may help clarifying the underlying mechanism.

In an attempt to decipher an eventual functional role of nsP1-induced cell extensions, we questioned the contribution of the Rac1-PAK1-Arp2 filopodia-regulating pathway in CHIKV life cycle. We observed that Rac1, Cdc42 and RhoA GTPases are all critical for infection of the cells. However, considering a well-established CHIKV replicon system to access intracellular replication steps, we found that only Rac1 invalidation decreased genome transcription/late translation while having no significant effect on intracellular nsPs expression. We established a similar contribution for PAK1 or Arp2 downstream effectors of Rac1. Altogether our results designate RhoGTPases as CHIKV cofactors with variable contribution to early and intracellular replication steps and point at the critical role of Rac1-PAK1-Arp2 axis in genome replication. While this model contrasts with results of Radoshitzsky and colleagues (60) obtained using BHK-CHIKV-NCT cells stably expressing a noncytotoxic persistently replicating CHIKV mutant in which the requirement for Rac1 signaling is bypassed (67), it corroborates our previous description of the critical requirement of actin dynamics for CHIKV post-entry events (68). Intimate interactions between CHIKV replicase and the actin network have also previously been proposed based on the detection of Alphavirus replication complexes arranged following the direction of actin fibers in infected cells (69, 70), and the presence of high concentrations of actin in purified replication complex samples (71, 72). Beyond, the recent discovery of direct interactions between CHIKV nsP3 and the actin cytoskeleton rearranging protein CD2 associated protein (CD2AP) also support te direct crosstalk of CHIKV replication machinery with actin (73). Nevertheless, deciphering the exact contribution of nsP1-induced filopodia deserves more investigations. The presence of colocalized nsP1, nsP3 and dsRNA and our recent observation of replication spherules at the bordering membrane of these extensions observed herein and (22) may indicate that these cell extensions may offer an extended surface to the assembly of replication complexes. Of note, the SFV palmitoylation-defectice nsP1AAA mutant, with a defect in filopodial extension formation is attenuated in vivo (62). Nevertheless, the intricate relationships highlighted between palmitate-dependent nsP1 affinity for membranes, filopodia induction and virus infectivity represent an hurdle for the elucidation of the role of nsP1-induced filopodial extensions in CHIKV infection and pathogenesis (13, 74). Altogether our results highlighting the parallel contribution of the Rac1/PAK1/Arp2 signaling pathway in nsP1-induced cell membrane deformation and CHIKV intracellular replication opens fresh perspective in understanding the physiological role of sur cell extensions.**Material and Methods**

**Cell culture:** Human epithelial HEK293T cells (ATCC# CRL-3216), HeLa cells (ATCC# CRM-CCL2), BHK21 cells (ATCC# CCL-10) used for propagation and Vero cells (ATCC# CCL-81) used for virus titration were

grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM GlutaMAX, high glucose, Thermo Fisher Scientific) supplemented with penicillin and 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS, Lonza). Cell cultures were maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. In drug experiments, cell viability was measured using Cell Titer 96 Aqueous one solution cell proliferation assay (Promega) according to the manufacturer's protocol.

**Viruses and infection:** The CHIKV-luc reporter virus was produced from the pICRES1 full-length CHIKV genomic clone (LR2006\_OPY1 strain) containing the renilla luciferase marker inserted into nsP3 sequence (67). Virus stocks were produced and tittered using plaque assay as previously reported (36). For infections, the cells (70%–80% confluence) were infected with CHIKV-luc diluted at a MOI of 0.1. After 24 h in culture, the cells were lysed with Passive Lysis Buffer (Promega). Replication was monitored using the Genofax C luciferase assay kit (Yelen Analytics). Luminescence was measured directly from the cell lysate using a Spark 10M fluorometer (Tecan). Values were normalized according to protein content in the sample determined using the BCA Assay (Pierce).

**Plasmids transfection and siRNA knockdown:** The GFP-nsP1 plasmid derived from the CHIKV-LR-OPY1 (75) infectious clone and the GFP-nsP1AAA mutant were generated as reported previously (36). siRNA targeting Rac1 (5'- GAACAGAACUGCUAUUCCUCUAAU), Arp2 (5'- GGGUAACAAUGGGUGGUCUUCUGAU), PAK1 (5'- GGAUGAAGGCCAAAUUGCAGCUGUG), and the nontargeting control siRNA (5'-GAAGAACUGCUAUUCCUCUAAAU) were purchased from Sigma-Aldrich. siRNA against IRSp53 (5'- AUGGGGAAGAAUUACGAGAAGGCAC), IQGAP (5'- GGUUGCAGUACUAUAUUGUAAGCTT) and PIP5K1 (5'- GCCAGGCUAUAGUAAUUAUUACUAT) were from IDT. siRNA and plasmids were transfected using JetPrime reagent according manufacturer recommendations (Polyplus Transfection). Briefly, 4 x 10<sup>5</sup> cells were transfected with 50nM siRNA. siRNA silencing efficiency was validated by immunoblot at 48 h post-transfection using an aliquot of the cells. The remaining cells were plated and infected with CHIKV-luc or transfected with nsP1 expression plasmid for 24 hrs before analysis.

**Drug treatment:** The Rac1 inhibitor NSC23766 (N6-[2-[5-(Diethylamino)pentan-2-ylamino]-6-methyl-4-pyrimidinyl]-2methylquinoline-4,6-diamine), ML-141 (4-[4,5-Dihydro-5-(4-methoxyphenyl)-3-phenyl-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide) an inhibitor of Cdc42, ROCK inhibitor Y27632 (1R,4r)-4-((R)-1-aminoethyl)-N-(pyridin-4-yl)cyclohexanecarboxamide), CK-666 (2-Fluoro-N-[2-(2-methyl-1H-indol-3-yl)ethyl]-benzamide) an inhibitor of the Arp2/3 complex, nocodazole, cytochaladin D and blebbistatin were purchased from Sigma Aldrich. IPA3 was obtained from MedChemExpress.

**Immunofluorescence microscopy and image analysis:** For confocal imaging, cells were grown on glass coverslips, washed with PBS and then fixed with 4% formalin (Sigma Aldrich) for 1 h at room temperature. The cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS and nonspecific signal was blocked with 0.2% bovine serum albumin and 0.05% Tween 20 in PBS before incubation with primary antibodies for 1 h at room temperature. Antibodies used were anti-Rac1 (#ARC03 from Cytoskeleton), anti-PIP5K1 (#67483-1 from Proteintech) mAbs and rabbit polyclonal sera against PAK1 (#A301-260A from Bethyl), Arp2 (#A305-216A-T from Bethyl), IRSp53 (#11087-2-AP from Proteintech), IQGAP (#22167-1-AP from Proteintech). Tubulin was detected using the 9F3 monoclonal antibody (Cell signaling technology). dsRNA was detected using the J2 monoclonal antibody (Scicons). Secondary reagents (anti-mouse and anti-rabbit antibodies conjugated with Alexa488, Alexa594, or Alexa647 (Invitrogen) were added for 1 h at room temperature, and nuclei were stained with 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, dihydrochloride (DAPI) in (Sigma-Aldrich). After final washes, coverslips were mounted with ProLong Gold Antifade mounting media (Thermo Fisher Scientific). Actin was labelled by transfection of RFP-LifeAct plasmid (39) into the cells. Images were acquired by confocal laser scanning microscopy using a Leica SP5-SMD scanning confocal microscope equipped with a 63x, 1.4 numerical aperture Leica Apochromat oil lens at the Montpellier Resources Imaging platform. Image analysis was performed utilizing the ImageJ software and the JACoP plugin.

**Filopodia number Analysis:** Optical sections of cells were imaged at 0.50  $\mu\text{m}$  intervals from the bottom of the cell using a Leica SP5-SMD confocal microscopy system. For each image, 15–20 optical sections were taken, and the max projection of the stack was used for analysis. Filopodia numbers and lengths were determined using the FIJI software. Filopodia were only quantified along the periphery of cells. Filopodia was defined as  $>1 \mu\text{m}$ .

**CHIKV trans-replication assay:** Plasmids encoding nonstructural polyprotein from CHIKV was cotransfected together with the HSPoll-Fluc-Gluc (48) plasmid encoding for replication-competent template RNA of CHIKV containing Firefly and Gaussia luciferase reporter sequences placed under control of genomic and subgenomic promoters respectively. Equal amounts of plasmids were transfected into HEK293T cells. After 24 hrs in culture, cells were washed in PBS and lysed using Passive Lysis Buffer (Promega). Expression of Firefly and Gaussia luciferase was determined using the Genofax A or C reagents and a Spark luminometer (Tecan). Reporter activities were normalized to the protein content in the sample determined using the BCA Assay (Pierce).

**Immunoblotting:** Cells were lysed on ice in 50 mM Tris–HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1% Triton X-100, and protease inhibitor cocktail (Complete; Roche). Lysates were clarified by centrifugation at  $10,000 \times g$  for 30 min and denatured by heating at  $95^\circ\text{C}$  for 5 min. Samples were separated by SDS-PAGE and then transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Hybond, Amersham). Membranes were blocked against nonspecific binding by using 0.5% casein, 0.1% Tween 20 in PBS and incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with primary antibodies against  $\beta$  actin (A3854, Sigma-Aldrich) and anti-nsP1 rabbit polyclonal serum (kindly provided by Pr Andres Merits, University of Tartu, Estonia). After wash steps with PBS containing 0.1% Tween 20, the membranes were probed with HRP-conjugated secondary antibodies for 1h at room temperature. After final washes, the revelation was performed by incubating the membranes with Luminata Forte (Merck). Chemiluminescence was detected using a ChemiDoc (Bio-Rad). Densitometry was performed using the Fiji software (ImageJ).

**Immunofluorescence microscopy and image analysis:** Cells grown on glass coverslips were washed with PBS and then fixed with 4% paraformaldehyde/PBS (Sigma Aldrich) for 10 min. For intracellular labeling, the cells were permeabilized with 0.1% Triton-X100 in PBS and blocked for 30 min with PBS containing 0.2% Bovine Serum Albumin. Incubation with primary antibody was performed for 2 hr. After washes with PBS, secondary reagents were added for 1 hr. DAPI (Sigma-Aldrich) was used to stain the nuclei. After final washes, coverslips were mounted with Prolong Gold antifade mounting media (Thermo Fisher Scientific). Images were acquired using a Leica SP5-SMD scanning confocal microscope equipped with a 63×, 1.4 numerical aperture Leica Apochromat oil lens at the Montpellier Resources Imaging platform. Image analysis was performed utilizing Fiji ImageJ and the JACoP plugin. 3D reconstruction was performed by Imaris software.

**Statistical analysis:** All of the analyses (unpaired Student's t-test) were performed using GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software Inc.). \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

**Acknowledgments:** This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-18-CE11-0026-01). OAP was supported by the University of Montpellier with a CBS2 doctoral school grant and by the Fondation pour la Recherche Médicale. WB was funded by Montpellier Méditerranée Infections, Infectiopole Sud Foundation. We are grateful to Cécile Gauthier-Rouvière, and Stéphane Bodin (CRBM, Montpellier, France), Andres Merits (University of Tartu, Estonia) and Andrea Disanza (IFOM Foundation, Institute FIRC of Molecular Oncology, Milan, Italy) for reagents and helpful discussions and to the Montpellier RIO Imaging platform staff for technical assistance.

**Authors contribution:** Conceptualization: LB; Methodology: LB, WB; Investigations: OAP, WB, EB, LH, AN; Supervision: LB; Writing original draft: LB, WB, OAP. Funding acquisition: LB.

**Financial disclosure statement:** The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

## References

1. Taylor MP, Koyuncu OO, Enquist LW. 2011. Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nat Rev Microbiol* 9:427–439.
2. Leijnse N, Oddershede LB, Bendix PM. 2015. Helical buckling of actin inside filopodia generates traction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:136–141.
3. Mattila PK, Lappalainen P. 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:446–454.
4. Mallavarapu A, Mitchison T. 1999. Regulated Actin Cytoskeleton Assembly at Filopodium Tips Controls Their Extension and Retraction. *Journal of Cell Biology* 146:1097–1106.
5. Nobes CD, Hall A. 1995. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81:53–62.
6. Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjano IM. 2007. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* 29:356–370.
7. Heasman SJ, Ridley AJ. 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:690–701.
8. Ridley AJ. 2006. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in Cell Biology* 16:522–529.
9. Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509–514.
10. Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:6181–6186.
11. Kurokawa K, Itoh RE, Yoshizaki H, Nakamura YOT, Matsuda M. 2004. Coactivation of Rac1 and Cdc42 at Lamellipodia and Membrane Ruffles Induced by Epidermal Growth Factor. *MBoC* 15:1003–1010.
12. Czuchra A, Wu X, Meyer H, van Hengel J, Schroeder T, Geffers R, Rottner K, Brakebusch C. 2005. Cdc42 Is Not Essential for Filopodium Formation, Directed Migration, Cell Polarization, and Mitosis in Fibroblastoid Cells. *MBoC* 16:4473–4484.
13. Laakkonen P, Auvinen P, Kujala P, Kaariainen L. 1998. Alphavirus replicase protein NSP1 induces filopodia and rearrangement of actin filaments. *J Virol* 72:10265–9.
14. Ahola T, Kujala P, Tuittila M, Blom T, Laakkonen P. 2000. Effects of Palmitoylation of Replicase Protein nsP1 on Alphavirus Infection. *Journal of Virology* 74:6725–33.



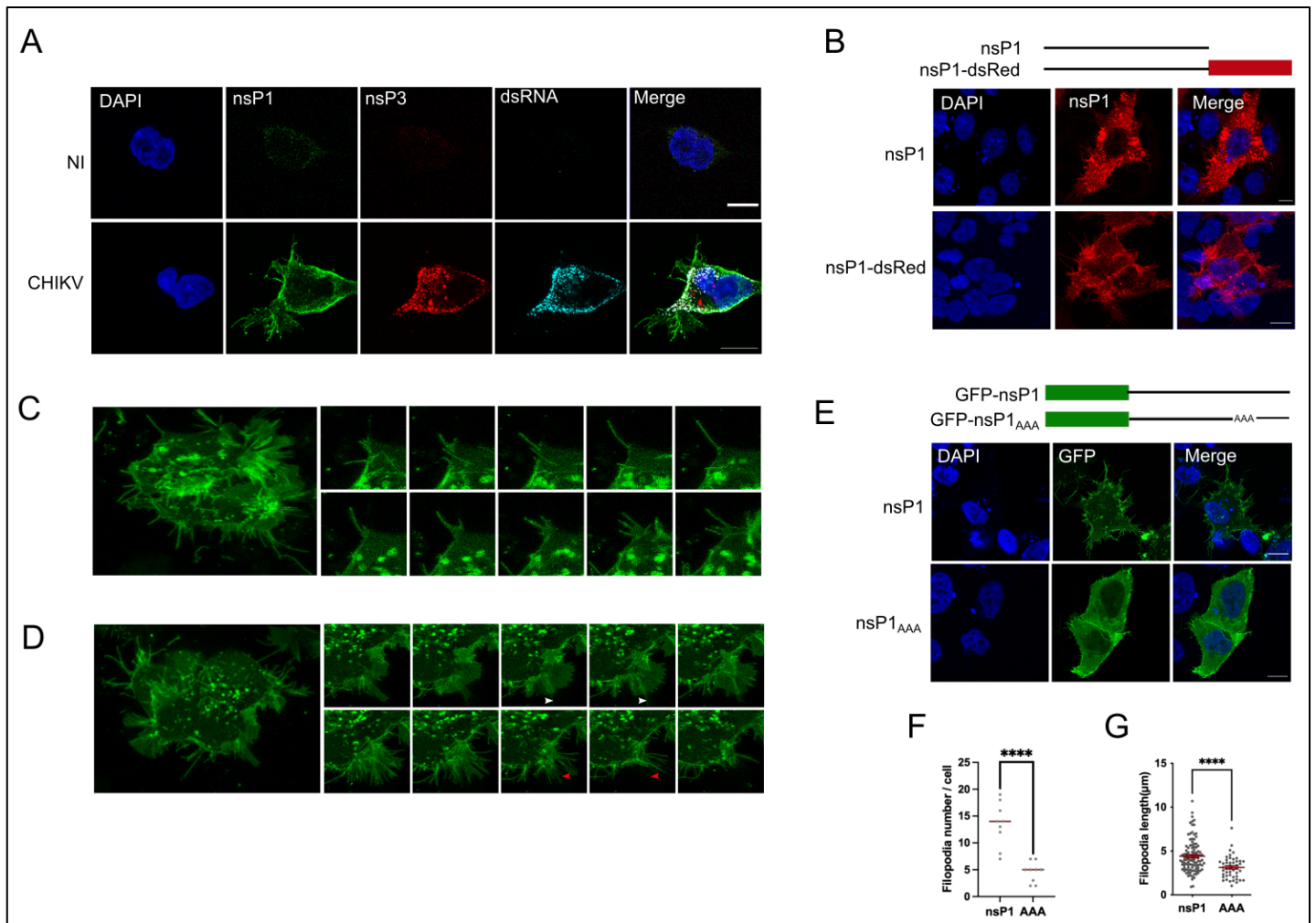
15. Zusinaite E, Tints K, Kiiver K, Spuul P, Karo-Astover L, Merits A, Sarand I. 2007. Mutations at the palmitoylation site of non-structural protein nsP1 of Semliki Forest virus attenuate virus replication and cause accumulation of compensatory mutations. *J Gen Virol* 88:1977–85.
16. Burt FJ, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, Kohl A, Rudd PA, Taylor A, Herrero LJ, Zaid A, Ng LFP, Mahalingam S. 2017. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect Dis* 17:e107–e117.
17. Zaid A, Burt FJ, Liu X, Poo YS, Zandi K, Suhrbier A, Weaver SC, Teixeira MM, Mahalingam S. 2021. Arthritogenic alphaviruses: epidemiological and clinical perspective on emerging arboviruses. *The Lancet Infectious Diseases* 21:e123–e133.
18. Khan AH, Morita K, Parquet MDC, Hasebe F, Mathenge EGM, Igarashi A. 2002. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J Gen Virol* 83:3075–3084.
19. Strauss JH, Strauss EG. 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev* 58:491–562.
20. Lulla A, Lulla V, Tints K, Ahola T, Merits A. 2006. Molecular determinants of substrate specificity for Semliki Forest virus nonstructural protease. *J Virol* 80:5413–5422.
21. Kril V, Aiqui-Reboul-Paviet O, Briant L, Amara A. 2021. New Insights into Chikungunya Virus Infection and Pathogenesis. *Annual Review of Virology*.
22. Girard J, Le-Bihan O, Lai-Kee-Him J, Girleanu M, Bernard E, Castellarin C, Neyret A, Spehner D, Holy X, Favier A-L, Briant L, Bron P. 2023. In situ characterization of late Chikungunya virus replication organelle. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2023.02.25.530016>.
23. Tan YB, Chmielewski D, Law MCY, Zhang K, He Y, Chen M, Jin J, Luo D. 2022. Molecular architecture of the Chikungunya virus replication complex. *Sci Adv* 8:eadd2536.
24. Jones R, Bragagnolo G, Arranz R, Reguera J. 2020. Capping pores of alphavirus nsP1 gate membranous viral replication factories. *Nature*.
25. Laurent T, Kumar P, Liese S, Zare F, Jonasson M, Carlson A, Carlson L-A. 2022. Architecture of the chikungunya virus replication organelle. *eLife* 11:e83042.
26. Paul D, Bartenschlager R. 2013. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World J Virol* 2:32–48.
27. Ahola T, Kääriäinen L. 1995. Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:507–511.
28. Peranen J, Laakkonen P, Hyvonen M, Kaariainen L. 1995. The alphavirus replicase protein nsP1 is membrane-associated and has affinity to endocytic organelles. *Virology* 208:610–20.
29. Zhang K, Law Y-S, Law MCY, Tan YB, Wirawan M, Luo D. 2021. Structural insights into viral RNA capping and plasma membrane targeting by Chikungunya virus nonstructural protein 1. *Cell Host Microbe* 29:757-764.e3.

30. Gottipati K, Woodson M, Choi KH. 2020. Membrane binding and rearrangement by chikungunya virus capping enzyme nsP1. *Virology* 544:31–41.
31. Lampio A, Kilpelainen I, Pesonen S, Karhi K, Auvinen P, Somerharju P, Kaariainen L. 2000. Membrane binding mechanism of an RNA virus-capping enzyme. *J Biol Chem* 275:37853–9.
32. Ahola T, Lampio A, Auvinen P, Kaariainen L. 1999. Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. *EMBO J* 18:3164–72.
33. Spuul P, Salonen A, Merits A, Jokitalo E, Kaariainen L, Ahola T. 2007. Role of the amphipathic peptide of Semliki forest virus replicase protein nsP1 in membrane association and virus replication. *J Virol* 81:872–83.
34. Kallio K, Hellstrom K, Jokitalo E, Ahola T. 2015. RNA Replication and Membrane Modification Require the Same Functions of Alphavirus Nonstructural Proteins. *J Virol* 90:1687–92.
35. Jones R, Bragagnolo G, Arranz R, Reguera J. 2020. Capping pores of alphavirus nsP1 gate membranous viral replication factories. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-020-3036-8>.
36. Bakhache W, Neyret A, Bernard E, Merits A, Briant L. 2020. Palmitoylated Cysteines in Chikungunya Virus nsP1 Are Critical for Targeting to Cholesterol-Rich Plasma Membrane Microdomains with Functional Consequences for Viral Genome Replication. *Journal of Virology* 94.
37. Birdwell CR, Strauss EG, Strauss JH. 1973. Replication of Sindbis virus: III. An electron microscopic study of virus maturation using the surface replica technique. *Virology* 56:429–438.
38. Pavan A, Lotti LV, Torrisi MR, Migliaccio G, Bonatti S. 1987. Regional distribution of Sindbis virus glycoproteins on the plasma membrane of infected baby hamster kidney cells. *Experimental Cell Research* 168:53–62.
39. Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, Bradke F, Jenne D, Holak TA, Werb Z, Sixt M, Wedlich-Soldner R. 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 5:605–607.
40. Bohil AB, Robertson BW, Cheney RE. 2006. Myosin-X is a molecular motor that functions in filopodia formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:12411–12416.
41. Rottner K, Behrendt B, Small JV, Wehland J. 1999. VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol* 1:321–322.
42. Roffers-Agarwal J, Xanthos JB, Miller JR. 2005. Regulation of actin cytoskeleton architecture by Eps8 and Abi1. *BMC Cell Biology* 6:36.
43. Van den Broeke C, Jacob T, Favoreel HW. 2014. Rho'ing in and out of cells. *Small GTPases* 5:e28318.
44. Gao Y, Dickerson JB, Guo F, Zheng J, Zheng Y. 2004. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:7618–7623.
45. Bosco EE, Mulloy JC, Zheng Y. 2009. Rac1 GTPase: A "Rac" of All Trades. *Cell Mol Life Sci* 66:370–374.

46. Weernink PAO, Meletiadis K, Hommeltenberg S, Hinz M, Ishihara H, Schmidt M, Jakobs KH. 2004. Activation of Type I Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase Isoforms by the Rho GTPases, RhoA, Rac1, and Cdc42 \*. *Journal of Biological Chemistry* 279:7840–7849.
47. Chang K, Baginski J, Hassan SF, Volin M, Shukla D, Tiwari V. 2016. Filopodia and Viruses: An Analysis of Membrane Processes in Entry Mechanisms. *Front Microbiol* 7:300.
48. Age Utt, Rausalu K, Jakobson M, Männik A, Alphey L, Fragkoudis R, Merits A. 2019. Design and use of Chikungunya virus replication templates utilizing mammalian and mosquito RNA polymerase I mediated transcription. *Journal of Virology* JVI.00794-19.
49. Ghosh A, Alladi PA, Narayanappa G, Vasanthapuram R, Desai A. 2018. The time course analysis of morphological changes induced by Chikungunya virus replication in mammalian and mosquito cells. *av* 62:360–373.
50. Martinez MG, Snapp EL, Perumal GS, Macaluso FP, Kielian M. 2014. Imaging the alphavirus exit pathway. *J Virol* 88:6922–33.
51. Martinez MG, Kielian M. 2016. Intercellular Extensions Are Induced by the Alphavirus Structural Proteins and Mediate Virus Transmission. *PLOS Pathogens* 12:e1006061.
52. DeRosier DJ, Edds KT. 1980. Evidence for fascin cross-links between the actin filaments in coelomocyte filopodia. *Exp Cell Res* 126:490–494.
53. Krause M, Dent EW, Bear JE, Loureiro JJ, Gertler FB. 2003. Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:541–564.
54. Jouvenet N, Windsor M, Rietdorf J, Hawes P, Monaghan P, Way M, Wileman T. 2006. African swine fever virus induces filopodia-like projections at the plasma membrane. *Cellular Microbiology* 8:1803–1811.
55. Ellis S, Mellor H. 2000. The novel Rho-family GTPase Rif regulates coordinated actin-based membrane rearrangements. *Current Biology* 10:1387–1390.
56. Van den Broeke C, Radu M, Deruelle M, Nauwynck H, Hofmann C, Jaffer ZM, Chernoff J, Favoreel HW. 2009. Alpha herpesvirus US3-mediated reorganization of the actin cytoskeleton is mediated by group A p21-activated kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:8707–8712.
57. Lu X, Wu X, Plemenitas A, Yu H, Sawai ET, Abo A, Peterlin BM. 1996. CDC42 and Rac1 are implicated in the activation of the Nef-associated kinase and replication of HIV-1. *Curr Biol* 6:1677–1684.
58. Dadke D, Fryer BH, Golemis EA, Field J. 2003. Activation of p21-activated kinase 1-nuclear factor kappaB signaling by Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor during cellular transformation. *Cancer Res* 63:8837–8847.
59. Zamudio-Meza H, Castillo-Alvarez A, González-Bonilla C, Meza I. 2009. Cross-talk between Rac1 and Cdc42 GTPases regulates formation of filopodia required for dengue virus type-2 entry into HMEC-1 cells. *Journal of General Virology* 90:2902–2911.

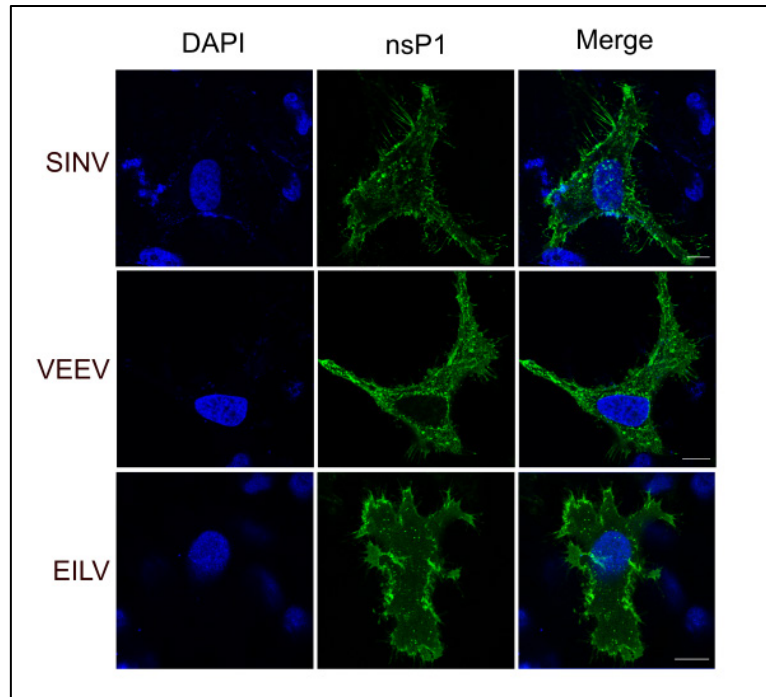
60. Radoshitzky SR, Pegoraro G, Chī X, Dǒng L, Chiang C-Y, Jozwick L, Clester JC, Cooper CL, Courier D, Langan DP, Underwood K, Kuehl KA, Sun MG, Cai Y, Yú S, Burk R, Zamani R, Kota K, Kuhn JH, Bavari S. 2016. siRNA Screen Identifies Trafficking Host Factors that Modulate Alphavirus Infection. *PLOS Pathogens* 12:e1005466.
61. Yang C, Svitkina T. 2011. Filopodia initiation. *Cell Adhesion & Migration* 5:402–408.
62. Ahola T, Kujala P, Tuittila M, Blom T, Laakkonen P, Hinkkanen A, Auvinen P. 2000. Effects of Palmitoylation of Replicase Protein nsP1 on Alphavirus Infection. *Journal of Virology* 74:6725–6733.
63. Navarro-Lérída I, Sánchez-Perales S, Calvo M, Rentero C, Zheng Y, Enrich C, Del Pozo MA. 2012. A palmitoylation switch mechanism regulates Rac1 function and membrane organization. *The EMBO Journal* 31:534–551.
64. Marei H, Malliri A. 2016. GEFs: Dual regulation of Rac1 signaling. *Small GTPases* 8:90–99.
65. Jiang W, Sheng C, Gu X, Liu D, Yao C, Gao S, Chen S, Huang Y, Huang W, Fang M. 2016. Suppression of Rac1 Signaling by Influenza A Virus NS1 Facilitates Viral Replication. 1. *Sci Rep* 6:35041.
66. Tan TL, Fang N, Neo TL, Singh P, Zhang J, Zhou R, Koh CG, Chan V, Lim SG, Chen WN. 2008. Rac1 GTPase is activated by hepatitis B virus replication - involvement of HBX. *BBA - Molecular Cell Research* 1783:360–374.
67. Pohjala L, Utt A, Varjak M, Lulla A, Merits A, Ahola T, Tammela P. 2011. Inhibitors of alphavirus entry and replication identified with a stable Chikungunya replicon cell line and virus-based assays. *PLoS ONE* 6:e28923.
68. Bernard E, Solignat M, Gay B, Chazal N, Higgs S, Devaux C, Briant L. 2010. Endocytosis of Chikungunya Virus into Mammalian Cells: Role of Clathrin and Early Endosomal Compartments. *PLoS ONE* 5.
69. Spuul P, Balistreri G, Kaariainen L, Ahola T. 2010. Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. *J Virol* 84:7543–57.
70. Gorchakov R, Garmashova N, Frolova E, Frolov I. 2008. Different types of nsP3-containing protein complexes in Sindbis virus-infected cells. *J Virol* 82:10088–101.
71. Frolova E, Gorchakov R, Garmashova N, Atasheva S, Vergara LA, Frolov I. 2006. Formation of nsP3-specific protein complexes during Sindbis virus replication. *J Virol* 80:4122–34.
72. Barton DJ, Sawicki SG, Sawicki DL. 1991. Solubilization and immunoprecipitation of alphavirus replication complexes. *J Virol* 65:1496–506.
73. Mutso M, Morro AM, Smedberg C, Kasvandik S, Aquilimeba M, Teppor M, Tarve L, Lulla A, Lulla V, Saul S, Thaa B, McInerney GM, Merits A, Varjak M. 2018. Mutation of CD2AP and SH3KBP1 Binding Motif in Alphavirus nsP3 Hypervariable Domain Results in Attenuated Virus. *Viruses* 10.
74. Zhang N, Zhao H, Zhang L. 2019. Fatty Acid Synthase Promotes the Palmitoylation of Chikungunya Virus nsP1. *Journal of Virology* 93:e01747-18.

75. Utt A, Rausalu K, Jakobson M, Männik A, Alphey L, Fragkoudis R, Merits A. 2019. Design and Use of Chikungunya Virus Replication Templates Utilizing Mammalian and Mosquito RNA Polymerase I-Mediated Transcription. *Journal of Virology* 93:10.1128/jvi.00794-19.



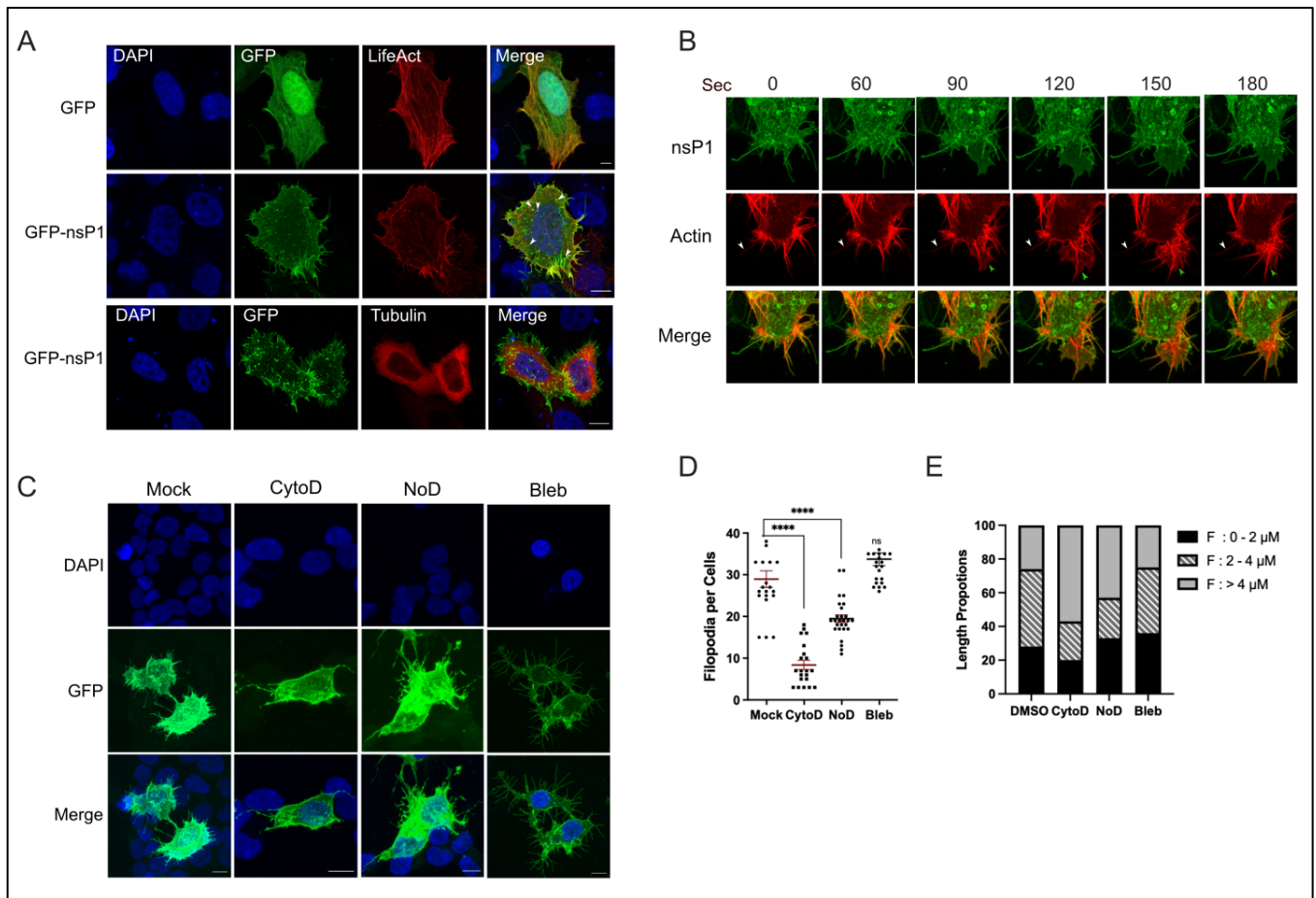
## Fig. 1 CHIKV nsP1 significantly reshapes the cell membranes

(A) HEK293T cells were either left uninfected or infected with the CHIKV-m377 virus encoding for a nsP3-mCherry fusion protein for 16h and labelled with antibodies against nsP1 and dsRNA. Nuclei were stained with DAPI. The cells were processed for high resolution confocal imaging using a Zeiss LSM980 AiryScan 8Y microscope. Scale bar: 10μm. (B) Cells transfected with plasmids encoding the CHIKV nsP1 protein or the nsP1-dsRed fusion protein were processed for confocal imaging. Nuclei are stained with DAPI. (C, D) Still images video of HEK293T cells transfected with GFP-nsP1 (see Supplementary Video S1) showing growing filopodia-like extensions (C) and dynamic lamellipodia (D). In D, filopodia growing from lamellipodia are indicated by a white arrow and retracting ruffles with persisting fibers attached to the substrate are shown by red arrows. (E) Membrane deformations in cells expressing the GFP-nsP1 protein or its palmitoylation deficient mutant GFP-nsP1<sub>AAA</sub>. The number (F) and length (G) of filopodia-like extensions in (D) was quantified manually in >10 cells.



**Fig. 2 nsP1-induced membrane deformation is conserved across Alphavirus evolution**

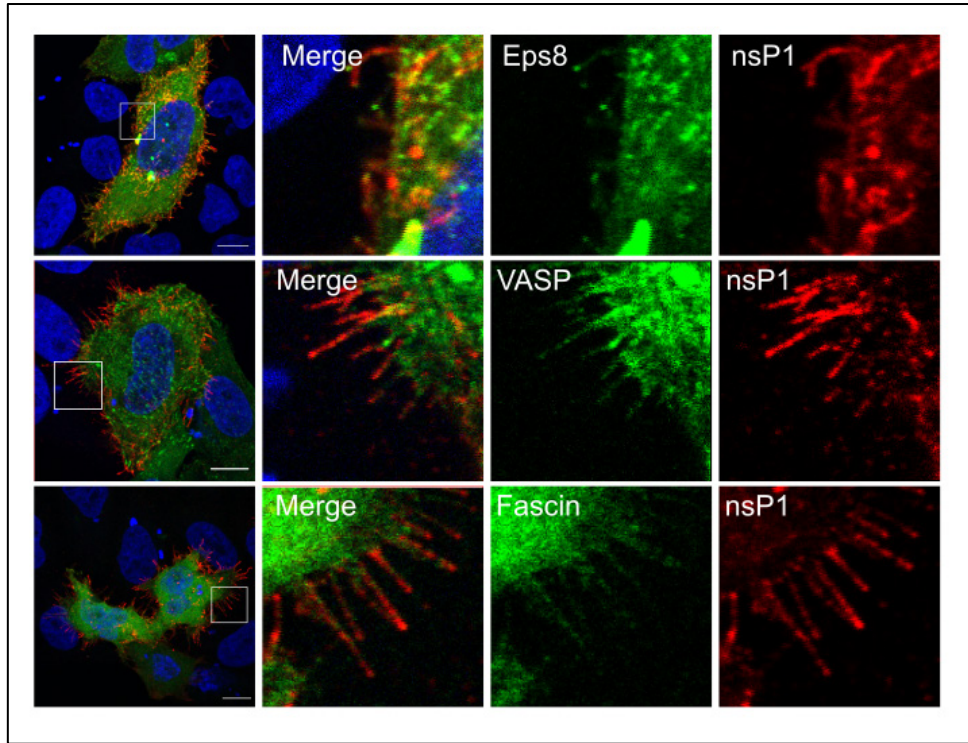
*Confocal imaging of HEK293T cells expressing nsP1 encoded by Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV), Sindbis virus (SINV) or by Eilat virus (EILV) fused with GFP. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar: 10 $\mu$ m.*



### Fig. 3 Contribution of actin cytoskeleton in nsP1-induced membrane extensions

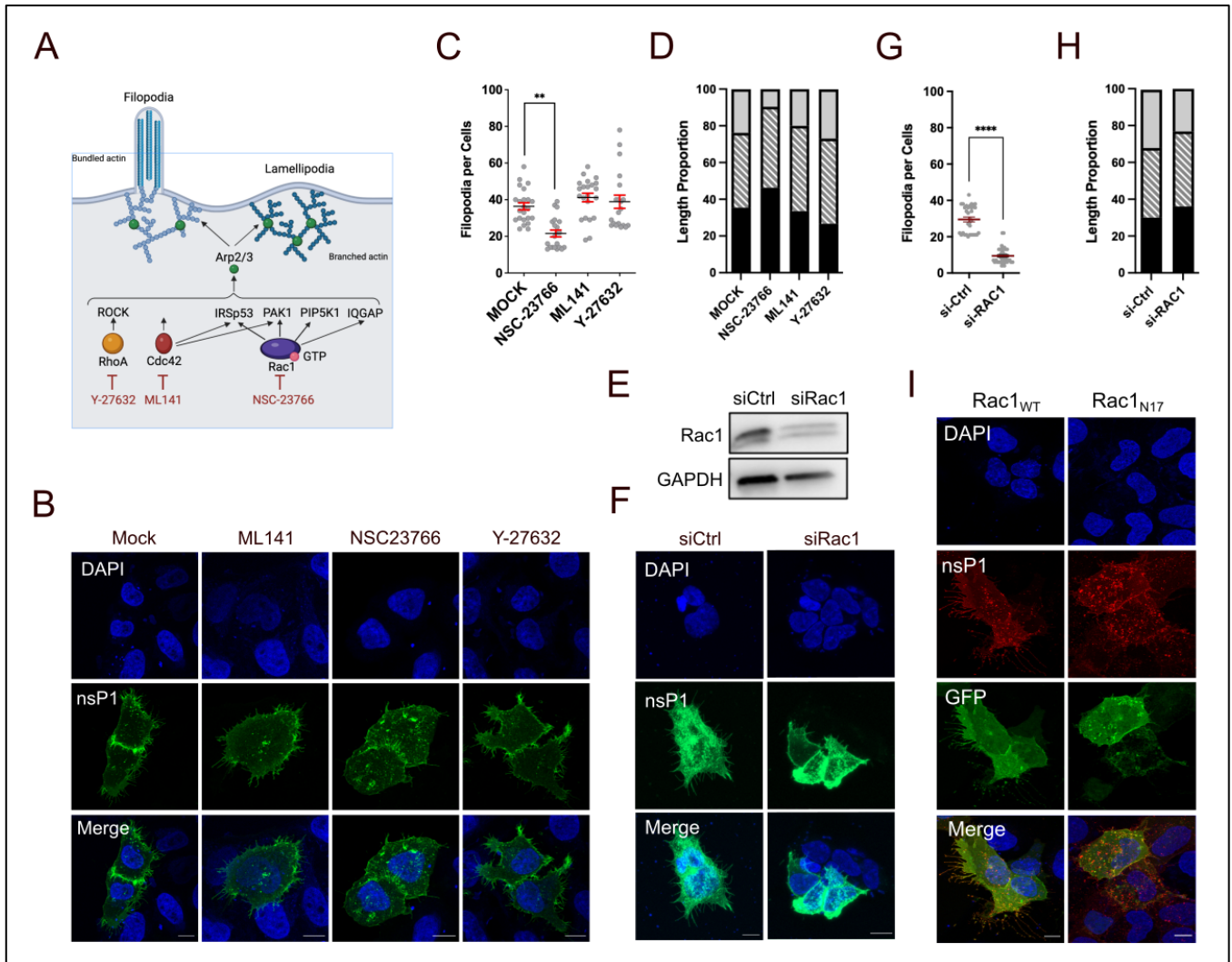
(A) Cells transfected with GFP-nsP1 were either cotransfected with the RFP-LifeAct plasmid to visualize cellular actin or labelled with anti-tubulin mAbs. Nuclei were stained with DAPI. Colocalized fluorescences are indicated by arrows. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . (B) Time-lapse microscopy of GFP-nsP1 expressing cells. The time is shown in seconds. Actin is labelled with LifeAct. The frames show the position changes of filopodia. Colocalized actin and nsP1 fluorescence in filopodia and in lamellipodia are indicated by white arrows and green arrows respectively. This sequence is shown in Supplementary Video S2. (C) Confocal imaging of cells expressing the GFP-nsP1 protein incubated for 4 hrs in the presence of Cytochalasin D (CytoD; 0.25  $\mu\text{M}$ ), or nocodazole (NoD; 0.1  $\mu\text{M}$ ), blebbistatin (Bleb; 5  $\mu\text{M}$ ), or vehicle (Mock). (D) Number of filopodia per cell and (E) extension length were determined from >15 cells.





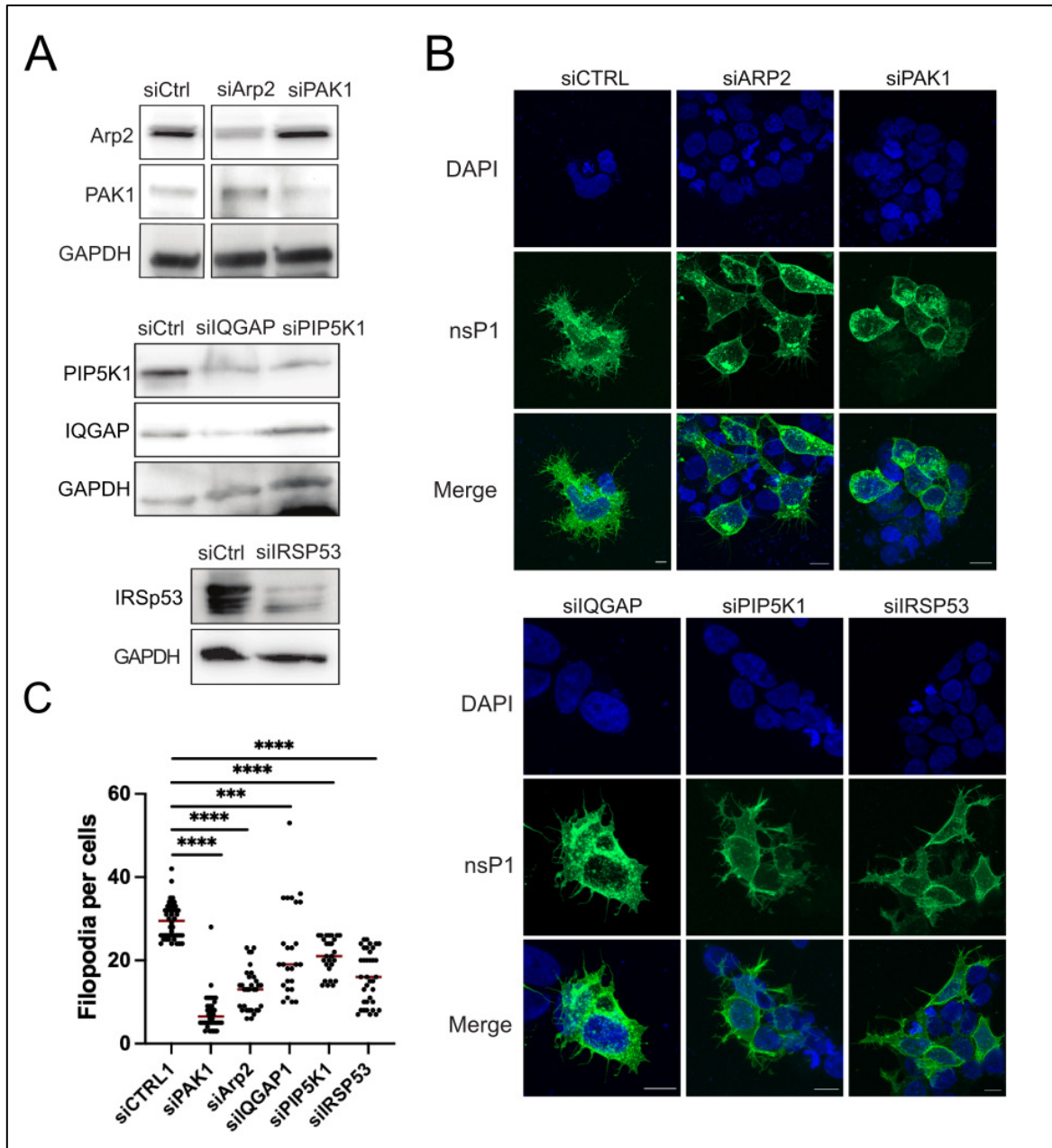
**Fig. 4 Presence of filopodia markers Fascin, Eps8 and VASP on nsP1-induced cell extensions**

*Cells expressing an untagged nsP1 were cotransfected with plasmids encoding either VASP-GFP, EPS8-GFP or Fascin-GFP proteins as indicated. After 24 hrs the cells were processed for confocal imaging. Nuclei are stained with DAPI. Scale bar: 10  $\mu$ m.*



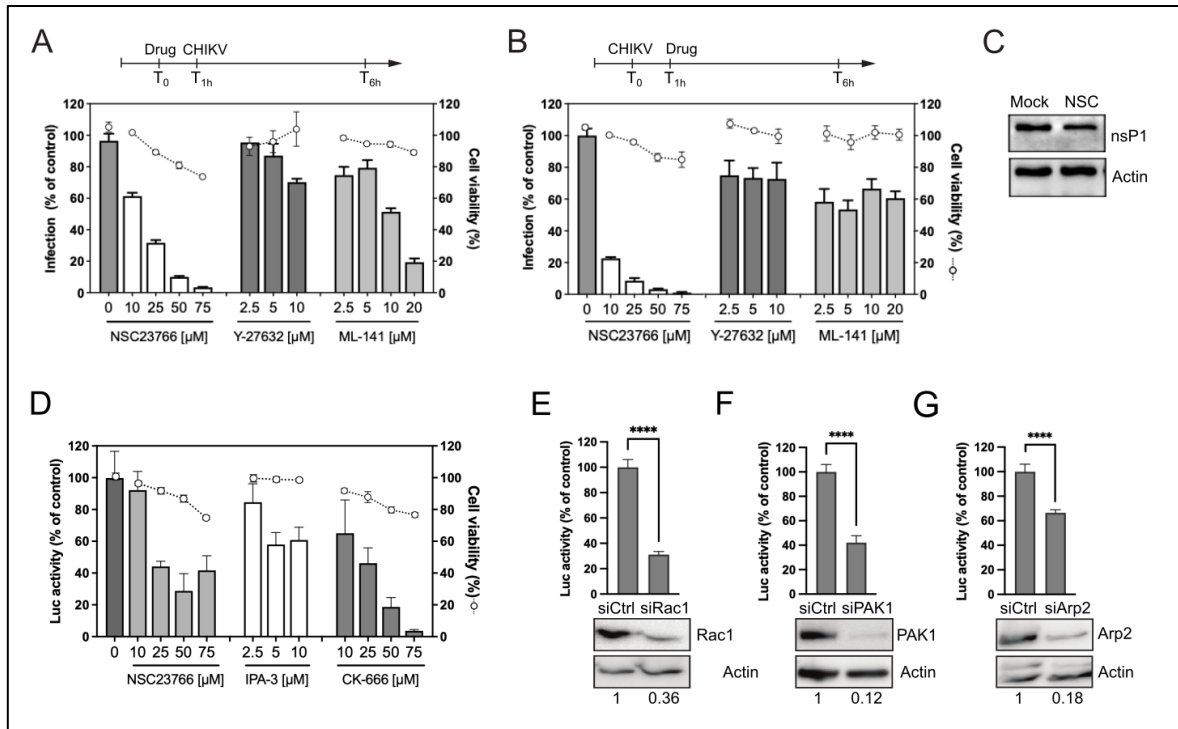
**Fig. 5 Rac1 GTPase is critical for nsP1-induced membrane protrusion**

(A) Schematic representation of Rho GTPase-dependent actin regulation in filopodia and lamellipodia formation. Inhibitors used in this study are indicated. (B) Cells transfected to express GFP-nsP1 were cultured in the presence of vehicle (Mock) or NSC23766 (100  $\mu$ M), ML-141 (20  $\mu$ M) or Y-27632 (20  $\mu$ M) for 24 hours before analysis by confocal microscopy. Nuclei are stained with DAPI. Scale bar: 10  $\mu$ m. For each condition, filopodia number (C) and length (D) were determined from >20 cells. In D, filopodia length are grouped as in Figure 3E. (E) Cells transfected with siRNA against Rac1 (siRac1) or a non-targeting control (siCtrl) were analyzed for Rac1 and actin expression. (F) Then the cells were transfected to express GFP-nsP1 and processed for confocal microscopy after 24 hours. The cells were analyzed by confocal microscopy. Filopodia count (G) and length (H) was determined from >20 cells. (I) Cells were cotransfected with GFP-nsP1 and a plasmid encoding either a GFP-tagged Rac1 protein (WT) or a dominant negative mutant (Rac<sub>N17</sub>). The cells were processed as above.



**Fig. 6 PAK1 and Arp2 effectors of Rac1 are pivotal in nsP1-induced membrane deformation**

(A) HEK293T cells were transfected for 48 hrs with siRNA targeting Arp2, PAK1, IQGAP, PIP5K1 or with non-targetting siRNA. For IRSp53, cells were transfected for 72 hrs. Invalidation was controlled by immunoblot. GAPDH is shown as a loading control. (B) Then the cells were transfected to express GFP-nsP1 and stained with DAPI. Consequences on membrane deformation was analyzed by confocal microscopy. (C) Number of filopodia per cell determined from >25 cells.



**Fig. 7 Rac1 is required for CHIKV genome replication**

Cells infected with CHIKV-Luc for 1 hrs (MOI 1) were incubated with increasing concentrations of GTPase inhibitors added to the culture medium 1 hr before (A) or after (B) the viral challenge. After 6 hrs in culture, CHIKV infection was determined by quantification of luciferase activity in the cell lysates. The experimental design is shown above. Values are normalized according to protein content in the samples (histograms). Drug toxicity was determined from uninfected cells maintained in similar conditions for the duration of the experiment (dotted line). Results are the mean of triplicates. (C) Expression of nsP1 in mock treated cells and in cells maintained in the presence of 75 μM NSC23766 (NSC) was determined by immunoblot. (D) Cells transfected with a CHIKV transreplication system were incubated with the indicate concentrations of NSC23766, IPA-3 or CK-666. Genome replication was determined by quantification of cell-associated luciferase activity. Cell viability is shown for each condition. Values are means of triplicate. (E-G) Cells transfected with siRNA against Rac1 (E), PAK1 (F) or Arp2 (G) or non-targetting control (siCtrl) for 48 hrs were analyzed for target protein expression by immunoblot. Relative band intensity is shown for each condition. Then the cells were transfected with the CHIKV transreplication system for 24 hrs. Genome replication was determined by quantification of luciferase activity in the cell lysate. All values are mean of triplicates.

## 2. Etude Protéomique de la protéine nsP1 de CHIKV

### 2.1. Introduction et objectifs

Le CHIKV, comme d'autres membres du genus *Alphavirus*, possède une capacité à altérer profondément la membrane plasmique de ses cellules hôtes.

D'une part, comme la quasi-totalité des virus à ARN (+), les *Alphavirus* forment des évaginations à membrane unique, appelées sphérules, contenant un site de synthèse de l'ARN viral (Frolova et al. 2010). Ces sphérules de 60 nm de diamètre sont assemblées à la membrane plasmique et connectées au cytosol par un col de 8 nm de large (Froshauer et al. 1988). Une protéine en particulier semble clés dans ce phénotype la MTase-GTase virale nsP1. nsP1 est une protéine de liaison membranaire monotope de 60 kDa (Spuul et al. 2007). Au sein des cellules infectées, elle s'assemble en un complexe dodécamérique en forme de pore au niveau du col de la sphérule de réplication et ancre le complexe de réplication virale à la membrane (Jones et al. 2020a, Zhang et al. 2021, Tan et al. 2022, Laurent et al. 2022, Girard et al. 2023a). Cette capacité de liaison à la membrane détermine de manière cruciale l'activité de coiffage de nsP1 (Ahola et al. 1999, Jones et al. 2020a, Zhang et al. 2021). L'interaction avec les bicouches lipidiques a été attribuée à la présence dans la partie centrale de la nsP1 d'une hélice amphipathique putative formée par les acides aminés 245-264 conférant une affinité pour les lipides anioniques (Ahola et al. 1999, Lampio et al. 2000, Spuul et al. 2007) et à la palmitoylation de résidus cystéine conservés aux positions 417-419 dans la séquence CHIKV (Laakkonen et al. 1996, Ahola et al. 2000, Bakhache et al. 2020). La résolution récente de la structure dodécamérique du nsP1 au sein du complexe de réplication a confirmé l'importance fonctionnelle du motif 416-TCCCLWA-422 palmitoylé. Ce motif s'associe avec la séquence 225-LSIM-228 des nsP1 adjacents pour former des péplomères amphipathiques permettant la liaison à la membrane en s'insérant dans la bicouche lipidique (Jones et al. 2020a).

D'autre part l'expression isolée de nsP1 entraîne chez la cellule hôte, la formation de protrusions semblables à des filopodes (FLP) à la membrane plasmique (Laakkonen et al. 1998b). Ces courtes extensions entre 3 et 7 µm de longueurs également présentes lors de l'infection avec le virus complet. On ignore cependant par quel

processus ces protrusions sont formées ou le rôle de ces protrusions dans le cycle infectieux de manière plus générale (Laakkonen et al. 1998a, Martinez et al. 2014a).

Dans la mesure où le remodelage de la membrane plasmique de l'hôte intervient à la fois dans la formation des sphérules et dans l'induction du FLP, se pose la question de savoir s'il existe un mécanisme commun à ces deux processus.

Dans ces deux phénomènes, l'adressage membranaire de nsP1 semble être crucial. Chez CHIKV, les substitutions alanine-cystéine dans la séquence 416-TCCCLWA-422 (nsP1<sub>3A</sub>), qui aboutissent à une nsP1 non palmitoylée, inhibent la réplication du génome du CHIKV (Zhang et al. 2019, Bakhache et al. 2020). De plus, cette protéine mutée est incapable de promouvoir des extensions cellulaires de type filopode (Laakkonen et al. 1998a, Bakhache et al. 2020). Cependant, les mécanismes de la cellule hôte détournés par nsP1 pour assister la déformation membranaire restent inconnus. Nous avons récemment caractérisé les extensions de filopodes de la nsP1 comme des structures très dynamiques, tubuline négatives, contenant de l'actine et porteuses de sphérules de réplication et de particules virales bourgeonnantes (Girard et al. 2023a). Nous avons identifié la voie de régulation de l'actine Rac1-Pak1-Arp2 comme un contributeur critique à la déformation membranaire induite par la nsP1, également requise pour une réplication optimale du génome.

L'identification de l'interactome de la nsP1 constitue une stratégie pertinente pour identifier les processus cellulaires sous-jacents nécessaires à la déformation de la membrane plasmique. Afin de décrypter la manière dont la nsP1 manipule les membranes cellulaires, nous avons donc interrogé l'interactome de la nsP1. En effet, contrairement à d'autres nsP pour lesquelles des cofacteurs cellulaires ont été largement étudiés et identifiés (Cristea et al. 2006, Bourai et al. 2012, Meertens et al. 2012, Meshram et al. 2018, Mutso et al. 2018), l'interactome cellulaire de nsP1 reste en grande partie inconnu. En utilisant la chromatographie liquide spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), nous avons exploré les protéines de l'hôte interagissant avec la protéine nsP1 de CHIKV. En comparant ces données avec les analyses protéomiques du mutant nsP1<sub>3A</sub> nous avons pu déterminer un ensemble de candidats spécifiques de la protéine dans son contexte membranaire. L'identification et la caractérisation de ces candidats sont au cœur des résultats présentés ici.

## 2.2. Résultats

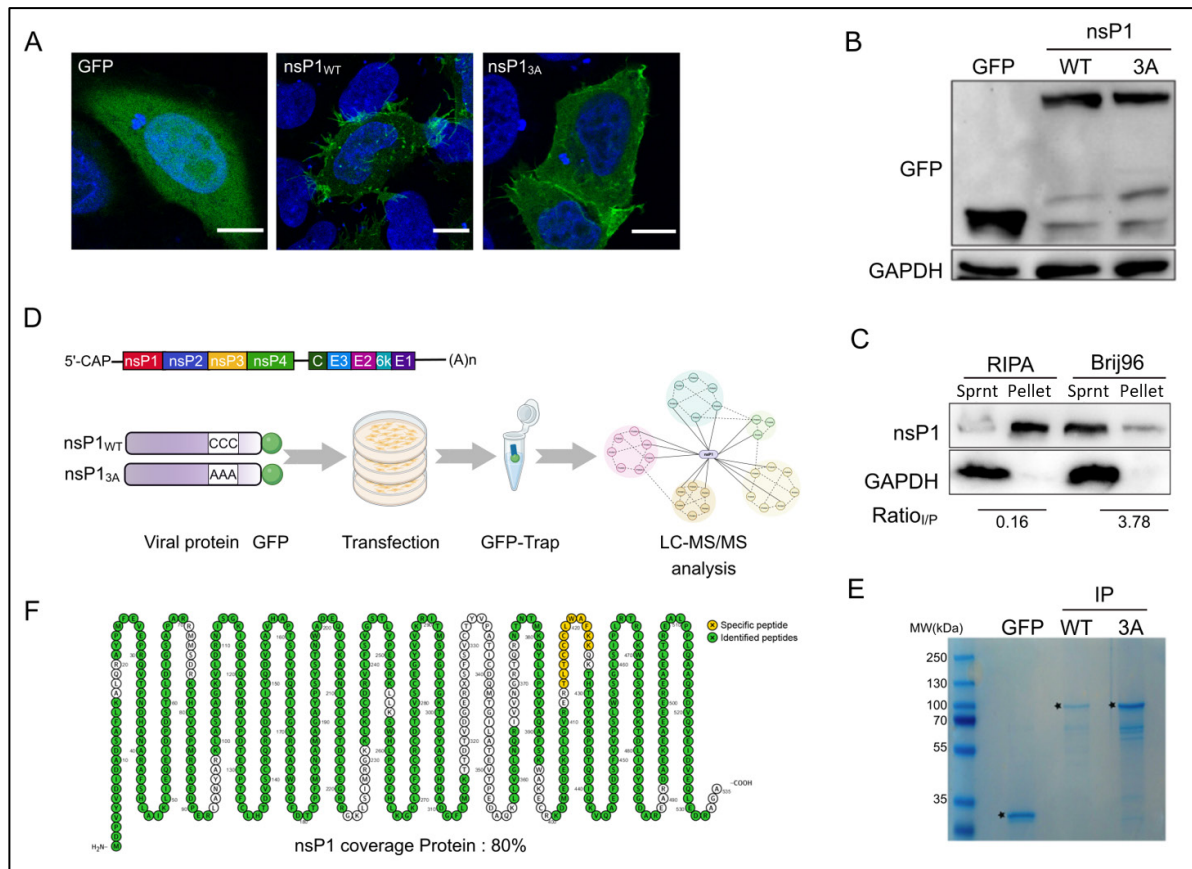
### a. Méthodologie de l'analyse protéomique de nsP1

Afin de décrypter la machinerie filopodienne de nsP1, une approche protéomique a été conçue au sein du laboratoire pour établir l'interactome de nsP1. La protéine nsP1 a été clonée en fusion avec la GFP à son extrémité N-terminale (nsP1<sub>WT</sub>). Nous avons contrôlé que cette protéine de fusion remodèle efficacement la membrane cellulaire (Fig. 51A), induisant des filopodes très similaires à ceux observés dans les cellules infectées par le CHIKV (Laakkonen et al. 1998a, Jose et al. 2017a) ou avec la protéine nsP1 non fusionnée. En parallèle, un vecteur d'expression GFP-nsP1<sub>3A</sub> a été produit par mutagenèse dirigée en substituant le triplet de cystéine de nsP1 (417-CCC-419) par trois alanines. Comme attendu, ce mutant n'induit pas la déformation membranaire des cellules HEK293T (Fig. 51A). L'expression des protéines après transfection a été confirmée par western blot en utilisant des anticorps anti-GFP (Fig. 51B).

nsP1 est une protéine monotopique qui interagit avec la membrane cellulaires. Elle possède une forte affinité pour les microdomaines membranaires insolubles dans par les détergents usuels (Ahola et al. 1999, Lampio et al. 2000, Bakhache et al. 2020). La lyse cellulaire a été optimisée afin de solubiliser efficacement nsP1 à partir des membranes de cellules transfectées. Parmi les différents détergents testés, le Brij96 a été sélectionné en tant que détergent optimal pour la solubilisation de nsP1 (Fig. 51C). Les lysats préparés selon ce protocole ont été soumis à une étape de précipitation réalisée à l'aide de billes d'agarose magnétiques couplées à des nanobodies spécifiques de la GFP (GFP-Trap, Chromo Tech) (Fig. 51D).

Après séparation sur gel d'acrylamide, les complexes protéiques précipités ont été révélés par coloration au bleu de Coomassie mettant en évidence des bandes de ~100 kDa dans les lysats de cellules transfectées exprimant les protéines nsP1<sub>WT</sub> et nsP1<sub>3A</sub> (Fig. 51E). Ces complexes ont été élués, digérés par la trypsine et analysés par LC/MS-MS. L'analyse des peptides identifiés par cette approche a montré une couverture de la séquence d'acides aminés de nsP1 proche de 80 %. Un peptide unique contenant la séquence de 417-CCC-419 a été détecté dans l'échantillon nsP1<sub>WT</sub> ou contenant 417-AAA-419 dans l'échantillon nsP1<sub>3A</sub>, validant la nature de la protéine de fusion exprimée dans chaque échantillon (Fig. 51F). Pour conclure, nous

avons développé un protocole de protéomique adapté à la solubilisation et à l'immunoprécipitation efficaces de nsP1.



**Fig. 51 Méthodologie de l'analyse protéomique de nsP1**

(A) Phénotype de cellules HeLa exprimant les protéines GFP, GFP-nsP1<sub>WT</sub>, GFP-nsP1<sub>3A</sub>. Le noyau est marqué au DAPI. La barre d'échelle correspond à 10  $\mu$ m. (B) Analyse par Immunoblot des lysats cellulaires correspondants (C) Test de solubilisation de la protéine GFP-nsP1 en présence de Triton ou Brij96. Les fractions membranaires obtenues après centrifugation à 16 000 g sont analysées par immunoblot à l'aide d'anticorps anti-nsP1. La condition Sprnt correspond au surnageant. (D) Schéma expérimental des étapes de préparation et d'analyse des échantillons par LC-MS/MS. L'emplacement de la protéine nsP1 au sein du génome CHIKV est représentée. (E) Analyse des complexes isolés par coloration au bleu de Coomassie. Les flèches noires indiquent les protéines précipitées fusionnées avec la GFP. (F) La séquence des acides aminés de nsP1 est représentée à l'aide du logiciel Protter. Les acides aminés surlignés en jaune correspondent au peptide CCC palmitoylé (417-CCC-419). La couverture de la séquence de nsP1 par l'analyse LC-MS/MS est indiquée en vert.

## b. Interactome de la protéine nsP1 dans les cellules épithéliales humaines.

L'analyse protéomique, dans les conditions mentionnées ci-dessus, a permis d'établir l'interactome de nsP1. Ce travail de protéomique effectué en triplicat a été réalisé en collaboration avec la plateforme de protéomique fonctionnelle de Montpellier (FPP) en

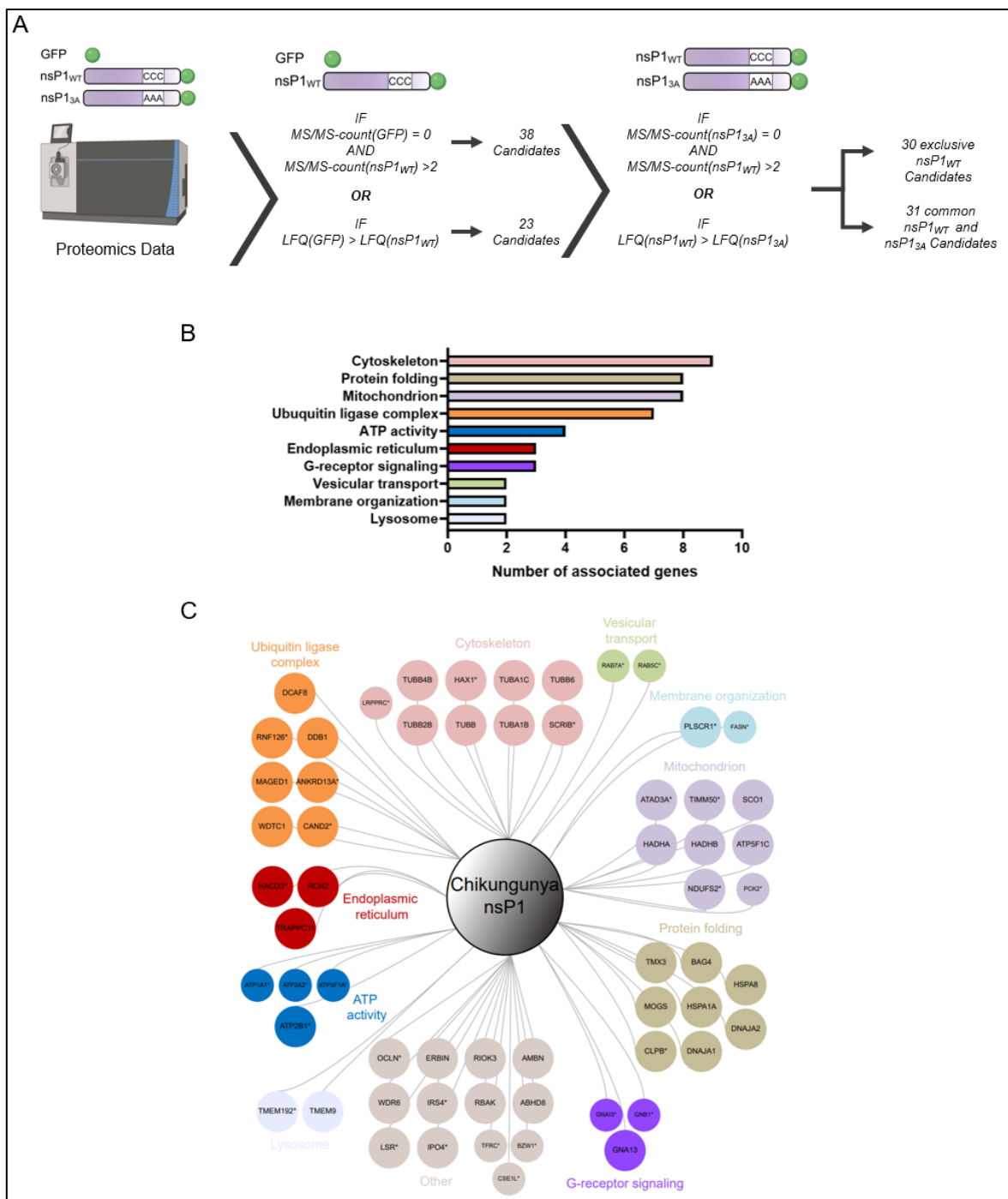


particulier la collaboration de Mathilde Decourcelle. Une analyse bioinformatique a été réalisée afin d'établir les interactants spécifiques de GFP-nsP1<sub>WT</sub>.

Tout d'abord via l'utilisation du logiciel MaxQuant, un tri a été effectué sur la base de deux critères. Premièrement le *MS/MS-count* correspondant au décompte total des peptides associés à la protéine d'intérêt et détectés au sein de l'échantillon. D'autre part, l'intensité LFQ (label-free quantification), qui correspond à un critère comparatif d'enrichissement en peptides entre deux échantillons. Les candidats interagissant spécifiquement avec GFP-nsP1<sub>WT</sub> et non avec le contrôle GFP ont été sélectionnés suivant les critères  $MS/MS\text{-count}(GFP\text{-nsP1}_{WT}) = 2$  et  $MS/MS\text{-count}(GFP)=0$  ce qui nous a permis d'obtenir 38 candidats (Fig. 52A). Pour prendre en compte les candidats fortement enrichis dans la condition GFP-nsP1<sub>WT</sub> et très faiblement représentés dans le contrôle GFP, nous avons défini un deuxième critère,  $LFQ(GFP\text{-nsP1}_{WT}) > LFQ(GFP)$ . Les candidats ont été retenus si cette différence est significative suivant un test de Student. Via cette sélection 23 candidats supplémentaires ont été mis de côté. Cette stratégie a été également appliquée aux peptides identifiés pour les conditions GFP et GFP-nsP1<sub>3A</sub>. Enfin pour isoler les partenaires cellulaires significativement plus présents dans la condition GFP-nsP1<sub>WT</sub> qu'avec la protéine mutée, les scores d'intensité LFQ et *MS/MS-count* ont été comparés et analysés statistiquement. Il en a résulté une sélection de 30 candidats interagissant préférentiellement avec GFP-nsP1<sub>WT</sub> et 31 autres candidats précipitant avec GFP-nsP1<sub>WT</sub> et GFP-nsP1<sub>3A</sub> (Fig. 52C).

En se basant sur les données bibliographiques disponibles, ces cofacteurs cellulaires ont été répartis suivant les processus cellulaires auxquels ils participent. Cette analyse a révélé une grande diversité dans les fonctions de ces protéines ainsi que leurs localisations subcellulaires (Fig. 52B et C). L'une des voies les plus représentées comprend les protéines régulatrices du cytosquelette. Ces protéines sont d'un grand intérêt car elles pourraient contribuer à la fonction de déformation membranaire de nsP1 à l'image des protéines Rac1, Arp2 et Pak1 que nous avons identifiée dans la première partie de cette thèse. De manière surprenante, un grand nombre d'interactants nsP1 ont également été associés au repliement protéique et au métabolisme des mitochondries. Ces informations pourraient indiquer l'existence de fonctions encore inconnues de nsP1 dans ces compartiments. Par ailleurs, nous avons

identifié dans chaque famille de protéines des interactants de nsP1<sub>WT</sub> incapables d'interagir avec le mutant nsP1<sub>3A</sub>. En conclusion, nous avons pu résoudre



**Fig. 52 Interactome de la protéine nsP1**

(A) Schéma de sélection et d'analyse des candidats d'interactomique. Le logiciel MaxQuant a été utilisé à partir des données issues de trois réplicats indépendants pour identifier les critères LFQ et MS/MS-count. (B) Les protéines ont été regroupées en blocs fonctionnels en se basant sur une analyse manuelle de la littérature. (C) Les protéines annotées d'une étoile correspondent aux interactants spécifiques de GFP-nsP1<sub>WT</sub>.

l'interactome de la protéine nsP1 du CHIKV dans des cellules hôtes mammifères. Nos données interactomiques ont permis d'identifier 61 cofacteurs cellulaires de nsP1 dont 30 exclusifs à la forme membranaire de cette protéine. Nos résultats montrent ainsi le rôle régulateur des cystéines palmitoylées dans ces interactions. La forte représentation de régulateurs du cytosquelette d'actine parmi les partenaires spécifiques de nsP1 laisse supposer de leur rôle dans la formation de protrusions membranaires induites par l'expression de nsP1.

### **c. Confirmation des données de l'interactome, le cas de HAX1 et SCRIB**

Les analyses protéomiques sont génératrices de grandes quantités de données, mais peuvent conduire à des faux positifs et être sensibles à certains biais méthodologiques. C'est pourquoi il est essentiel de valider les interactants à l'aide de techniques biochimiques. Ici seront présentés les résultats concernant deux candidats en particulier SCRIB (Scribble planar cell polarity protein) et HAX1 (HCLS1 Associated Protein X-1). Ces deux candidats sont impliqués dans la régulation du cytosquelette d'actine ainsi que les processus cellulaires associées. Ils ne sont pas retrouvés dans l'interactome du mutant nsP1<sub>3A</sub>, incapable de déformer les membranes cellulaires. Nous avons précédemment montré que le cytosquelette d'actine, et en particulier la voie Rac1-Pak1-Arp2 est essentielle à la formation de protrusions membranaires induites par nsP1 ainsi qu'à la réplication optimale de CHIKV. Au vu de l'implication de HAX1 et SCRIB dans la régulation du cytosquelette d'actine et en particulier leur relation avec la Rho-GTPase Rac1, nous avons sélectionné ces interactants pour une caractérisation fonctionnelle détaillée.

#### **HAX1**

HAX1, est une protéine multifonctionnelle et exprimée uniquement chez les vertébrés, découverte relativement récemment (Trebinska et al. 2010). Elle est ubiquitaire chez l'homme et située au principalement à proximité des mitochondries, bien que sa présence ait également été décrite au niveau du réticulum endoplasmique, des P-bodies et de l'enveloppe nucléaire (Yap et al. 2010, Zayat et al. 2015, Trebinska-Stryjewska et al. 2019). Cette protéine est intrinsèquement désordonnée, ce qui laisse supposer que sa structure est en grande partie déterminée par les ligands qui s'y

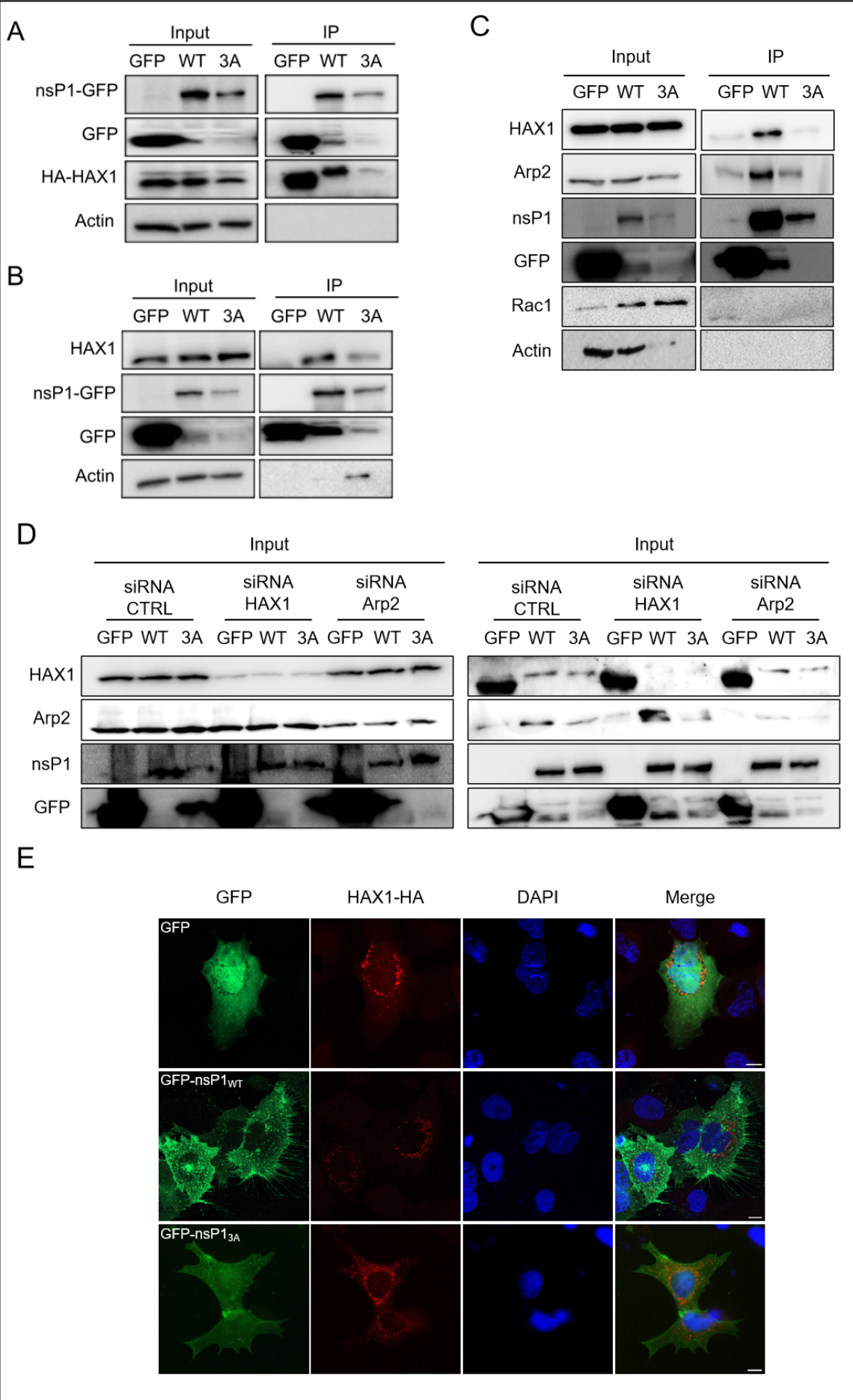
fixent. HAX1 joue un rôle important dans la régulation de l'apoptose, la régulation de l'homéostasie du calcium, l'adhésion et la migration cellulaire (Trebinska-Stryjewska et al. 2019). Cette dernière fonction est associée à la formation de lamellipodes résultant de la formation d'un complexe comprenant HAX1, la Rho-GTPase Rac1, ainsi que les protéines cortactine et Gα13 (Radhika et al. 2004a). HAX1 est décrite comme un cofacteur de plusieurs protéines virales comme la protéine transmembranaire K15 du KSHV ou la polymérase virale PA de InV-A (Sharp et al. 2002, Hsu et al. 2013).

Nos résultats protéomiques ont désigné HAX1 comme partenaire spécifique de GFP-nsP1<sub>WT</sub>. Pour confirmer cette interaction et sa spécificité, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation dans des cellules HEK293T exprimant les protéines nsP1<sub>WT</sub>, nsP1<sub>3A</sub> ou la GFP de même que HAX1-HA. Ces expériences ont confirmé que HAX1 interagissait spécifiquement avec nsP1, et que cette interaction était déterminée par la présence des cystéines palmitoylées (Fig. 53A). Etant dans un système de surexpression de protéines marquées, nous avons souhaité vérifier ces interactions dans un contexte d'expression endogène de nos candidats. Nous avons alors pu observer dans cette condition que HAX1 précipite de manière préférentielle avec GFP-nsP1<sub>WT</sub>, validant donc nos données préliminaires (Fig. 53B). HAX1, peut former un complexe avec la Rho-GTPase Rac1 et la cortactine (Radhika et al. 2004a). Cette dernière est capable d'induire la formation de lamellipodes via le recrutement du complexe Arp2/3 à la membrane plasmique (Weed et al. 2000). En nous basant sur ces informations et sur nos observations précédentes indiquant la contribution de Arp2 et Rac1 dans les déformations membranaires induites par nsP1, nous avons étudié la formation d'un complexe nsP1/HAX1/Rac1/Arp2. Selon nos résultats, HAX1 et Arp2 précipitent de manière préférentielle avec GFP-nsP1<sub>WT</sub> (Fig. 53C). Rac1 n'a été détectée dans aucune des conditions. Il est surprenant d'identifier, Arp2 comme partenaire potentiel de nsP1 lui-même étant absent de nos données protéomiques. Cependant, cette protéine ainsi que son partenaire Arp3 ont été détectés dans notre base de données interactomiques. Ce cofacteur n'a néanmoins pas été retenu dans nos analyses, ne dépassant pas les seuils de détection. Pour caractériser cette interaction entre HAX1, Arp2 et nsP1, nous avons invalidé HAX1 et Arp2 par siRNA et réitéré l'immunoprécipitation des protéines fusion GFP (Fig. 53D). Les résultats préliminaires que nous avons obtenus indiquent que l'invalidation d'une des deux

protéines n'inhibe pas la précipitation de l'autre. Dès lors, Arp2 et HAX1 interagiraient tous les deux avec nsP1 mais de manière indépendante l'un de l'autre. En considérant que l'inactivation par siRNA ne permet qu'un knockdown des protéines ciblées, il est difficile de conclure définitivement sur cette interaction. On peut toutefois supposer que HAX1 est impliquée dans le piratage de la voie Rac1-Pak1-Arp2 par nsP1. L'étude de HAX1-HA par microscopie confocale a montré que la protéine est majoritairement située au sein d'agrégats cytoplasmiques (Fig. 53E), ce qui correspondrait à sa localisation mitochondriale décrite dans la littérature (Balcerak et al. 2019). Nous n'avons pas observé de colocalisation de HAX1-HA avec nsP1<sub>WT</sub> ou nsP1<sub>3A</sub>.

## **SCRIB**

SCRIB, est une protéine d'échafaudage, découverte à l'origine chez la Drosophile, mais également exprimée chez les vertébrés. Elle fait partie de la famille des protéines LAPs (LRR and PDZ family) comprenant les protéines Discs large (Dlg), et Lethal giant larvae (Lgl) qui sont des protéines adaptatrices impliquées dans la polarisation cellulaires et contenant des domaines d'interaction PDZ et LRR (Santoni et al. 2002). La protéine SCRIB possède ainsi un domaine LRR en région N-terminale et 4 domaines PDZ en région C-terminale (Zeitler et al. 2004). SCRIB via ses domaines PDZ interagit avec différentes protéines virales comme la protéine NS1 de inV-A et la protéine NS5 de TBEV (Werme et al. 2008, Golebiewski et al. 2011). Cette protéine est impliquée dans la polarité cellulaire, la prolifération et la migration cellulaire (Bonello and Peifer 2018). Au cours de ce processus, SCRIB participe au recrutement et l'activation de Rho-GTPases au front de migration. Pour ce faire, la protéine est capable de s'associer avec la GEF  $\beta$ -PIX, qui permet l'activation localisée de Cdc42 et Rac1 (Sun et al. 2016). Cette association est permise par l'interaction de  $\beta$ -PIX avec les domaines PDZ de SCRIB (Lim et al. 2017). Il en résulte la formation du lamellipode de migration au front de migration de la cellule (Dow et al. 2007).

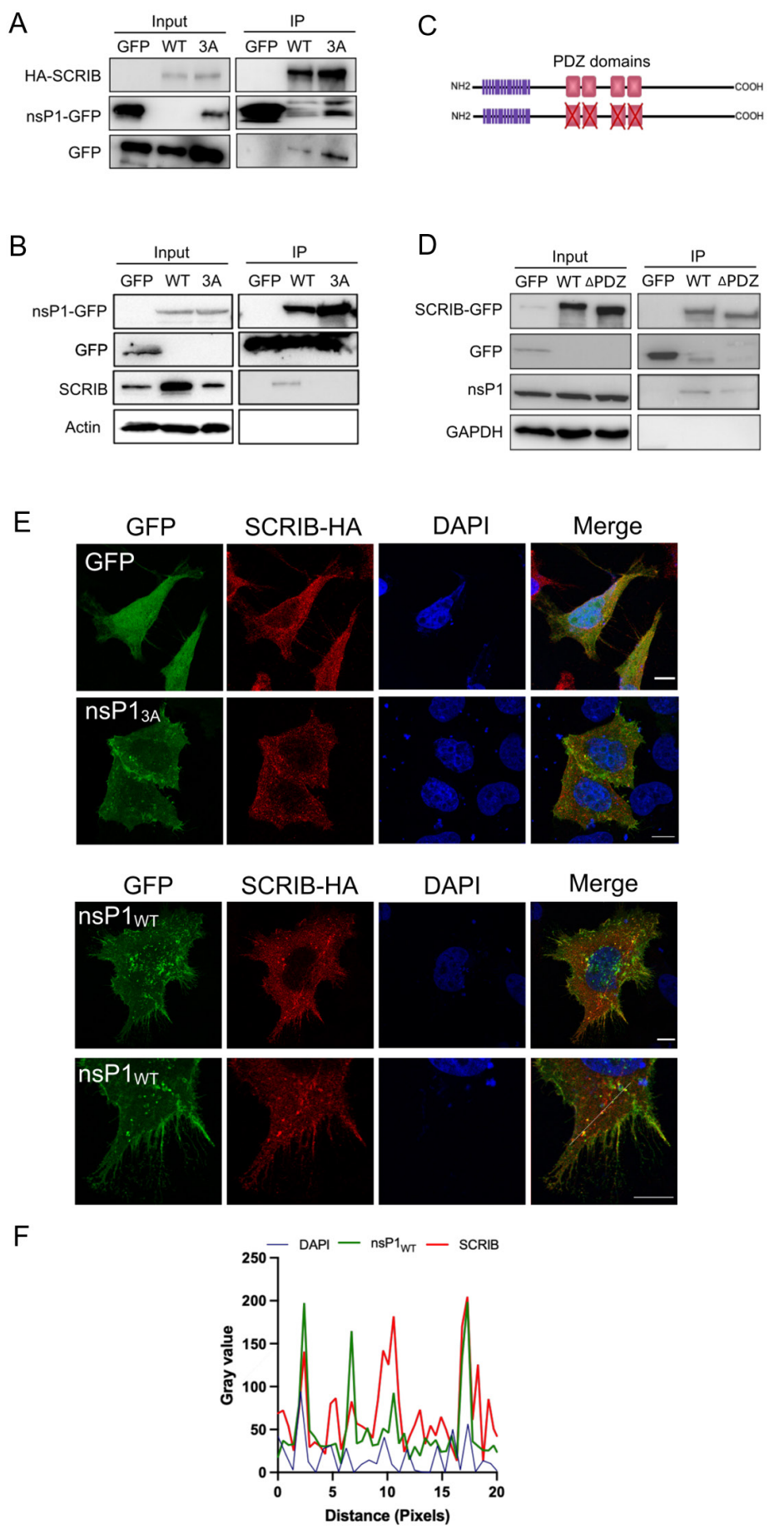


### **Fig. 53 Interactions entre nsP1 et le cofacteurs cellulaires HAX1.**

(A) Les cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec les constructions GFP, GFP-nsP1<sub>WT</sub> ou GFP-nsP1<sub>3A</sub> comme indiqué et HAX1-HA. Les lysats cellulaires ont été immunoprécipités par GFP-Trap. Les complexes obtenus sont analysés en immunoblots à l'aide d'anticorps anti-GFP et anti-HA. L'actine est utilisée comme contrôle de charge dans les extraits cellulaires totaux. (B) L'interaction des protéines GFP, GFP-nsP1<sub>WT</sub> ou GFP-nsP1<sub>3A</sub> précipitées avec la protéine HAX1 endogène est étudiée de manière similaire à l'aide d'anticorps anti-HAX1. (C) De manière similaire à (B), les protéines GFP, GFP-nsP1<sub>WT</sub> ou GFP-nsP1<sub>3A</sub> ont été précipitées. La présence des protéines Arp2 et Rac1 dans les complexes formés par GFP-nsP1 et HAX1 est recherchée à l'aide d'anticorps spécifiques. (D) L'expression de HAX1 et ARP2 ont été inhibées par la transfection des siRNAs correspondants. Après 48h les cellules ont été transfectées et traitées de manière similaire à (C). (E) Analyse de la localisation subcellulaire de HAX1 avec GFP, GFP-nsP1<sub>WT</sub> et GFP-nsP1<sub>3A</sub>. Les cellules HeLa ont été cotransfectées avec les plasmides codants pour SCRIB-HA et les constructions GFP. Après 24h les cellules sont fixées, perméabilisées et les noyaux colorés avec le DAPI, puis observées en microscopie confocale. Les barres d'échelles équivalent à 10  $\mu$ m.

Similairement à HAX1, nos résultats protéomiques ont désigné SCRIB comme partenaire spécifiques de GFP-nsP1<sub>WT</sub>. Cependant, lors de la confirmation de cette interaction par co-immunoprécipitation, la protéine SCRIB-HA précipite avec GFP-nsP1<sub>WT</sub> et GFP-nsP1<sub>3A</sub> (Fig. 54A). Nous supposons que cette aspécificité est en partie expliquée par le fait que nous sommes dans un système de surexpression de la protéine. Ceci est confirmé, lors de l'immunoprécipitation effectuée avec les protéines SCRIB endogènes. Dans ces conditions, SCRIB précipite uniquement avec GFP-nsP1<sub>WT</sub> en accord avec les résultats de notre crible (Fig. 54B).

La protéine SCRIB interagit avec ses partenaires cellulaires ou viraux essentiellement par l'intermédiaire de ses domaines PDZs (Bonello and Peifer 2018) (Fig. 54C). Nous avons donc recherché leur contribution dans son interaction avec nsP1. Pour tester le rôle des domaines PDZ dans l'interaction SCRIB/nsP1, nous avons réalisé une précipitation par GFP-Trap des protéines SCRIB fusionnées à la GFP (SCRIB<sub>WT</sub>-GFP) ou de son mutant présentant une délétion de ses quatre domaines d'interaction PDZ (SCRIB $\Delta$ PDZ-GFP) dans des cellules HEK293T exprimant la protéine nsP1 de CHIKV. Après immunoblot, nous avons pu observer que nsP1 possède une affinité supérieure pour la forme SCRIB<sub>WT</sub> comparée à la forme SCRIB $\Delta$ PDZ, illustrant l'importance des domaines PDZ dans cette interaction (Fig. 54D).





### **Fig. 54 Interactions entre nsP1 et le cofacteurs cellulaires SCRIB.**

(A) Les cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec les constructions GFP, GFP-nsP1<sub>WT</sub> ou GFP-nsP1<sub>3A</sub> comme indiqué et SCRIB-HA. Les lysats cellulaires ont été immunoprécipités par GFP-Trap. Les complexes obtenus sont analysés en immunoblots à l'aide d'anticorps anti-GFP et anti-HA. (B) L'interaction des protéines GFP, GFP-nsP1<sub>WT</sub> ou GFP-nsP1<sub>3A</sub> précipitées avec la protéine SCRIB endogène est étudiée de manière similaire à l'aide d'anticorps anti-SCRIB. (C) Organisation protéique de la protéine SCRIB. (D) Analyse du rôle des domaines PDZ de SCRIB dans l'interaction avec GFP-nsP1. Les protéines GFP, SCRIB<sub>WT</sub>-GFP ou SCRIB<sub>ΔPDZ</sub>-GFP coexprimées avec la protéine nsP1<sub>WT</sub> sont précipitées. Les complexes sont révélés à l'aide d'anticorps anti-GFP et anti-nsP1. L'expression de la GAPDH est utilisée comme contrôle. (E,F) Analyse de la localisation subcellulaire de GFP-nsP1 avec ses partenaires HAX1 et SCRIB. Les cellules Hela ont été cotransfectées avec les plasmides codants pour SCRIB-HA et les constructions GFP. Après 24h les cellules sont fixées, perméabilisées et les noyaux colorés avec le DAPI, puis observées en microscopie confocale. Les barres d'échelles équivalent à 10 μm.

L'étude de SCRIB-HA par microscopie confocale a montré que la protéine est principalement cytoplasmique (Fig. 53H), et se localise également avec GFP-nsP1<sub>WT</sub> à la membrane le long des protrusions membranaires induites par nsP1 de même qu'au sein d'agrégats cytoplasmiques. Cette localisation en agrégats est également présente lors de sa coexpression avec GFP-nsP1<sub>3A</sub>.

Pour conclure, nous avons confirmé l'interaction de deux candidats issus de notre crible protéomique. Ces deux protéines HAX1 et SCRIB, impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine, interagissent préférentiellement avec la forme palmitoylée de nsP1. L'interaction de SCRIB avec nsP1 est médiée par ses domaines PDZ, et SCRIB colocalise avec la protéine nsP1 à la membrane plasmique et au sein d'agrégats cytoplasmiques.

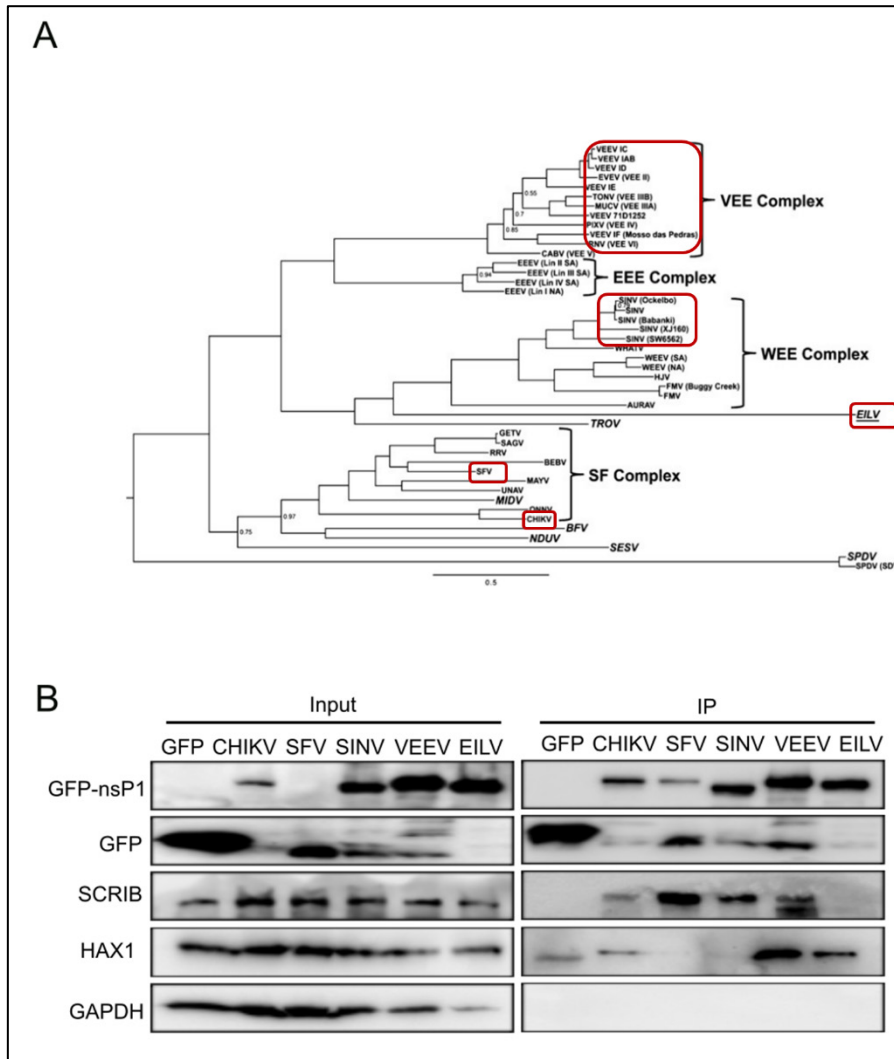
#### **d. Interaction de SCRIB et HAX1 avec les *Alphavirus***

Nos résultats ci-dessus mettent donc en évidence un partenariat entre nsP1 de CHIKV et les protéines cellulaires SCRIB et HAX1. Afin de déterminer si ces interactions sont conservées parmi les *Alphavirus* de l'ancien et du nouveau monde, nous avons produit des vecteurs d'expression des protéines nsP1 de quatre autres *Alphavirus*, SFV, SINV, VEEV et EILV en fusion avec la GFP. SFV et SINV sont considérés comme étant dans le groupe des *Alphavirus* de l'ancien monde, et historiquement les modèles d'études privilégiés de ce génus (Weaver et al. 2012) (Fig. 55A). VEEV quant à lui est un *Alphavirus* du nouveau monde responsable d'encéphalopathies chez les mammifères. Enfin EILV est un *Alphavirus* de l'ancien monde récemment découvert,

avec la particularité d'avoir un tropisme exclusif pour les cellules d'insectes (Nasar et al. 2012).

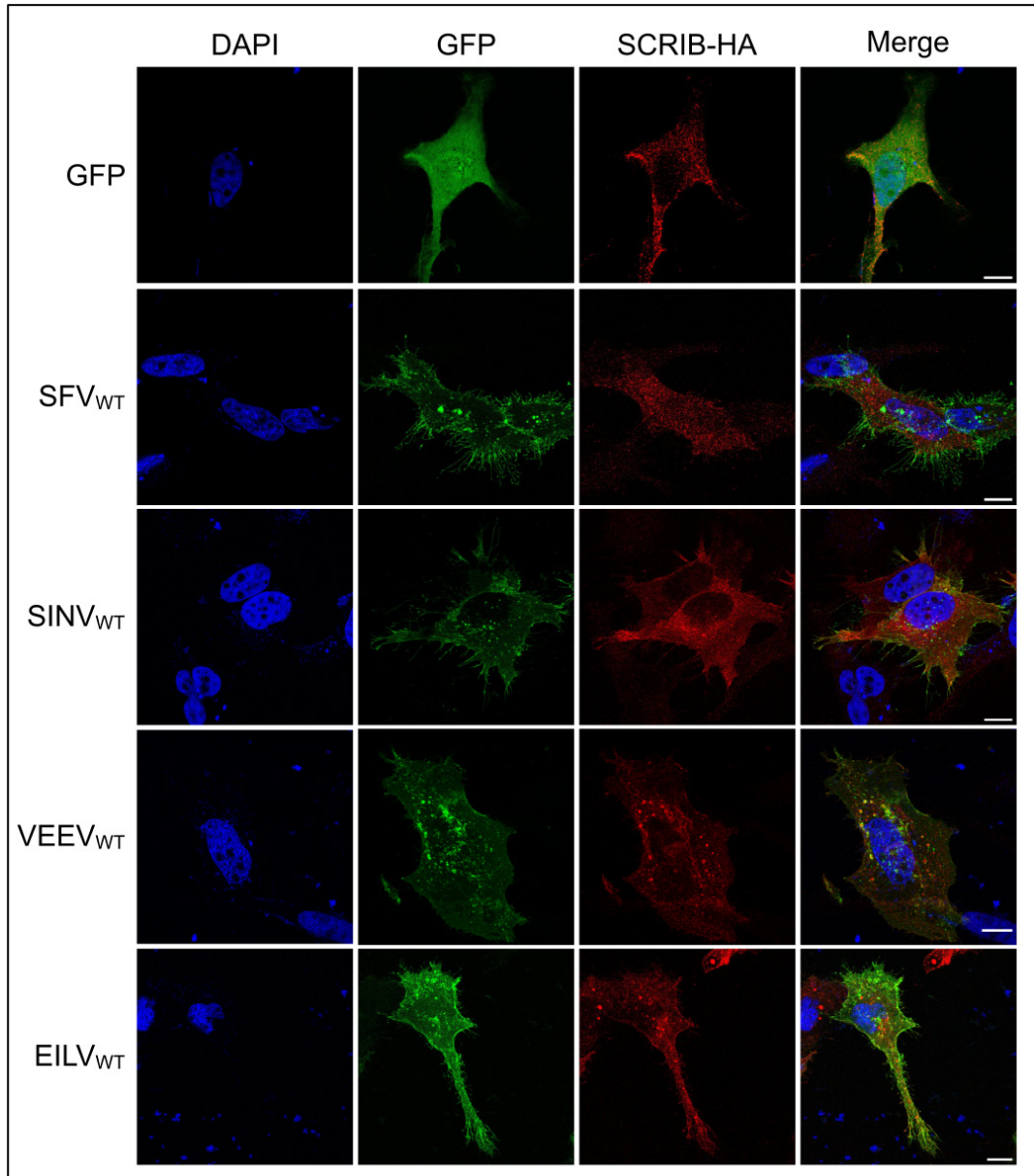
Nos essais de GFP-Trap ont montré qu'outre nsP1 de CHIKV, SCRIB interagit avec les protéines nsP1 de SFV, SINV et VEEV, suggérant une conservation de cette interaction chez les alphavirus de l'ancien monde et du nouveau monde (Fig. 55B). Cependant SCRIB ne semble pas interagir avec la protéine nsP1 de EILV. Le tropisme de EILV exclusif aux cellules d'insecte peut expliquer ceci. Des protéines orthologues au SCRIB humain existent chez l'insecte (Bilder and Perrimon 2000). On peut supposer que EILV interagit uniquement avec cette forme de la protéine et il serait pertinent de reproduire cette expérience au sein de cellules d'insectes. La protéine HAX1 quant à elle, interagit avec nsP1 issus de VEEV et EILV. Ce résultat est à nouveau surprenant, du fait qu'à l'heure actuelle aucun homologue de HAX1 n'a été identifié chez l'insecte. De plus VEEV, est l'alphavirus le plus éloigné génétiquement de CHIKV dans notre sélection. A l'inverse nos résultats indiquent que HAX1 n'interagit pas avec les protéines nsP1 issues de SFV et SINV phylogénétiquement beaucoup plus proches. Cette observation est particulièrement inattendue concernant SFV faisant parti du même complexe que CHIKV. Ces résultats sont toutefois préliminaires et nécessitent une confirmation par d'autres essais biochimiques.

À la vue de la colocalisation de SCRIB avec nsP1 issus de CHIKV, nous avons observé si ce marquage était conservé chez les Alphavirus testés. De manière similaire à CHIKV, les localisations subcellulaires de SCRIB-HA ont été évaluée par microscopie confocale (Fig. 56). Comme pour CHIKV, SCRIB-HA colocalise avec nsP1 au sein d'agrégats cytoplasmiques ainsi que le long des protrusions formées par nsP1 dans le cas de SFV, SINV et VEEV. Cependant nos premières observations ont montré une colocalisation similaire avec EILV se qui entre en contradiction avec les résultats d'immunoprécipitation précédents. Ici également, les images présentées sont des résultats préliminaires qui doivent encore réitérées et analysés pour affirmer avec certitude la colocalisation de SCRIB avec les différents nsP1.



**Fig. 55 Interaction de HAX1 et SCRIB avec les nsP1 des Alphavirus**

(A) Arbre phylogénétique bayésien basé sur les séquences nucléotidiques des Alphavirus. Issus de (Nasar et al. 2012).  
 (B) Les cellules HEK-293T ont été transfectées avec les constructions GFP, et GFP-nsP1<sub>WT</sub> correspondant aux alphavirus indiqués. Elles ont été ensuite traitées pour immunoprécipitation en utilisant la technique GFP-Trap.

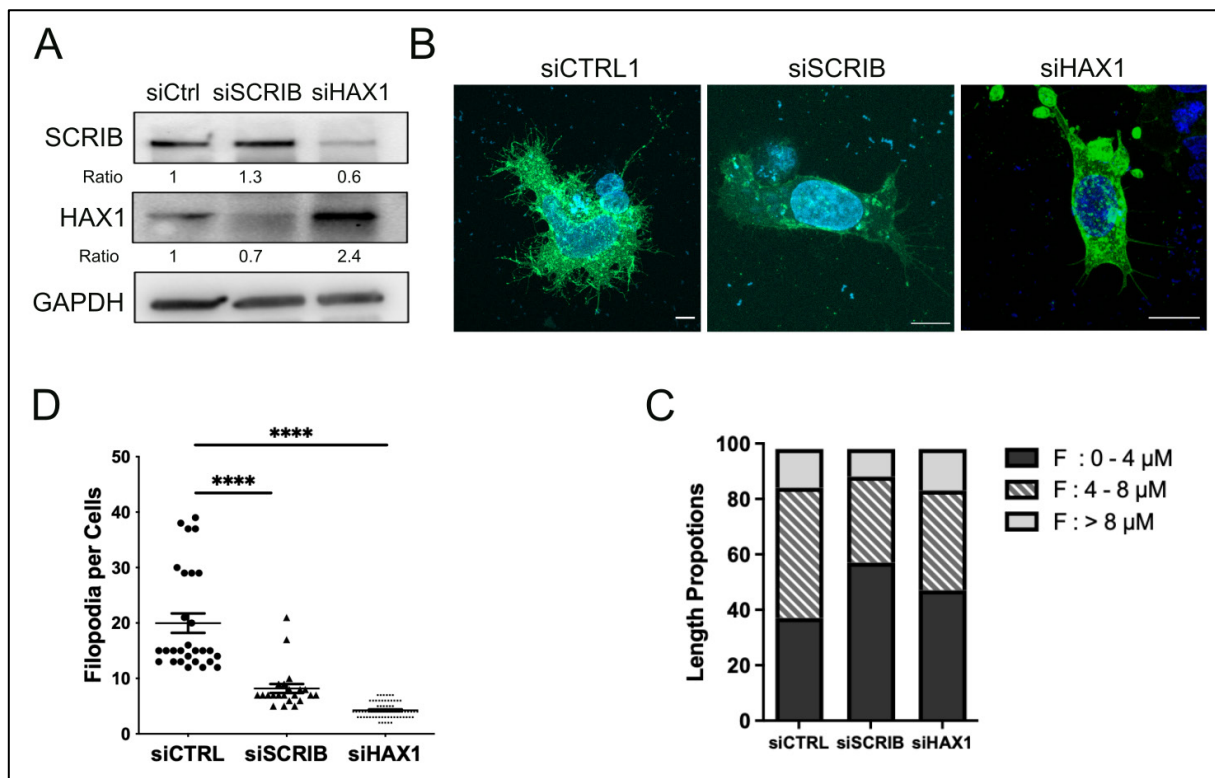


**Fig. 56 Localisation subcellulaire de SCRIB avec les nsP1 des Alphavirus**

Les cellules HeLa ont été transfectées avec les plasmides codants pour les constructions GFP. Après 24 les cellules ont été traités pour observation par microscopie confocale. Le DAPI correspond au marquage du noyaux. Les barres d'échelles équivalent à 10  $\mu$ m.

## e. HAX1 et SCRIB sont nécessaires à la formation de protrusions cellulaires induites par nsP1

Nous avons précédemment montré que la signalisation Rac1-Pak1-Arp2 est impliquée dans la formation des filopodes induits par nsP1. Aux vues des interactions décrites de HAX1 avec Rac1 et Arp2, et de SCRIB avec Rac1 et Pak1, nous avons évalué la contribution de ces deux candidats dans la fonction de déformation membranaire de nsP1 (Radhika et al. 2004b, Gomathinayagam et al. 2014). Ces protéines ont donc été invalidées par siRNA avant expression de nsP1. La diminution de l'expression des protéines ciblées a été contrôlée par analyse Western blot (Fig. 57A). Les protrusions induites dans ces cellules ont ensuite été observées en microscopie confocale, et



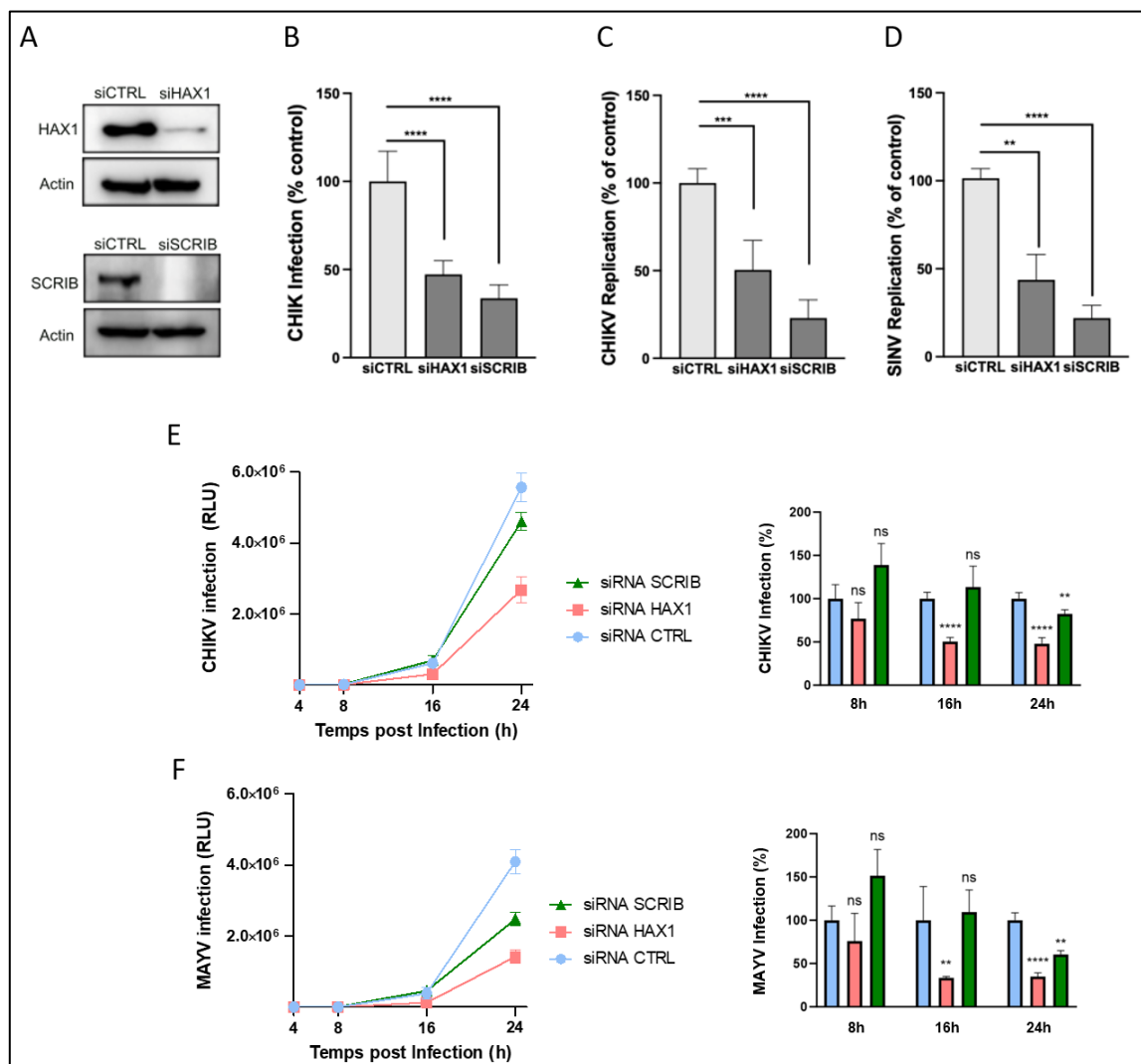
**Fig. 57 Implication de HAX1 et SCRIB dans la formation de filopodes induits par nsP1**

(A) Les cellules HEK293T ont été transfectées avec des siRNAs spécifiques de HAX1 (siHAX1), SCRIB (siSCRIB) ou des contrôles (siCtrl) pendant 48h. L'expression des protéines HAX1 et SCRIB est analysée par immunoblot à l'aide d'anticorps spécifiques. (B) Les cellules sont ensuite transfectées pendant 24h avec un plasmide codant pour GFP-nsP1<sub>WT</sub> puis analysées par microscopie confocale. La barre d'échelle correspond à 10 $\mu$ m. (C) Proportions des longueurs de protrusions mesurées dans les cellules observées en (B). (D) Nombre de protrusions par cellule observées dans chaque condition. Les protrusions ont été comptées via le logiciel Fiji et proviennent de plus de 25 cellules.

comptées et mesurées via l'utilisation du logiciel Fiji. Nous avons ainsi observé que les extensions induites par nsP1 se formaient en nombre plus restreint dans les cellules invalidées par rapport aux cellules de contrôle (Fig. 57D). Cet effet semble plus marqué pour l'invalidation de HAX1 que de SCRIB. En répartissant les protrusions mesurées en trois groupes de longueur (0-4 $\mu$ m/4-8 $\mu$ m/>8 $\mu$ m), nous n'avons pas constaté de différence significative dans la répartition de ces profils entre conditions (Fig. 57C). Par conséquent, on peut supposer que le ciblage de HAX1 et SCRIB, n'est pas spécifique à l'initiation ou à l'élongation des FLPs induits par nsP1, mais bien à une réduction de l'efficacité de ce processus dans son ensemble. En résumé, l'invalidation de HAX1 et SCRIB par siRNA inhibe la formation de protrusions médiée par nsP1.

## **f. Effets de l'invalidation de HAX1 et SCRIB sur la réplication des *Alphavirus***

Notre étude de Rac1-Pak1-Arp2, a mis en lumière que ces trois protéines étaient des actrices dans la formation de filopodes induits par nsP1 et la réplication virale. Nous avons donc souhaité évaluer l'implication fonctionnelle de HAX1 et SCRIB dans le processus viral de réplication. Pour obtenir ces résultats, nous avons réalisé une invalidation par siRNA de HAX1 et SCRIB (Fig. 58A). Après invalidation, nos cellules ont été infectées pendant 24h avec le virus rapporteur CHIKV-luc. Nos résultats ont démontré que HAX1 et SCRIB1 sont nécessaires à l'infection optimale des cellules HEK293T par CHIKV (Fig. 58B). Pour affiner notre compréhension des étapes nécessitant la contribution de ces facteurs cellulaires, nous nous sommes concentrés sur les étapes de réplication du génome viral analysées grâce à un système de génétique inverse. Ce système transréplicon est constitué de deux plasmides. L'un code pour les quatre nsPs constituant le complexe de réplication viral. Le deuxième est un plasmide rapporteur codant pour les gènes Luciférase de *Gaussia* et *Rénilla* dont l'expression est placée sous le contrôle des promoteurs génomiques et subgénomiques viraux. Si les conditions de formations du complexe viral sont réunies, la transcription et traduction de la luciférase peut avoir lieu. Ainsi la lecture du signal luciférase est considérée proportionnelle à l'efficacité de la réplication virale (Utt et al. 2015). L'utilisation de ce système de transréplication a établi le rôle essentiel de HAX1 et de SCRIB1 dans les étapes de réplication de l'ARN viral (Fig. 58C). Cet effet, est



**Fig. 58 Etude fonctionnelle de HAX1 et SCRIB au cours de l'infection par les Alphavirus.**

(A) Les cellules ont été transfectées avec les siRNAs indiqués. Après 48h, l'expression des protéines ciblées est analysée par immunoblot. Les cellules sont ensuite infectées par le virus rapporteur CHIKV-luc (B), ou transfectées avec les systèmes de transréplication de CHIKV (C) ou de SINV (D). Les cellules ont été transfectées avec des siRNAs correspondant pendant 48h. Ces cellules ont ensuite été infectées à MOI 1 avec les virus rapporteurs CHIKV-luc (E) ou MAYV-luc (F).

conservé chez SINV, un *Alphavirus* du nouveau monde ce qui laisse envisager que l'implication de HAX1 et SCRIB dans la réplication virale est une caractéristique conservée chez les *Alphavirus* (Fig. 58E). Ceci est cohérent avec nos résultats précédents montrant l'interaction entre SCRIB et la protéine nsP1 de SINV.

L'étude plus détaillée de l'effet antiviral de l'inactivation de HAX1 et SCRIB montre que ces protéines sont nécessaires à l'infection virale dès les premiers cycles de l'infection. L'inactivation de HAX1 entraîne un retard de l'infection, détectable à partir de 8h post

infection (Fig. 58E). Pour SCRIB cet effet est mesurable à partir de 16h post infection. Le même essai réalisé avec une souche rapportrice de MAYV (MAYV-luc), virus proche phylogénétiquement proche de CHIKV, a présenté les mêmes résultats (Fig. 58F).

En conclusion, nous avons résolu l'interactome de nsP1 de CHIKV. Notre étude fonctionnelle nous a permis d'identifier HAX1 et SCRIB comme de nouveaux partenaires cellulaires interagissant avec nsP1 et indispensable à une réplication optimale du génome viral dans les cellules humaines. HAX1 et SCRIB sont également essentiels à la réplication d'autres *Alphavirus*.

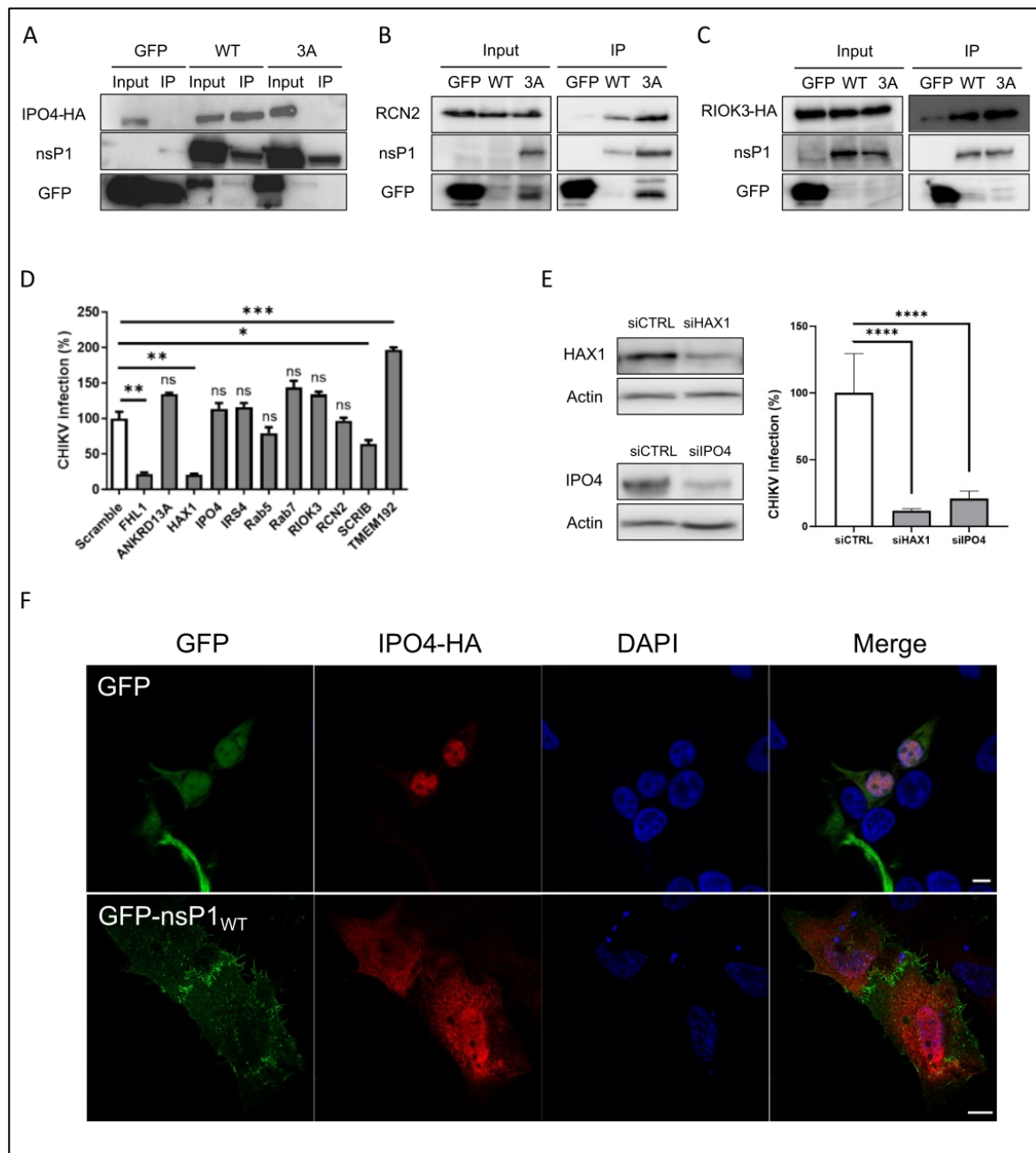
### **g. Confirmation des données protéomiques et caractérisation d'IPO4**

Comme évoqué précédemment, il est essentiel de valider les interactants identifiés dans notre crible protéomique à l'aide de techniques biochimiques. En complément de HAX1 et SCRIB nous avons confirmées nos données d'interactomique avec plusieurs candidats : IPO4 (Importin 4) spécifique à nsP1<sub>WT</sub>, et RCN2 (Reticulocalbin 2) et RIOK3 (Serine/threonine-protein kinase RIO3) qui sont communs à nsP1<sub>WT</sub> et nsP1<sub>3A</sub>. IPO4 est une protéine nucléaire impliquée dans la reconnaissance des signaux d'import vers le noyau. Elle est également impliquée dans la réplication de l'ADN cellulaire (Xu et al. 2019). RCN2, quant à elle est une protéine présente dans le réticulum endoplasmique. Elle fait partie de la famille des protéines CREC (Cab45 and ERC-55) impliquée dans le transport du calcium (Yao et al. 2023a). Enfin la protéine RIOK3 est une serine/thréonine kinase, impliquée dans la régulation de la réponse IFN-I (Feng et al. 2014). La validation biochimique de ces cofacteurs à confirmer les interactions identifiées par LC-MS/MS (Fig. 59A, B et C).

Pour évaluer l'implication fonctionnelle de nos candidats sur le cycle infectieux, nous avons réalisés une invalidation par CRISPR sur notre lignée cellulaire d'études HEK293T. Après transfection de plasmide codant pour la protéine Cas9 et deux guides ARNs par candidats, les cellules ont été infectées par le virus rapporteur CHIKV-luc. Nous avons pour cette étape sélectionnée les protéines HAX1, SCRIB, IPO4, RCN2 et RIOK3 mais aussi d'autre cofacteurs comme ANKRD13A (Ankyrin repeat domain 13A), IRS4 (Insulin Receptor Substrate 4), Rab5 (Ras-related protein Rab-5), Rab7 (Ras-related protein Rab-7), et TMEM-192 (Transmembrane protein 192). La protéine



FHL1 déjà décrite comme nécessaire à l'infection optimale de CHIKV, a été également choisie comme contrôle positif (Meertens et al. 2019). Nos premiers résultats ont



**Fig. 59 Confirmation des données protéomiques et caractérisation d'IPO4**

(A, B, C) Les cellules HEK-293T ont été co-transfectées avec les constructions GFP, GFP-nsP1<sub>WT</sub> ou GFP-nsP1<sub>3A</sub> comme indiqué et IPO4-HA ou RCN2-HA ou RIOK3-HA. Les lysats cellulaires ont été immunoprécipités par GFP-Trap. Les complexes obtenus sont analysés en immunoblots à l'aide d'anticorps anti-GFP et anti-HA. (D) Les cellules ont été co-transfectées, avec 2 ARN guides ciblant chaque candidat indiqué, et la protéine Cas9. Après tri cellulaire, les cellules transfectées ont été infectées avec le virus rapporteur CHIKV-luc à une MOI de 0,1 pendant 24h. La réplication virale est quantifiée par mesure de l'activité luciférase dans le lysat cellulaire. (E) Les cellules ont été transfectées avec les siRNAs indiqués. Après 48h, l'expression des protéines ciblées est analysée par immunoblot. Les cellules sont ensuite infectées par le virus rapporteur CHIKV-luc. (F) Analyse de

*la localisation subcellulaire d'IPO4 avec GFP, GFP-nsP1<sub>WT</sub>. Les cellules Hela ont été cotransfectées avec les plasmides codants pour IPO4-HA et les constructions GFP. Après 24h les cellules sont fixées, perméabilisées et les noyaux colorés avec le DAPI, puis observées en microscopie confocale. Les barres d'échelles équivalent à 10  $\mu$ m.*

désigné HAX1 et SCRIB parmi ces candidats comme ceux dont le ciblage à une implication fonctionnelle dans le cycle infectieux de CHIKV (Fig. 59D). Le ciblage de la protéine lysosomale TMEM-192, a quant à elle montrée un effet positif sur l'infection, suggérant une fonction antivirale de ce cofacteur.

Nous ne pouvons toutefois pas totalement écarter le rôle potentiel des autres candidats dans le cycle infectieux, l'extinction effective de ces candidats n'ayant pas été mesurée. Une illustration de ceci réside dans le fait que lors de l'étude de la protéine IPO4 via son invalidation par siRNA nous avons observés que cette protéine est nécessaire à l'infection virale (Fig. 59E) Cette implication d'IPO4 est toutefois surprenante, cette protéine étant décrite comme principalement nucléaire. nsP2 est la seule protéine virale identifiée comme pouvant transloquer dans le noyaux de la cellule hôte (Fros et al. 2010). De même nos observations par microscopie confocale ont confirmé que même en surexpression de la protéine IPO4-HA, celle-ci ne colocalise pas avec nsP1 à la membrane plasmique (Fig. 59F). Il s'agit cependant de résultats préliminaires qui nécessitent de futures confirmations.

Les résultats présentés ici ont principalement mis en avant le rôle de HAX1 et SCRIB dans la formation de protrusions et la réplication virale. Néanmoins parmi les autres candidats issus de ce crible, se trouve probablement d'autres partenaires cellulaires d'intérêt qui pourrait à l'avenir permettre de compléter notre compréhension du cycle infectieux de CHIKV ou d'élucider de nouvelles fonctions de nsP1.

## **2.3. Discussion**

La protéine nsP1 occupe plusieurs fonctions cruciales, dans le cycle infectieux des *Alphavirus*. Grâce à son activité méthylguanylyltransférase, cette protéine est en charge d'une part du coiffage des ARNs viraux protégeant le génome viral des défenses cellulaires antivirales et permet le recrutement des ribosomes et des facteurs de traductions (Laakkonen et al. 1994). D'autre part, nsP1 peut influencer sur la réponse interféron, en ciblant la voie cGAS-STING (Webb and Fernandez-Sesma 2022). Mais sa capacité à remanier les membranes de la cellule hôte constitue un phénomène

encore mystérieux bien que celui-ci soit connu depuis de nombreuses années (Peranen et al. 1995). Ainsi on peut distinguer deux types distincts de protrusions membranaires induites par nsP1.

D'une part les protrusions membranaires similaires à des filopodes, induites par l'expression isolée de cette protéine (Laakkonen et al. 1998a). Et d'autre part la formation des sphérules de répliquons dont nsP1 constitue le col (Jones et al. 2020a, Zhang et al. 2021). Chez CHIKV le rôle crucial de l'adressage membranaire de la protéine dans ces deux processus (Laakkonen et al. 1998a, Bakhache et al. 2020). Le domaine de palmitoylation de nsP1 apparaît alors comme un déterminant commun à ces deux processus. L'implication de facteurs hôtes n'a pas encore été évaluée dans la formation de protrusions et de sphérules.

Cette étude a pour objectif de mieux répondre à ces questions, en concentrant nos efforts sur l'identification de l'interactome de cette protéine sous sa forme membranaire. Notre crible protéomique a permis ainsi d'identifier 61 partenaires cellulaires de nsP1 dont 30 spécifiques de la forme palmitoylée de nsP1. Parmi ces candidats nous avons identifié des acteurs impliqués dans la régulation du cytosquelette d'actine, du métabolisme mitochondrial, ou encore impliqués dans le repliement protéique. Si la majorité des candidats identifiés ici n'avaient pas été définis jusqu'ici comme partenaires de CHIKV, certains ont déjà été décrits dans la littérature en tant que tel.

Avant l'obtention de nos résultats protéomiques, d'autres études ont tentées d'identifier les cofacteurs cellulaires de nsP1. Une étude précédente réalisée par Bouraï *et al*, a par exemple proposée via un système de double hybride de réaliser d'identifier les partenaires cellulaires de toutes les protéines virales (Bouraï et al. 2012). Leur démarche expérimentale a permis d'identifier les cofacteurs des protéines nsP2, nsP3 et nsP4 mais pas celles des autres protéines. En effet les techniques de double hybride ne sont pas adaptées à l'étude des protéines membranaires. D'une façon générale, l'identification des partenaires cellulaires de nsP1 est compliquée par le caractère monotopique de cette protéine qui interagit fortement avec les membranes cellulaires. Pour contourner cet écueil, nous avons optimisé les conditions de solubilisation de nsP1 à partir de cellules épithéliales humaines. Un crible très récent effectué par Yin et al, via une démarche similaire à la nôtre a permis d'identifier 15

cofacteurs cellulaires de nsP1 (Yin et al. 2023a). Certains résultats obtenus par les auteurs présentent des similitudes avec nos propres données. Tout comme nous, les auteurs identifient des isoformes de tubuline en interaction avec nsP1. Également, nos candidats DNAJA1 et DNAJA2 (DnaJ Heat Shock Protein Family Member A1/A2) font partie de la même famille protéique que la protéine DNAJA4 issue de leur crible. Ces protéines impliquées dans les activités chaperonnes et de repliement protéique sont également mobilisées lors de la migration cellulaire et la régulation des filaments d'actine (Liu et al. 2021). Enfin, par la protéine membranaire TIMM50 (Translocase Of Inner Mitochondrial Membrane 50), protéine impliquée dans le trafic mitochondrial a également été identifiée dans le screen des auteurs.

Parmi les voies cellulaires dans lesquelles sont impliquées les cofacteurs que nous avons décrit, la voie du métabolisme mitochondrial est l'une des plus représentée. Il est surprenant de voir autant de cofacteurs liés à cette fonction cellulaire, son implication au cours l'infection virale étant encore méconnue. Cependant il a été montré dans le cas de VEEV et SINV, que l'infection a des conséquences significatives sur le métabolisme mitochondrial (Keck et al. 2017, Rodriguez et al. 2022). De plus, les travaux de thèse de Pirjo Spuul, ont montré que le peptide en hélice- $\alpha$  de nsP1 était capable de s'associer aux membranes mitochondriales. On peut supposer que nsP1 est impliqué dans ce phénotype et il pourrait alors s'agir d'une fonction jusqu'alors non identifiée.

L'autre processus cellulaire le plus représenté dans nos données est la voie de la régulation du cytosquelette d'actine. Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur les facteurs, HAX1 et SCRIB tous deux prenant part à cette régulation. Outre le fait que leur interaction avec nsP1 est régulée par la présence des cystéines palmitoylées nécessaires à la fonction de déformation des membranes de nsP1, ces protéines sont identifiées comme des partenaires des protéines Rac1, Arp2 et Pak1 dont nous avons établi l'importance dans la fonction de déformation membranaires par nsP1. Nous avons établi que le ciblage de HAX1 et SCRIB par siRNA diminue significativement la formation (nombre et longueur) des protrusions induites par nsP1. On pourrait alors supposer que nsP1, HAX1 et SCRIB puissent servir d'intermédiaire dans le recrutement et l'activation localisée de Rac1 au niveau de la membrane plasmique et de ses effecteurs, PAK1 et Arp2/3, aboutissant à la formation de protrusions membranaires (Nola et al. 2008, Gomathinayagam et al. 2014).

Néanmoins pour confirmer ce modèle, plusieurs éléments sont manquants. D'une part, nous n'avons pas démontré de manière reproductible que l'infection par CHIKV ou l'expression de nsP1, provoque une recrudescence dans l'activation de Rac1 (0). De plus, il serait nécessaire d'évaluer le rôle de la GEF  $\beta$ -PIX, dans la formation de protrusions induites par nsP1. Cette protéine étant recrutée par SCRIB via ses domaines PDZ, elle serait essentielle dans l'activation localisée de Rac1 (Sun et al. 2016). L'implication de HAX1 et SCRIB dans le contrôle de la motilité cellulaire, pose également la question de la possible prise de contrôle de cette voie par les *Alphavirus* (Qin et al. 2005, Balcerak et al. 2019). Des expériences de notre part sont encore en cours mais les premiers résultats laissent supposer que ni l'infection par CHIKV, ni l'expression de nsP1 n'induit d'augmentation de la migration cellulaire.

Il est également nécessaire de considérer les fonctions de HAX1 et SCRIB autres que la réorganisation du cytosquelette. HAX1 est par exemple impliqué dans l'inhibition de l'apoptose induite par le stress du réticulum endoplasmique. Cette inhibition se fait par la formation d'un complexe avec la protéine chaperonne HSP90 (heat shock protein 90) (Lam et al. 2013). nsP2, nsP3 et nsP4 sont capables d'interagir avec cette chaperonne et cette interaction est nécessaire à la réplication virale. Le ciblage de HSP90 a en effet été démontré comme inhibant la synthèse du brin ARN(-) complémentaire, essentiel à la réplication du génome viral (Das et al. 2014a, Rathore et al. 2014, Go et al. 2020, Nam et al. 2021). Ainsi l'interaction de nsP1 avec HAX1 pourrait permettre le recrutement de HSP90 vers le complexe de réplication et son interaction avec les autres nsPs.

Notre étude fonctionnelle a montré que la présence de HAX1 et SCRIB est nécessaire à l'infection par les *Alphavirus*, plus particulièrement la réplication du génome viral. Cependant, nos observations ne permettent pas de conclure que l'invalidation de ces deux protéines soit délétère à la formation de sphérules de réplication de manière spécifique. Pour vérifier cela il serait alors nécessaire de vérifier l'impact de l'invalidation de nos candidats sur le nombre et la structure les organelles de réplication.

En conclusion nos résultats constituent un point de départ pour l'étude des fonctions de nsP1. Nos résultats montrent que les acteurs de régulation du cytosquelette d'actine sont impliqués dans la formation de protrusions cellulaires et la réplication

virale. Il est encore impossible d'affirmer que ces deux processus sont liés, néanmoins nos travaux illustrent le fait qu'ils possèdent des partenaires cellulaires communs. L'identification de ces candidats pourrait à terme ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques permettant de cibler la formation d'organelles de réplication.

## 2.4. Matériel et méthode

**Cellules** : Les cellules épithéliales humaines HEK293T (ATCC# CRL-3216), les cellules HeLa (ATCC# CRM-CCL2), les cellules BHK21 (ATCC# CCL-10) utilisées pour la propagation et les cellules Vero (ATCC# CCL-81) utilisées pour le titrage du virus ont été cultivées dans du milieu Eagle Dulbecco modifié (DMEM GlutaMAX, haute teneur en glucose, Thermo Fisher Scientific) supplémenté de pénicilline et de 10 % de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (FCS, Lonza). Les cultures cellulaires ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. Dans les expériences sur les médicaments, la viabilité cellulaire a été mesurée à l'aide du test de prolifération cellulaire Cell Titer 96 Aqueous one solution (Promega), conformément au protocole du fournisseur.

**Virus** : Les virus rapporteurs CHIKV-luc et MAYV-luc ont été produits à partir des souches LR2006\_OPY1 et TRVL\_4675 et contiennent le marqueur renilla luciférase inséré dans la séquence C-terminale de nsP3 (Pohjala et al. 2011, Tsetsarkin et al. 2011a, Matkovic et al. 2019). Des stocks de virus ont été produits et titrés à l'aide d'un test de formation de plages de lyse comme indiqué précédemment (Bakhache et al. 2020). Pour les infections, les cellules (70%-80% de confluence) ont été infectées à une MOI de 0,1. Après 24 heures de culture, les cellules ont été lysées avec du tampon de lyse passive (Promega). La réplication a été contrôlée à l'aide du kit de dosage de la luciférase Genofax C (Yelen Analytics). La luminescence a été mesurée directement à partir du lysat cellulaire à l'aide d'un fluorimètre Spark 10M (Tecan). Les valeurs ont été normalisées en fonction de la teneur en protéines de l'échantillon déterminée à l'aide du test BCA (Pierce).

**Plasmide et transfection** : Les systèmes de trans-réplicon d'*Alphavirus* ont été produits par le laboratoire de Andres Merits (Université de Tartu, Estonie) (Utt et al. 2019). La séquence codant pour nsP1 de CHIKV a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pCHIKV-LR-5'GFP; le fragment obtenu a été cloné dans le plasmide pEGFP-C1 (Tsetsarkin et al. 2007). Les séquences codantes pour les nsP1 de EILV, SINV, SFV et EILV ont été clonés de la même façon à partir des plasmides trans-réplicon correspondants (Utt et al. 2019). Le plasmide GFP-nsP1<sub>3A</sub> dans lequel les cystéines C417-CCC-419 sont substituées en alanine, a été généré à partir du plasmide GFP-nsP1<sub>WT</sub> à l'aide du kit de mutagenèse dirigée Quikchange d'Agilent. Les plasmides

codant pour les candidats ont été obtenus à partir de l'ORFeome via la plateforme Collection Génomique de Montpellier (MGC-CRBM Montpellier). Les séquences sont clonées dans le plasmide pcDNA5 (Invitrogen), en fusion avec le peptide HA. Les plasmides codants pour la protéine SCRIB liée au marqueur GFP ont été obtenus auprès de Jean-Michel Mesnard (IRIM, Montpellier) (Arpin-André and Mesnard 2007). Les cellules ont été transfectées avec les plasmides obtenus en utilisant le réactif JetPei (Polyplus Transfection) selon les recommandations du fabricant. Dans les expériences de co-transfection, les deux plasmides ont été co-transfectés dans un rapport de 1:1.

**siRNAs** : Les siRNA ciblant HAX1 (5'- GACAAUGAUCUUGAUUCCCAGGUUU), SCRIB (5'- GACGUGUCCCGGAACGAUA) et le siRNA contrôle (5'- GAAGAACCUAUUUCCUCUAAAU) ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich. Les siRNA et les plasmides ont été transfectés à l'aide du réactif JetPrime selon les recommandations du fabricant (Polyplus Transfection).

**Co-Immunoprécipitation par GFP-Trap** : Les cellules HEK293T ont étéensemencées à  $3 \times 10^6$  dans une flasque T75 puis ont été transfectées avec les plasmides GFP, nsP1-GFP ou nsP1-AAA-GFP. À 48h post transfection, les cellules ont été récoltées et lysées en tampon Brij96. Un dosage BCA a été réalisé pour quantifier la concentration protéique de chaque échantillon. La co-immunoprécipitation a été réalisée par GFP-Trap (Chromotek), avec une incubation de l'échantillon (500  $\mu$ g) pendant 4h à 4°C suivie de deux lavages dans une solution tampon à 150 mM NaCl et un lavage avec un tampon à 300 mM NaCl. Les billes magnétiques ont été placées à 95°C pendant 10 min avec une solution tampon Laemli 4X. Les échantillons obtenus ont été déposés sur gel polyacrylamide 10% et après migration, transférés sur membrane PVDF. Le marquage a été réalisé avec les anticorps correspondants. Pour la condition Input, 50 $\mu$ g de protéines totales ont été déposés.

**Analyse protéomique et LC-MS/MS** : Les échantillons piégés par la GFP ont été déposés sur un gel SDS-PAGE à 12 % et migrés de façon à séparer les complexes. Après coloration au bleu de Coomassie, la bande correspondante a été éluée dans 10  $\mu$ l d'une solution d'acide formique à 0,1 % et d'ACN à 2 %. Cette solution a ensuite été injectée dans un nano-débit HPLC (RSLC U3000, ThermoScientific) couplé à un spectromètre de masse ayant une source nanoESI (Q-Exactive Plus,



ThermoScientific). Les peptides ont ensuite été séparés sur une colonne capillaire (phase inverse C18, NanoViper, Dionex) ayant un gradient de 0-40% d'acide formique 0.1% et 80% ACN pendant 80 min (run de 130 min) à un débit de 300 nL/min. Les spectres ont été enregistrés à l'aide du logiciel Excalibur (ThermoScientific). Les données spectrales brutes ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel MaxQuant v1.5.5.1. La base de données spectrales utilisée pour notre analyse est RefProteome\_HUMAN-cano\_2018\_01.fasta (source UniProtKB) complétée de la séquence nsP1 CHIKV.

**Trans-réplicon** : Les plasmides codant pour la polyprotéine non structurale du CHIKV ont été cotransfectés avec le plasmide HSPoll-Fluc-Gluc (Age Utt et al., 2019) codant pour l'ARN matrice du CHIKV et contenant des séquences rapporteuses de luciférase Firefly et Gaussia placées sous le contrôle des promoteurs génomiques et subgénomiques de CHIKV. Des quantités égales de plasmides ont été transfectées dans des cellules HEK293T. Après 24 heures de culture, les cellules ont été lavées dans du PBS et lysées à l'aide du tampon de lyse passive (Promega). L'expression de la luciférase Firefly et Gaussia a été déterminée en utilisant les réactifs Genofax A ou C et un luminomètre Spark (Tecan). Les activités des rapporteurs ont été normalisées par rapport à la teneur en protéines de l'échantillon déterminée à l'aide du test BCA (Pierce).

**Immunoblotting** : Les cellules ont été lysées sur la glace dans 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100 et un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Complete ; Roche). Les lysats ont été clarifiés par centrifugation à 10 000 × g pendant 30 minutes et dénaturés à 95°C pendant 5 minutes. Les échantillons ont été séparés par SDS-PAGE puis transférés sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Hybond, Amersham). Les membranes ont été bloquées contre les liaisons non spécifiques pendant 30 min à température ambiante en présence de PBS contenant 0,5% caséine et 0,1% Tween 20, puis incubées pendant une nuit à 4°C avec des anticorps primaires. Après des étapes de lavage avec du PBS contenant 0,1% de Tween 20, les membranes ont été marquées avec des anticorps secondaires conjugués à la HRP pendant 1h à température ambiante. Après les derniers lavages, la révélation a été réalisée en incubant les membranes avec Luminata Forte (Merck).

La chémioluminescence a été détectée à l'aide d'un ChemiDoc (Bio-Rad). La densitométrie a été réalisée à l'aide du logiciel Fiji (ImageJ).

**Microscopie à immunofluorescence et analyse d'images** : Les cellules cultivées sur des lamelles de verre ont été lavées avec du PBS et fixées avec 4% de paraformaldéhyde/PBS (Sigma Aldrich) pendant 10 minutes. Pour le marquage intracellulaire, les cellules ont été perméabilisées avec 0,1% de Triton-X100 dans du PBS et incubées pendant 30 minutes avec du PBS contenant 0,2% d'albumine de sérum bovin. L'incubation avec l'anticorps primaire a été réalisée pendant 2h à température ambiante. Après plusieurs lavages avec du PBS, les anticorps secondaires ont été ajoutés pendant 1 heure. Le DAPI (Sigma-Aldrich) a été utilisé pour colorer les noyaux. Après les derniers lavages, les lames sont montées avec le milieu de montage antifade Prolong Gold (Thermo Fisher Scientific). Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal à balayage Leica SP5-SMD équipé d'un objectif à huile Leica Apochromat 63×, à ouverture numérique de 1,4, à la plate-forme d'imagerie Montpellier Resources (MRI, CRBM). L'analyse des images a été réalisée à l'aide du logiciel Fiji ImageJ.

**Analyse du nombre de filopodes** : Les sections optiques des cellules ont été imagées à des intervalles de 0,50  $\mu\text{m}$  à partir du bas de la cellule à l'aide d'un système de microscopie confocale Leica SP5-SMD. Pour chaque image, 15 à 20 sections optiques ont été enregistrées, et la projection maximum de la pile a été utilisée pour l'analyse. Le nombre et la longueur des filopodes ont été déterminés à l'aide du logiciel FIJI. Les filopodes ont été quantifiés uniquement à la périphérie des cellules. Les filopodes ont été définis comme étant des extensions cellulaires dont la longueur est  $>1 \mu\text{m}$ .

**Analyse statistique** : Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide de GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software Inc.). \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

## 3. Ciblage thérapeutique de nsP1

### 3.1. Introduction et objectifs

#### a. Contexte de l'étude

Actuellement, il n'existe pas de traitement antiviral spécifique contre l'infection par CHIKV. Toutefois, une grande diversité de stratégies décrites dans l'introduction (Chapitre 1.1.6) ont été développées pour cibler les différentes étapes du cycle viral. Parmi les cibles potentielles, on retrouve en particulier l'activité enzymatique des protéines non structurales. Au sein des nsPs, la protéine nsP1 a suscité un intérêt particulier. Cet intérêt est motivé, en premier lieu, par la fonction de coiffage des ARNs viraux assurée par l'activité enzymatique MTase-GTase, cruciale pour l'échappement du virus aux réponses antivirales de l'hôte et pour la traduction efficace du génome viral (Ahola et al. 1997). De nombreux inhibiteurs de cette activité enzymatique ont été développés. Cependant, ceux-ci se heurtent à l'acquisition de mutations de résistance favorisant l'échappement du virus.

nsP1 entretient des relations étroites avec le métabolisme lipidique de l'hôte. Les résultats antérieurs de l'équipe (Gigante et al. 2014, Bakhache et al. 2020) ont mis en évidence l'affinité de nsP1 pour les microdomaines membranaires riches en cholestérol. La perturbation du transport intracellulaire du cholestérol diminue l'interaction membranaire de nsP1 résultant dans une inhibition de la réplication virale (Gigante et al. 2014, Bakhache et al. 2020).

En collaboration avec l'équipe de María-Jesús Pérez-Pérez de l'Institut de Chimie Médicale de Madrid (IQM) qui a développé une série d'inhibiteurs de l'activité MTase/GTase de nsP1 (MADTPs) (Gigante et al. 2014), nous avons envisagé de combiner l'inhibition de l'activité enzymatique de nsP1 avec des composés capables de moduler le métabolisme du cholestérol chez l'hôte. Cette stratégie a été entreprise dans la perspective de contourner l'acquisition de mutations de résistance générés par les composés MADTPs. Dans cette démarche nous avons utilisé un composé autorisé chez l'homme pour son utilisation clinique. Il s'agit de l'imipramine, un antidépresseur capable de moduler le transport intracellulaire du cholestérol, et de modifier l'affinité

de nsP1 pour les microdomaines lipidiques de la cellule humaine (Gigante et al. 2014, Bakhache et al. 2020).

Nous avons donc étudié les effets combinatoires de l'imipramine et du MADTP-410 sur l'infection par le CHIKV.

## **b. Composés MADTPs et ciblage du coiffage viral**

Au sein du règne viral, plusieurs types de stratégies ont été mises en place pour éviter la détection par les senseurs cellulaires par le coiffage d'ARNs viraux. Dans cet objectif, les différentes espèces virales peuvent subvertir à leur avantage la machinerie de coiffage cellulaire, ou bien utiliser l'activité enzymatique de ses propres protéines virales (Decroly et al. 2012). Ainsi, cette étape représente un intérêt particulier pour la recherche de nouveaux traitements antiviraux.

L'une des raisons qui fait de l'activité de capping une cible potentielle dans le cas des alphavirus, est le fait que, chez ces derniers, la protéine nsP1 ne dispose pas de motifs canoniques et que le processus de coiffage est radicalement différent du processus cellulaire (Ghosh and Lima 2010). Dans le cas des Alphavirus, cette piste a été relativement peu explorée. En 1999 Lampio *et al*, ont élaboré, un crible de 50 analogues de coiffes, dans l'idée de trouver une molécule qui agirait en compétition avec la coiffe virale et donc d'inhiber la traduction des ARNs viraux (Lampio et al. 1999). Les résultats obtenus ont permis d'identifier plusieurs candidats efficaces dans le cas de l'infection SFV. En 2018, un crible effectué sur 3051 composés a permis d'identifier plusieurs molécules qui avaient pour effet de bloquer l'activité MTase-GTase de nsP1. Certains de ses composés, dérivés des acides lobariques ont montré leur efficacité sur la réplication de CHIKV et SINV *in vitro*.

Les composés les plus avancés dans ce domaine sont ceux de la série de composés MADTPs. En 2014 Gigante *et al* ont publiés les résultats d'un crible visant à identifier des inhibiteurs de l'infection à CHIKV à des concentrations non cytotoxiques sur cellules simiennes Vero (Gigante et al. 2014). Parmi les échantillons testés, TP274 a montré le plus d'efficacité et ce, via un type de molécule particulières, les [1,2,3]Triazolo[4,5-d]pyrimidin-7(6H)-1 ou triazolopyrimidines. Ces composés relativement faciles à synthétiser ont été prouvés efficaces sur plusieurs souches de CHIKV, mais relativement infructueux face à SINV ou SFV. Cette série de composés

a été, par la suite, déclinée en plusieurs analogues chimiques sous le nom de MADTPs dans l'objectif de renforcer leur effet antiviral (Delang et al. 2016). Il a été ainsi montré que ces composés n'avaient pas d'effets sur les étapes d'entrée, de transcription, et de traduction du cycle viral. C'est à l'aide d'essais enzymatiques que les chercheurs ont pu identifier que ces composés ciblent les étapes de coiffage des ARNs viraux, en particulier l'activité GTase, chez CHIKV, mais également VEEV. Il a également été observé qu'une mutation ponctuelle dans la séquence de nsP1 sur l'acide aminé en position 34 induisait une résistance à ces composés chez CHIKV et VEEV. En 2017, l'évaluation d'une nouvelle série d'analogues a été publiée, prouvant une efficacité supérieure sur l'inhibition de la réplication de plusieurs isolats de CHIKV (Gigante et al. 2017). La poursuite du développement de nouveaux analogues dans le but d'améliorer leurs caractéristiques physico-chimiques, a permis par la suite l'identification de nouveaux composés MADTPs, efficaces à très faible concentration sur plusieurs souches de CHIKV, et peu toxique sur plusieurs lignées cellulaires (Gómez-SanJuan et al. 2018). C'est de cette dernière série d'analogues qu'est issu le composé MADTP-410 que nous avons testé.

En conclusion, bien que prometteurs, les composés MADTPs présentent néanmoins le désavantage d'être inhibés par une unique mutation, ce qui lui confère une barrière de résistance faible.

### **c. Imipramine et ciblage des voies du cholestérol**

Au cours de la décennie précédente, un lien étroit a été mis en évidence entre le métabolisme des lipides et la réplication virale. En effet, les virus peuvent reprogrammer la signalisation, la synthèse et le métabolisme des lipides pour générer de l'ATP, étendre les membranes cellulaires ou remodeler le contenu lipidique des membranes. Ces modifications permettent aux virus de constituer un environnement optimal pour la réplication virale. Ceci peut s'expliquer par le rôle central des membranes dans les étapes d'entrée, d'assemblage ou de bourgeonnement du cycle viral (Lorizate and Kräusslich 2011). Le fait que les virus à ARN(+) forment des organelles de réplication à partir des membranes hôtes ne fait que renforcer ce constat. Dans ces compartiments, les protéines de réplication virale constituant le complexe de réplication possèdent des affinités bien définies à des espèces lipidiques précises (de Castro et al. 2013). Ces lipides membranaires peuvent être divisés en

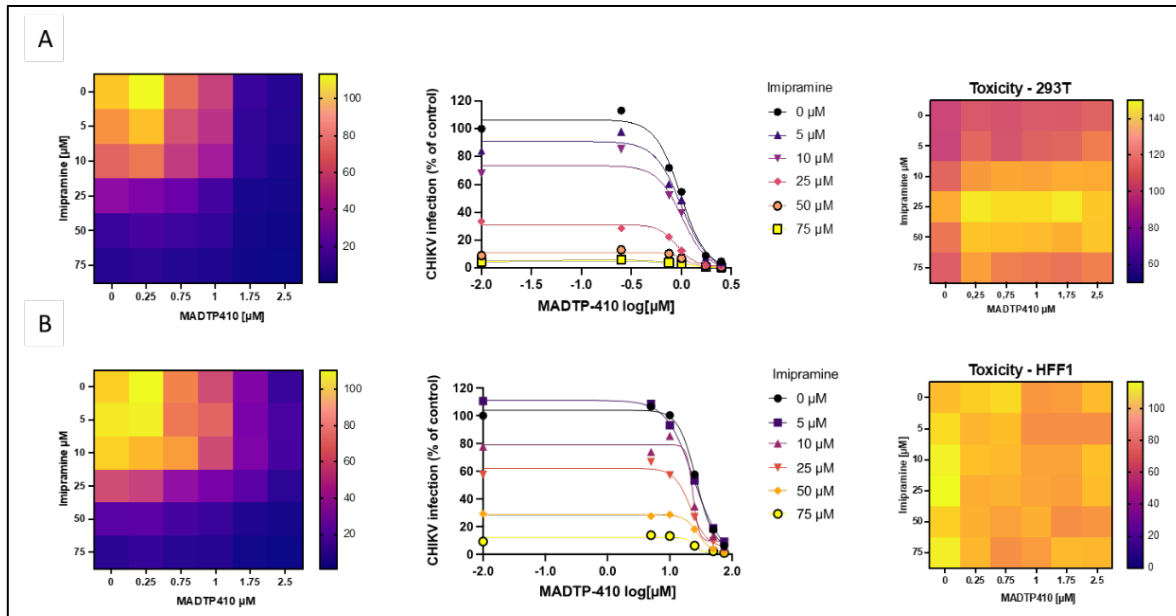
trois catégories, les phospholipides, les glycolipides, et les cholestérols. Le cholestérol joue un rôle unique au sein de la membrane cellulaire, en régulant la fluidité et la perméabilité de la bicouche lipidique. Chez les vertébrés, il est synthétisé *de novo* au sein du réticulum endoplasmique puis, transite vers la membrane plasmique par un transport endosomal (Infante et al. 2008). Le cholestérol est ainsi regroupé en radeaux lipidiques servant de plateformes à de nombreuses étapes du cycle viral (endocytose virale, bourgeonnement ou encore assemblage et fonction des complexes de réplifications viraux (Mackenzie et al. 2007, Mercer et al. 2010, Stoeck et al. 2018).

Chez CHIKV, l'ancrage du complexe de réplication médié par nsP1 s'opère préférentiellement dans les microdomaines riches en cholestérol (Bakhache et al. 2020). Cette interaction est médiée par le domaine de palmitoylation de nsP1. Au sein de notre équipe, nous avons démontré que l'utilisation d'inhibiteurs chimiques de la voie de régulation du cholestérol avait un effet significatif sur l'association membranaire de nsP1. Ces composés modulent également l'adressage de la totalité du complexe de réplication virale vers ces compartiments. Enfin, ils inhibent la réplication virale de CHIKV (Wichit et al. 2017). Parmi ces inhibiteurs, l'imipramine, une molécule inhibant le transfert du cholestérol vers les transporteurs endosomaux, s'est montrée particulièrement efficace. Le traitement par l'imipramine redirige nsP1 au sein des endosomes riches en cholestérol ce qui s'avère délétère pour la réplication virale. La molécule imipramine a l'avantage d'être déjà utilisée en médecine humaine en tant qu'anti déprimeur (Kuhn 1958).

#### **d. Objectifs**

Dans ce projet secondaire, mon objectif a été d'évaluer le potentiel antiviral du traitement combiné de l'Imipramine et du composé MADTP-410 sur l'infection de lignées cellulaires humaines par CHIKV. Notre objectif est d'évaluer si la combinaison des deux traitements exerce un effet additif ou synergique, et permet l'utilisation de doses de MADTP n'induisant pas l'acquisition de mutations de résistance. Pour cela, j'ai mesuré les effets antiviraux et cytotoxiques de diverses combinaisons de ces molécules sur une lignée de cellules épithéliales (HEK-293T) et de fibroblastes (HFF-1) humains.

## 3.2. Résultats et discussion



**Fig. 60** Combinaison de traitements MADTP-410 et Imipramine sur l'infection par CHIKV.

Effets de combinaison de traitement sur l'infection par CHIKV sur cellules HEK-293T (A) et HFF1 (B). Représentation en heatmap (Gauche) et en graphique (Centre) de l'effet de la combinaison de drogue sur l'infection virale. (Droite), évaluation la cytotoxicité du traitement sur les cellules. Les cellules ont été prétraitées pendant 2h, puis infectées pendant 6h avec CHIKV-luc MOI 1. Chaque combinaison de drogue est une moyenne de deux points.

Pour réaliser notre étude, nous avons réalisé des matrices de traitements en se basant sur les concentrations qui se sont préalablement montrées efficaces sur l'infection par CHIKV (Bakhache et al. 2020). De même un temps de traitement court a été choisi pour éviter d'étudier l'effet antiviral de ces composants sur un seul cycle d'infection.

Nous avons utilisé deux lignées cellulaires humaines, les cellules HEK293T et HFF1, toutes deux susceptibles à l'infection à CHIKV et déjà utilisées dans ce cadre expérimental (Wikan et al. 2012, Wichit et al. 2019). Dans le cas des HEK293T, nos résultats ont démontré que la combinaison de l'imipramine avec MADTP410 induisait un renforcement de l'effet antiviral de ces molécules (Fig. 60A). Les tests de viabilité indiquent que les concentrations testées n'affectent pas significativement la survie cellulaire. Dans le modèle HFF1, des observations similaires ont été réalisées, indiquant une potentialisation de l'activité antivirale du MADTP410 utilisé à la concentration de 2,5  $\mu\text{M}$  par 75 $\mu\text{M}$  d'Imipramine et (Fig. 55B). Ici également, aucune

mortalité cellulaire significative n'a été observée dans ces conditions. On peut ainsi en conclure que dans le cas d'un traitement de ces deux lignées cellulaires, la combinaison de traitements Imipramine et MADTP410 permet un gain d'activité antivirale.

Ces résultats ne sont que le début de la démarche expérimentale nécessaire à l'établissement d'une approche thérapeutique combinée. L'évaluation des effets du traitement sur des cellules primaires pourrait, par exemple, permettre de valider l'intérêt de cette approche dans des conditions plus proches de la physiologie. De plus, il serait nécessaire de mesurer l'efficacité de cette approche combinée sur les souches résistantes au traitement par les composés MADTPs déjà mises en évidence (Delang et al. 2016), et également l'apparition de résistances de manière générale. Enfin, des études *in vivo* sur l'innocuité de ce traitement, la clairance des molécules et le gain thérapeutique sont absolument nécessaires. Ces résultats valident cependant l'intérêt de combiner l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'activité enzymatique de nsP1 avec celle de ses cofacteurs cellulaires.

### 3.3. Méthodes

**Culture cellulaire :** Les cellules HEK293T (ATCC# CRL-3216) et HFF1 (ATCC# SCRC-1041) ont été cultivées en milieu Eagle Dulbecco modifié (DMEM GlutaMAX, high glucose, Thermo Fisher Scientific) supplémenté de pénicilline et avec 10% de sérum de veaux inactivé par la chaleur (FCS, Lonza). Les cellules ont été cultivées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

**Virus :** Le virus rapporteur CHIKV-luc a été produit à partir du clone génomique CHIKV pICRES1 (souche LR2006\_OPY1). Il contient un gène rapporteur luciférase *renilla* inséré dans la séquence nsP3 (CHIKV-luc) (Pohjala et al. 2011). Des stocks de virus ont été produits et titrés par formation de plages de lyse (Bakhache et al. 2020).

**Traitement chimique :** Les échantillons MADTP-410, ont été fournis par l'équipe de María Jesús Pérez Pérez Maria. L'imipramine provient d'Abcam. Ses deux composés ont été resuspendus en Diméthylsulfoxyde (DMSO) puis stockés à -20°C.

**Infection virale :** Les cellules ont étéensemencées la veille dans des plaques 96 puits à 4\*10<sup>4</sup> cellules par puit. Les cultures ont été prétraitées pendant 2h à 37°C avec les différentes combinaisons de MADTP-410 et d'Imipramine. Les cellules ont ensuite été



infectées à une MOI de 1 pendant 6h à 37°C en maintenant le traitement chimique. Les cellules ont ensuite été lysées avec du tampon de lyse passive (Promega). La réplication a été mesurée par dosage de l'activité luciférase lysat cellulaire à l'aide du kit Genofax C (Yelen Analytics) et d'un luminomètre Spark 10M (Tecan). Les valeurs ont été normalisées en fonction de la teneur en protéines de l'échantillon déterminée à l'aide d'un test BCA (Pierce).

**Essais de viabilité** : De manière similaire à l'essai d'infection, les cellules ont été traitées pendant 8h avec les composés chimiques. La viabilité cellulaire a été mesurée par l'utilisation du kit Cell Titer 96 Aqueous one solution cell proliferation assay (Promega).

# Chapitre 3. Discussion Générale et Résultats complémentaires

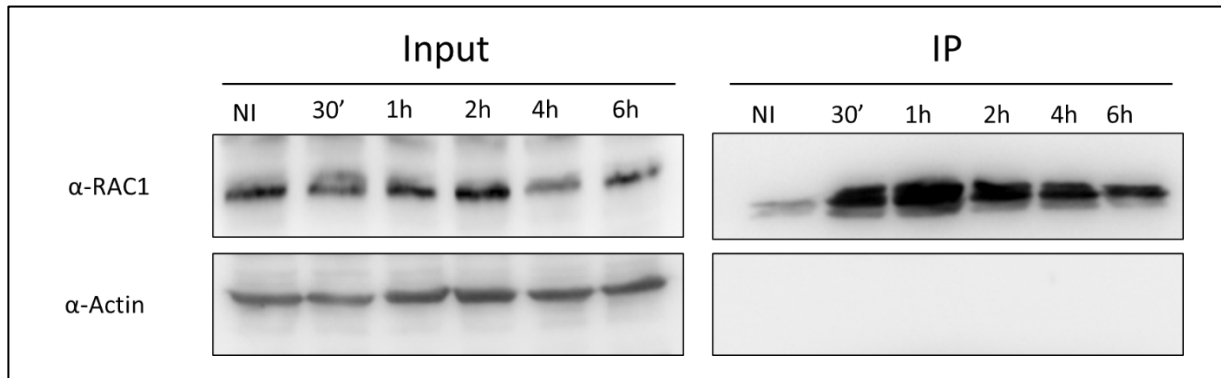
## 1. L'importance de la voie Rac1 dans le remodelage membranaire

Il a été observé depuis longtemps que l'infection des cellules de mammifères par les *Alphavirus* réorganise de manière profonde les membranes cellulaires (Birdwell et al. 1973). D'une part, par la formation de protrusions membranaires de type FLPs par les protéines virales et d'autre part, par l'aménagement des niches répliquatives que constituent les sphérules (Laakkonen et al. 1998b, Martinez et al. 2014b, Girard et al. 2023b). Nous avons pu identifier que dans ces deux phénotypes, les acteurs importants de la régulation du cytosquelette d'actine y jouent un rôle crucial. Dans les processus cellulaires de remodelage du cytosquelette, les Rho-GTPases sont les chefs d'orchestres, et leur capacité d'agir comme plateforme d'interaction avec une myriade de facteurs cellulaires en est la clé. Cette signalisation agit à la manière d'un interrupteur, régulée par des facteurs activateurs ou inhibiteurs (GAPs ou GEFs), ainsi que par leur adressage subcellulaire (via les GDIs) (Wennerberg et al. 2005). Les trois Rho-GTPases les plus étudiées dans ce contexte sont RhoA, Rac1, et Cdc42 respectivement associés de manière générale à la formation de fibres de stress, de lamellipodes et de filopodes (Seetharaman and Etienne-Manneville 2020). De manière surprenante et contre-intuitive nos résultats montrent que de ces trois acteurs, c'est Rac1 qui a le plus d'influence sur la formation de protrusions cellulaires induite par nsP1 et la réplication virale. On peut cependant expliquer en partie ces résultats. D'une part les voies Rho-GTPases possèdent un certain nombre d'effecteurs communs, permettant la mise en place d'un dialogue complexe encore majoritairement mal compris (Seetharaman and Etienne-Manneville 2020). On compte par exemple la protéine PAK1, effectrice de Rac1, mais également de Cdc42 (Kameritsch et al. 2015). D'autre part, nos observations montrent que l'expression de nsP1 induit chez les cellules transfectées la formation des protrusions larges semblables à des lamellipodes qui, lors de leur rétractation, laissent place à des protrusions fines de type FLPs. Dans le contexte cellulaire, il a été décrit que la formation d'un réseau d'actine

arborescent amenant à la formation de lamellipodes favorise la formation de filopodes par élongation convergente (Yang and Svitkina 2011).

Chez les Alphavirus, l'implication dans le cycle viral de Rac1 ainsi que de deux de ces effecteurs Arp3 et PIP5K1- $\alpha$  a déjà été pointé par des travaux antérieurs (Radoshitzky et al. 2016). A l'issue d'un crible par siRNA, les auteurs ont identifié que ces régulateurs du cytosquelette d'actine sont nécessaires au cycle viral de VEEV et d'autres Alphavirus dont CHIKV. Cependant, contrairement à nos résultats, la contribution de Rac1 et de ses effecteurs dans le cycle infectieux est attribuée à une régulation des étapes tardives du cycle infectieux. Le rôle ces partenaires dans le cycle viral serait lors de la translocation de la glycoprotéine d'enveloppe E2 depuis le Golgi vers la membrane plasmique et impactera donc les étapes d'assemblage de la particule virale. En se basant sur l'utilisation d'une lignée chroniquement infectée par le CHIKV (BHK-NCT), cette étude rejette l'implication de Rac1 dans les étapes de réplication virale. A l'inverse, nos observations décrivent le rôle de Rac1 et du complexe Arp2/3 dans les étapes de réplication de l'ARN viral. Nos résultats n'excluent néanmoins pas la possible implication de cette voie dans les étapes tardives du cycle viral. Les résultats contradictoires de nos deux études se justifient par les différents modèles expérimentaux utilisés. La lignée BHK-NCT est chroniquement infectée par un mutant de CHIKV non cytotoxique alors que la transfection du système de génétique inverse utilisé dans nos expériences semble mimer plus fidèlement les étapes précoces du cycle infectieux.

Au vu du rôle de Rac1 dans les déformations induites par nsP1 de même que dans la réplication virale, on peut supposer que l'infection par CHIKV induit une activation de cette Rho-GTPase. Certains virus sont, en effet, capables, au cours de leur cycle infectieux d'activer à leur profit cette Rho-GTPase, comme c'est le cas par exemple de DENV, HSV ou de HIV (Lu et al. 1996, Dadke et al. 2003, Van den Broeke et al. 2009b, Zamudio-Meza et al. 2009). Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé le kit *Rac1 activation Magnetic beads pulldown assay* (Merck), qui permet l'immunoprécipitation de la protéine Rac1 dans son état activé.



**Fig. 61 Activation de la Rho-GTPase par CHIKV.**

*Des cellules HEK293T ont été déprivées en sérum pendant 15h avant d'être infectées à MOI 10 par la souche CHIKV-luc. Aux temps indiqués, les cellules ont été récoltées et lysées. Les échantillons ont été analysés par immunoblot (Input), ou soumis à une immunoprécipitation des formes Rac-GTP activées (IP). La révélation a été effectuée à l'aide de l'anticorps Anti-Rac1, clone 23A8 fourni.*

Pour cela nous avons infecté des HEK293T pendant des temps variables (T0, 30min, 1h, 2h, 4h, 6h). La voie Rac1, comme d'autres voies de signalisation, sont hyperactivées dans les lignées cellulaires cancéreuses (Baker et al. 2020). Pour pouvoir mesurer l'activation de Rac1, nous avons placé nos cellules en carence nutritive 16h avant infection en incubant les cellules en milieu dépourvu de sérum. Les lysats cellulaires préparés à partir de ces cultures sont précipités à l'aide de billes magnétiques couplées au domaine de liaison de PAK1, capables de lier spécifiquement la forme de Rac1 active liée au GTP. Dans ces conditions, nos résultats indiquent, que l'infection par CHIKV induit une activation précoce (entre 0 et 30 minutes post infection) et durable de Rac1. Cette activation semble maintenue tout le long du cycle infectieux dans les étapes tardives. Cependant, nous n'avons pas réussi à reproduire ces observations. L'utilisation d'approches complémentaires pour mesurer l'activation de Rac1 apparaît comme essentielle pour faire la lumière sur sa contribution exacte au cycle viral. Des approches de FRET (Förster resonance energy transfer), conduisant à des résultats identiques ont été entreprises au laboratoire.

L'identification de l'implication des effecteurs PAK1 et SCRIB dans le cycle infectieux, permet de renforcer l'hypothèse d'une activation de Rac1 par CHIKV. En contexte cellulaire, il a été en effet montré que PAK1 après avoir été activé par Rac1, peut s'associer avec la GEF  $\beta$ -PIX, permettant alors une boucle d'activation positive de Rac1. De plus, SCRIB qui, comme nous l'avons décrit peut interagir via ses domaines

avec nsP1, est susceptible d'induire le recrutement de ce complexe PAK1- $\beta$ -PIX (Nola et al. 2008, Momboisse et al. 2009).

## **2. Rôle fonctionnel des protrusions induites par nsP1**

Malgré leur description ancienne, le rôle des protrusions induites par nsP1 reste encore inconnu. Plusieurs questions se posent : Ces structures sont-elles nécessaires à certaines étapes du cycle viral (entrée, réplication, assemblage/bourgeoisement, propagation de cellules à cellules), ou bien sont-elles de simples externalités de ce cycle, symptômes d'un bouleversement organisationnel de la cellule hôte ? Sont-elles un prérequis du remodelage membranaire nécessaire à la formation d'organelles de réplication ? Enfin : sont-elles impliquées dans l'évitement immunitaire de la cellule hôte ?

Au regard du fait que ces protrusions sont des sites de bourgeoisements, on peut imaginer que ces protrusions agissent de manière similaire aux longues extensions en participant à la propagation virale (Martinez and Kielian 2016, Jose et al. 2017a, Girard et al. 2023a). Une autre hypothèse, au regard de ce phénotype, est également le fait que les particules bourgeoisantes situés au niveau des protrusions courtes sont protégées de l'internalisation par des CPV-I (Spuul et al. 2010). Enfin, il est également possible que la formation de ces protrusions favorise la réinfection des cellules, en permettant le surfing des particules virales.

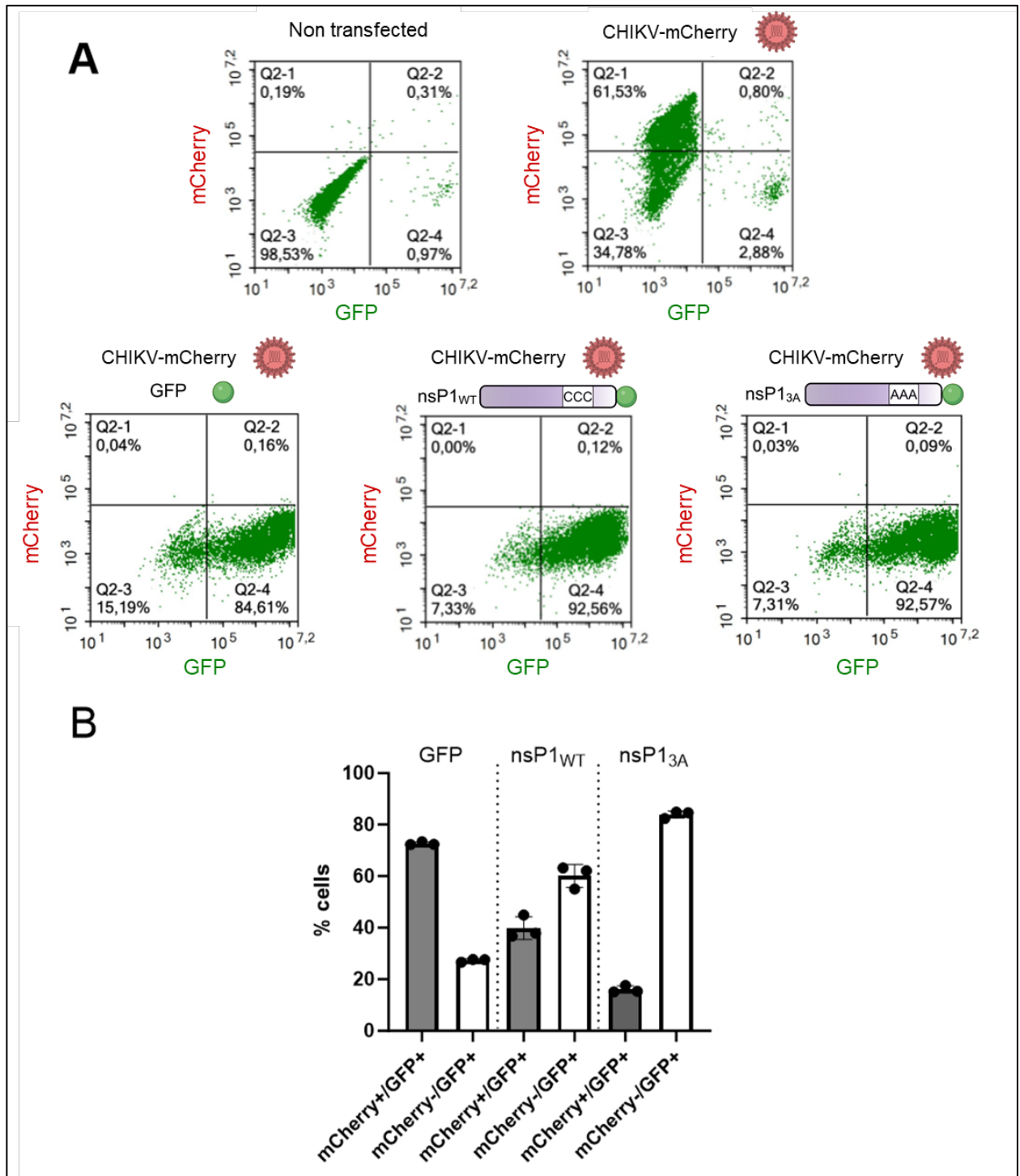
Il convient de rappeler que ces hypothèses ne sont pas aisées à vérifier. Si toutefois, le ciblage par mutations des protéines structurales permet l'observation d'un virus répliquatif mais peu ou pas productif, le ciblage de nsP1 est considérablement plus complexe au vu de son rôle central dans les premières étapes du cycle viral.

Pour tester le rôle éventuel des filopodes formés par nsP1, nous avons infecté des cellules préalablement transfectées avec les constructions GFP-nsP1<sub>WT</sub>, GFP-nsP1<sub>3A</sub> ou le contrôle GFP. En infectant ces cellules à un temps court nous souhaitons observer si la présence ou l'absence de protrusions sont favorables ou délétère aux premières étapes du cycle viral. Pour mesurer cet effet nous avons utilisé la

cytométrie en flux ainsi que la souche CHIKV-mCherry décrite précédemment (Kümmerer et al. 2012).

Nos résultats obtenus montrent qu'avec une efficacité de transfection proche (>80%), la part de cellules infectées par notre souche CHIKV diminue lors de la surexpression de GFP-nsP1<sub>WT</sub>. Cette inhibition est encore marquée lorsque les cellules surexpriment GFP-nsP1<sub>3A</sub>. Ces résultats semblent donc indiquer que la surexpression de nos constructions nsP1 est délétère au cycle viral de CHIKV. Cet effet inhibiteur semble s'exercer sur les étapes précoces et intermédiaires de l'infection, situées entre la reconnaissance des récepteurs viraux nécessaires à l'entrée et la traduction des protéines virales.

L'une des hypothèses possibles de ce phénotype est que les protéines surexprimées entrent en compétition avec la machinerie de réplication formée par le virus infectieux. De ce fait, la protéine nsP1 surexprimée pourrait entrer en compétition avec la polyprotéine partielle P123 pour former un complexe avec nsP4 et ainsi nuire à la formation des complexes de répliquons fonctionnels. On peut également envisager que la forme surexprimée de nsP1 perturbe la stœchiométrie des protéines virales favorables à l'assemblage du dodécamère nsP1 (Jones et al. 2020a, Zhang et al. 2021). Toutefois, l'effet d'inhibition plus marqué observé pour la protéine GFP-nsP1<sub>3A</sub> ne semble pas corroborer cette hypothèse. En effet, la perte de palmitoylation abolit l'interaction membranaire et dirige ce mutant vers le compartiment cytosolique (Bakhache et al. 2020) alors que les formes dodécamériques s'assemblent en interaction avec les membranes cellulaires (Jones et al. 2020a, Zhang et al. 2021). Ainsi, l'interférence consécutive à la surexpression de GFP-nsP1<sub>3A</sub> pourrait être reliée aux interactions cytosoliques de nsP1. Enfin, on ne peut pas exclure que cette interférence pourrait reposer sur une perturbation de l'évitement des défenses de la cellule hôte, comme par exemple la capacité de nsP1 à antagoniser la voie cGas-STING (Webb and Fernandez-Sesma 2022).



**Fig. 62 Effets de la surexpression de la protéine nsP1 sur l'infection par CHIKV.**

Les cellules HEK293T ont été transfectées avec les plasmides codant pour GFP-nsP1<sup>WT</sup>, GFP-nsP1<sub>3A</sub> ou le contrôle GFP. Après 24h, ces cellules ont été ensuite infectées avec la souche CHIKV-mCherry à MOI 10. Six heures après infection, ces cellules sont analysées en cytométries pour les marqueurs GFP et mCherry (A). (B) Pourcentage normalisé des cellules infectées (mCherry+) et non infectées (mCherry-) détectées parmi la population de cellules transfectées (GFP+). Chaque barre est la moyenne d'un triplicat biologique, et chaque point a été mesuré à partir d'un échantillon de 2\*10<sup>4</sup> de cellules.

Ces résultats sont néanmoins en accord avec des observations antérieures effectuées par l'équipe d'Andres Merits (Kiiver et al. 2008). En effet, il a été observé par Kiiver et al. que chez SFV, l'expression de la protéine nsP1 ainsi que d'une protéine mutée sur le site de palmitoylation étaient délétères à la réplication virale. A l'aide d'un système d'expression inductible, les auteurs ont observé que l'expression de ces protéines n'avait pas d'effet sur la viabilité, la traduction ou la transcription cellulaire. A l'inverse, l'expression de nsP1 ou nsP1 mutée, a montré des effets négatifs sur la synthèse et la traduction des ARNs viraux, mais sans conséquences sur l'entrée ou l'initiation de la réplication virale. Plus précisément, la protéine WT a été décrite comme induisant un retard de synthèse et de traduction des ARNs viraux génomiques, alors que la protéine mutée induisait un effet plus marqué et plus durable sur les ARNs génomiques et subgénomiques. On ignore de manière précise le processus moléculaire derrière cette interférence, son élucidation contribuerait grandement à notre compréhension des premières étapes du cycle réplcatif et pourrait constituer une possible piste thérapeutique.



### 3. Modèle d'interaction avec les facteurs cellulaires

La capacité de déformation membranaire de nsP1 peut être médiée de deux façons. D'une part, via les propriétés intrinsèques de la protéine : ses domaines d'ancrage membranaires et sa structure. La première approche est illustrée par l'oligomérisation de nsP1 aux cols des sphérules (Jones et al. 2020a, Zhang et al. 2021). Dans ce cas, c'est la polymérisation de la protéine couplée à ces sites d'ancrages membranaires qui permet de stabiliser la courbure de la membrane plasmique (Tan et al. 2022).

A l'inverse, la deuxième approche demeurerait en grande partie inconnue et relativement peu explorée jusqu'à ces dernières années. Cependant, nos résultats relatifs à la formation de FLPs induits par nsP1 soulèvent le rôle crucial de la voie Rac1-Pak1-Arp2 dans ces déformations de même que dans la réplication virale. Ainsi, le recrutement de facteurs cellulaires par nsP1 est crucial à ses fonctions de déformations ce qui a motivé la mise en œuvre de l'étude protéomique de ce projet.

On peut expliquer l'absence relative d'études protéomiques précédant nos travaux par la difficulté de purification de la protéine nsP1, qui a une haute affinité avec les membranes cellulaires. Ainsi, la mise en place de notre protocole a nécessité l'utilisation du tampon Brij96, permettant une meilleure solubilisation que les autres détergents usuels comme le Triton X-100. Cela peut expliquer le fait que l'étude de interactomique précédente effectuée par Bourai *et al* n'a pas pu identifier de cofacteurs cellulaires de nsP1 (Bourai et al. 2012). Une autre étude protéomique a récemment été effectuée par Yin *et al*, sur l'ensemble des protéines virales avec une méthode proche de la nôtre (immunoprécipitation par GFP trap et spectrométrie de masse en tandem) (Yin et al. 2023c). Les cofacteurs de nsP1 identifiés par les auteurs sont en nombre plus restreint et de nature différentes que ceux que nous avons caractérisés. Cependant, certains cofacteurs identifiés par les chercheurs sont liés à des processus cellulaires similaires avec notre propre étude : métabolisme mitochondrial et la régulation du cytosquelette.

Au vu du rôle de la palmitoylation de nsP1 dans sa capacité à déformer les membranes cellulaires et dans le cycle viral, notre démarche expérimentale s'est concentrée sur l'identification des facteurs interagissant avec cette protéine dans sa forme membranaire. L'utilisation des constructions GFP-nsP1<sub>WT</sub> et GFP-nsP1<sub>3A</sub> combinée à

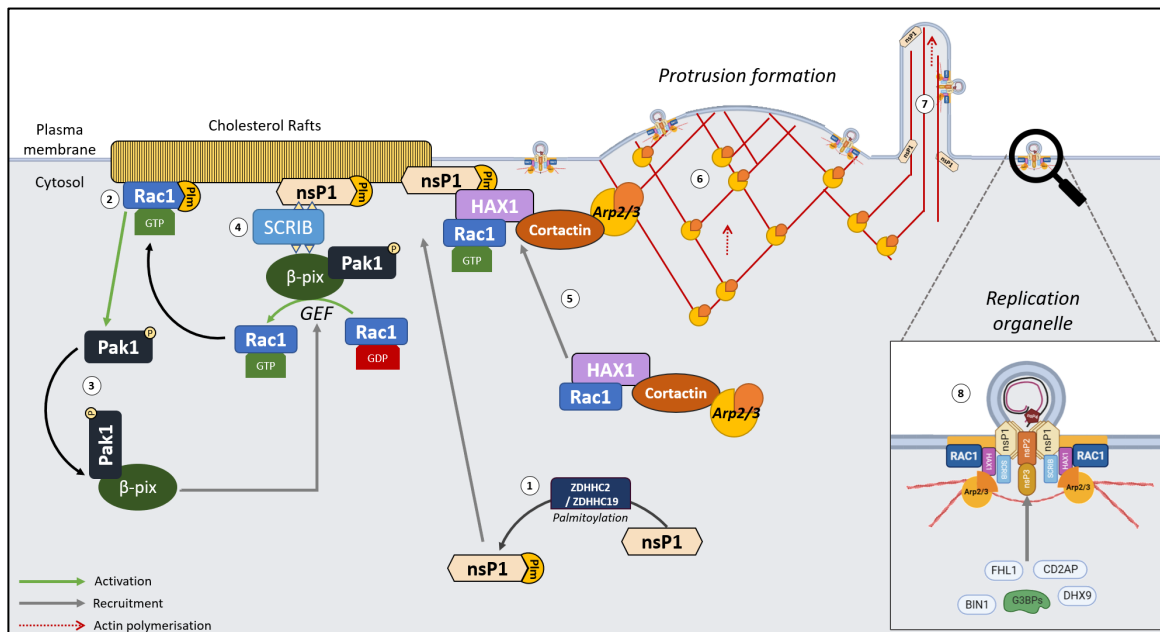
l'immunoprécipitation par GFP-trap, combinée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) nous a permis l'identification de plus de 300 facteurs cellulaires interagissant exclusivement avec la protéine palmitoylée. Ainsi, nous supposons que les interactions entre la protéine palmitoylée et les cofacteurs se déroulent à proximité des ilots lipidiques riche en cholestérol ou cette forme de nsP1 est adressée (Bakhache et al. 2020). Parmi les familles de protéines identifiées, ont été trouvées des régulateurs du cytosquelette d'actine. L'étude de deux de ses protéines HAX1 et SCRIB à montrer qu'il s'agit de deux facteurs nécessaires à la formation de protrusions par nsP1 ainsi qu'à la réplication virale. Le ciblage de ces deux acteurs ayant les mêmes conséquences que les cofacteurs précédemment identifiés, on peut supposer que leur interaction avec nsP1 est liée à la voie Rac1-Arp2-Pak1. De plus, le fait que ces cinq facteurs de régulation du cytosquelette d'actine, soient impliqués à la fois dans la formation de FLPs par nsP1 ainsi que dans réplication virale, permet de renforcer l'hypothèse que la capacité de nsP1 à former des protrusions est directement liées à la formation de sphérule. Ses deux phénotypes sont-ils unis par un lien de causalité, de corrélation ou s'agit-il de processus complètement différents ? Nos données actuelles ne nous permettent pas de trancher cette question. Seule l'identification de conditions ou facteurs cellulaires induisant un seul phénotype et non l'autre permettra de trancher cette question.

Néanmoins, en combinant nos données avec celles déjà présentes dans la littérature, nous pouvons esquisser l'ébauche d'un modèle d'interaction entre nsP1 et ses différents cofacteurs :

Tout d'abord, les radeaux lipidiques riches en cholestérol peuvent constituer une plateforme d'interaction entre ces facteurs. D'une part nsP1 qui est palmitoylée par les palmitoyl-transferase ZDHHC2 et ZDHHC19, est adressé aux membranes riches en cholestérol (Zhang et al. 2019, Bakhache et al. 2020). La Rho-GTPase Rac1 lorsque dans son état actif lié au GTP peut subir la même modification post traductionnelle pour être adressée vers ces mêmes radeaux lipidiques (Navarro-Lérida et al. 2012, Moissoglu et al. 2014). La présence de HAX1 dans ces compartiments n'est, à ce jour pas démontrée. Enfin, l'association de nsP1 à ces radeaux lipidiques, de même que leur importance dans la réplication virale suggèrent qu'il s'agit d'un domaine privilégié de formation des organelles de réplication (Bakhache et al. 2020).

Une fois activée, la GTPase Rac1 interagit avec le domaine auto-inhibiteur de PAK1, pour induire un changement conformationnel permettant l'activation de PAK1 par autophosphorylation (Vadlamudi et al. 2005, Stochlic et al. 2010). Dans une boucle de régulation positive, PAK1 est capable de former un complexe avec la GEF  $\beta$ -PIX pour permettre l'activation de Rac1 (ten Klooster et al. 2006, Rajah et al. 2019). La protéine SCRIB recrute à son tour ce complexe activateur à la membrane plasmique via l'interaction de ses domaines PDZ avec  $\beta$ -PIX. En contexte non infectieux, ce recrutement se fait de manière privilégié aux sites de formation de lamellipodes (Nola et al. 2008). Par conséquent SCRIB permet de contrôler avec précision la localisation subcellulaire de l'activation de Rac1, induisant la formation de complexes d'actine branchée. Nous avons pu montrer que ce sont les mêmes domaines PDZ qui permettent l'interaction entre nsP1 et SCRIB. On peut ainsi supposer que SCRIB serait recruté au sein des ilots lipidiques par nsP1 ce qui permettrait le recrutement de Rac1 activée dans les domaines enrichis en nsP1 avec pour conséquence, la réorganisation du cytosquelette d'actine et la déformation membranaire.

En parallèle, la protéine HAX1 peut se complexer avec Rac1 et la cortactine, participant alors au recrutement du complexe Arp2/3 et la formation de lamellipodes (Sung et al. 2011, Gomathinayagam et al. 2014). Le complexe Arp2/3 recruté à proximité de la membrane plasmique permet donc la formation d'un réseau arborescent dense d'actine, contribuant à la formation de lamellipodes (Mullins et al. 1998). L'interaction de nsP1 avec HAX1 pourrait constituer un moyen de recrutement efficace de ce complexe, favorisant la formation de lamellipodes à la surface des cellules infectées. Cependant, nos observations microscopiques n'ont pas mis en lumière de colocalisation membranaire de HAX1. Il serait pertinent d'observer la localisation de la protéine endogène et de comparer le rôle potentiel des différents isoformes de la protéine dans ce processus (Trebinska et al. 2010).



**Fig. 63** Modèle d'interaction de nsP1 avec ses cofacteurs cellulaires

(1) La protéine nsP1 palmitoylée par les palmitoyl-transferase cellulaires ZDHHC2 et ZDHHC19 est adressée au sein d'îlots lipidiques riches en cholestérol. (2) Rac1 activée et palmitoylée est adressée au niveau des radeaux lipidiques. (3) Rac1 induit l'activation de la protéine PAK1 via son auto-phosphorylation. PAK1 s'associe alors avec la GEF β-PIX. (4) nsP1 recrute SCRIB au niveau des radeaux lipidiques via l'interaction avec ses domaines PDZ. SCRIB recrute alors le complexe Pak1-β-PIX à la membrane plasmique et permet le recrutement local de Rac1 activée. (5) HAX1 forme un complexe comprenant la protéine Rac1 ainsi que la cortactine. Ce complexe est adressé aux radeaux lipidiques via le recrutement de HAX1 par nsP1. (6) La cortactine permet le recrutement du complexe Arp2/3 et la formation d'un réseau d'actine arborescent dont la croissance permet la formation de filopodes. (7) La convergence des filaments d'actine combinée à la rétraction des lamellipodes, induit la formation de fines protrusions. (8) Les sphérules se forment à proximité des radeaux lipidiques et recrutent les cofacteurs cellulaires proviraux.

La formation de protrusions de type FLPs résulterait de la formation et de la rétraction des lamellipodes induits par nsP1. Dès lors, la contribution d'Arp2 dans la formation des FLPs induits par nsP1 peut être lié au modèle de nucléation convergente des filaments d'actine (Lee et al. 2010).

Les parallèles que nous avons établis dans les fonctions de SCRIB et HAX1 dans la formation des FLPs induits par nsP1 et dans la réplication du génome viral, permettent de supposer que de mécanismes identiques pourraient participer à la déformation de la membrane plasmique au cours de la formation des sphérules. Les résultats antérieurs de l'équipe (Bakhache et al. 2020) et d'autres laboratoires (Lasswitz et al. 2022) ont, en effet démontré que les radeaux lipidiques agissent comme support pour la formation de sphérules et le recrutement des facteurs proviraux.

Bien que ce modèle basé sur les données bibliographiques et nos propres résultats, soit cohérent, il est encore hautement spéculatif. Des études plus poussées des interactions entre le cytosquelette d'actine et ses régulateurs Rac1, SCRIB et HAX1, et la formation de sphérules, sera donc absolument nécessaire pour faire la lumière sur ce phénotype. Il serait, par exemple, important de déterminer le recrutement de ces différents acteurs dans les radeaux lipidiques de cellules exprimant la protéine nsP1 isolée ou encore infectées par le CHIKV.

## **4. nsP1 une cible thérapeutique à l'avenir**

Le rôle canonique de nsP1 dans le coiffage des ARNs viraux via son activité MTase-GTase essentiel à la poursuite du cycle infectieux et à la propagation virale a rapidement motivé le développement d'inhibiteurs spécifiques. Les spécificités de cette réaction, bien distincte de celle assurant le coiffage des ARN cellulaires (Decroly et al. 2012), a permis de dessiner des molécules capables de perturber ce processus mais sans effet sur le coiffage des ARNs cellulaires. Cette approche a été au cœur du développement des composés MADTPs que nous avons étudiés (Gigante et al. 2014, 2017, Delang et al. 2016, Gómez-SanJuan et al. 2018). Le développement de ces molécules se heurte cependant à l'acquisition par le CHIKV, de mutations compensatoires (Delang et al. 2016).

De plus, les données de la littérature permettent de se questionner sur les conséquences d'une réduction du capping des ARN des *Alphavirus*. En effet, la présence d'ARN non coiffés est décrite comme un élément important dans la résistance virale à la réponse interféron (LaPointe et al. 2018b, 2020). Dans ce contexte, une stratégie de double ciblage incluant une inhibition partielle du capping par de faibles doses de MADTPs permettrait de préserver la réponse interféron.

Bien que préliminaires, nos résultats obtenus en combinant les composés MADTP avec l'imipramine, inhibiteur du métabolisme du cholestérol valident la combinaison du ciblage de l'activité MTase/GTase de nsP1 et de cofacteurs lipidiques de cette protéine. L'intérêt de cette approche est de mettre l'utilisation de concentrations réduites de MADTP susceptible de limiter l'acquisition de ces phénotypes de résistance. L'imipramine étant une molécule cliniquement approuvée et déjà utilisée

en tant que traitement antidépresseur, son utilisation *in vitro* en combinaison avec les molécules MADTPs reste une stratégie plausible.

La stratégie de double ciblage de nsP1 que nous proposons pourrait également être déclinée en ciblant les enzymes responsables de la palmitoylation de nsP1. Cette modification, responsable de l'adressage de nsP1 vers les ilots lipidiques riches en cholestérol est assurée par les palmitoyl-transférases ZDHHC2 et ZDHHC19 (Zhang et al. 2019) est, par la biosynthèse cellulaire de palmitate, précurseur à cette réaction enzymatique (Bakhache et al. 2019, Zhang et al. 2019). La fatty acid synthase (FASN), responsable de la synthèse de ce lipide est d'ores et déjà une cible thérapeutique de composés autorisés pour leur usage clinique chez l'homme, tels que l'Orlistat. Il est donc ainsi envisageable de cibler cette protéine avec des effets secondaires limités (Baenke et al. 2013). Il serait donc intéressant de poursuivre l'évaluation de double ciblage thérapeutique de nsP1 par une combinaison MADTP/Orlistat.

Au-delà de cette réflexion, il pourrait être, à terme, possible de combiner les composés de type MADTP avec des inhibiteurs des cofacteurs de nsP1 que nous avons identifiés au cours de cette thèse. Cela suppose de confirmer le rôle de Rac1, Arp2, Pak1, HAX1 et SCRIB dans la formation des sphérules de réplication par des approches complémentaires, notamment de microscopie électronique visant à rechercher les conséquences d'une invalidation sur la formation de ces compartiments. Il n'existe, à l'heure actuelle, aucun inhibiteur de HAX1 ou de SCRIB connu. Le développement de telles molécules se heurterait au rôle de ces protéines dans l'inhibition de l'apoptose et dans la détermination de la polarité cellulaire et la suppression de tumeurs. La cartographie détaillée des interactions entre HAX1 et SCRIB et nsP1 pourrait offrir une alternative en permettant de dessiner des molécules capables d'entrer en compétition pour la liaison de nsP1.

A l'échelle de l'organisme infecté, la protéine nsP1 est connue pour son importance dans la pathogenèse des Alphavirus. Cette fonction a été assignée à plusieurs résidus dans la séquence de nsP1, comprenant les résidus cystéine portant la palmitoylation de nsP1. En effet, il a été constaté que les mutations inhibant cette modification diminuent la neurovirulence du SFV chez la souris. Plus précisément, lorsque le domaine palmitoylation de nsP1 ont été mutés chez SFV, le virus dépourvu de cette modification de nsP1 reste répliatif, mais ne circule plus dans le cerveau et n'induit

plus de mortalité (Ahola et al. 2000). Outre la palmitoylation, six mutations dans la séquence nsP1 de RRV ont permis d'atténuer l'infection virale chez la souris en réduisant la réplication virale dans certains tissus. Plus précisément, il est apparu que le virus présentant ces 6 mutations nsP1 se répliquait moins dans le tissu musculaire squelettique et était plus sensible à l'IFN de type I (Stoermer Burrack et al. 2014, Haist et al. 2017).

De manière générale, l'étude des modes d'interactions entre nsP1 et ses partenaires cellulaires est essentielle à l'élaboration de contremesures thérapeutiques. Les données issues de notre crible protéomique ont permis d'identifier de nouveaux partenaires cellulaires de nsP1. Ces partenaires sont impliqués dans des processus cellulaires jusqu'alors peu décrits comme impliqués dans le cycle viral comme le métabolisme mitochondrial ou le repliement protéique. La découverte de ces candidats constitue potentiellement une porte d'entrée vers l'étude de fonctions provirales de nsP1 inconnues jusqu'alors. L'étude de ces partenaires cellulaires, pourrait permettre à l'avenir, d'identifier de nouveaux axes thérapeutiques.

## Bibliographie

- Abercrombie M, Heaysman JE, Pegrum SM. 1970. The locomotion of fibroblasts in culture. II. 'RRuffling'. *Experimental Cell Research* 60: 437–444.
- Abraham R, Hauer D, McPherson RL, Utt A, Kirby IT. 2018. ADP-ribosyl-binding and hydrolase activities of the alphavirus nsP3 macrodomain are critical for initiation of virus replication. *P Natl Acad Sci USA* 115.
- Abraham R, McPherson RL, Dasovich M, Badiee M, Leung AKL, Griffin DE. 2020. Both ADP-Ribosyl-Binding and Hydrolase Activities of the Alphavirus nsP3 Macrodomain Affect Neurovirulence in Mice. *mBio* 11: e03253-19.
- Adouchief S, Smura T, Sane J, Vapalahti O, Kurkela S. 2016. Sindbis virus as a human pathogen—epidemiology, clinical picture and pathogenesis. *Reviews in Medical Virology* 26: 221–241.
- Agarwal A, Dash PK, Singh AK, Sharma S, Gopalan N, Rao PVL, Parida MM, Reiter P. 2014. Evidence of Experimental Vertical Transmission of Emerging Novel ECSA Genotype of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8: e2990.
- Agarwal A, Sharma AK, Sukumaran D, Parida M, Dash PK. 2016. Two novel epistatic mutations (E1:K211E and E2:V264A) in structural proteins of Chikungunya virus enhance fitness in *Aedes aegypti*. *Virology* 497: 59–68.
- Agback P, Dominguez F, Pustovalova Y, Lukash T, Shiliaev N. 2019. Structural characterization and biological function of bivalent binding of CD2AP to intrinsically disordered domain of chikungunya virus nsP3 protein. *Virology* 537: 130–42.
- Aggarwal A, lemma TL, Shih I, Newsome TP, McAllery S, Cunningham AL, Turville SG. 2012. Mobilization of HIV spread by diaphanous 2 dependent filopodia in infected dendritic cells. *PLoS pathogens* 8: e1002762.
- Ahola T, Kääriäinen L. 1995. Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 507–511.
- Ahola T, Kujala P, Tuittila M, Blom T, Laakkonen P. 2000. Effects of Palmitoylation of Replicase Protein nsP1 on Alphavirus Infection. *Journal of Virology* 74: 6725–33.
- Ahola T, Laakkonen P, Vihinen H, Kääriäinen L. 1997. Critical residues of Semliki Forest virus RNA capping enzyme involved in methyltransferase and guanylyltransferase-like activities. *Journal of Virology* 71: 392–397.
- Ahola T, Lampio A, Auvinen P, Kaariainen L. 1999. Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. *EMBO J* 18: 3164–72.



- Ahola T, Merits A. 2016. Functions of Chikungunya Virus Nonstructural Proteins. *Chikungunya Virus* 75–98.
- Akahata W, Yang Z, Andersen H, Sun S, Holdaway HA, Kong W-P, Lewis MG, Higgs S, Rossmann MG, Rao S, Nabel GJ. 2010. A VLP vaccine for epidemic Chikungunya virus protects non-human primates against infection. *Nature medicine* 16: 334–338.
- Akhrymuk I, Frolov I, Frolova EI. 2018. Sindbis Virus Infection Causes Cell Death by nsP2-Induced Transcriptional Shutoff or by nsP3-Dependent Translational Shutoff. *Journal of Virology* 92: e01388-18.
- Akhrymuk I, Kulemzin SV, Frolova EI. 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. *J Virol* 86: 7180–91.
- Aktepe TE, Liebscher S, Prier JE, Simmons CP, Mackenzie JM. 2017. The Host Protein Reticulon 3.1A Is Utilized by Flaviviruses to Facilitate Membrane Remodelling. *Cell Reports* 21: 1639–1654.
- Alberts AS. 2001. Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 2824–2830.
- Albulescu IC, White-Scholten L, Tas A, Hoornweg TE, Ferla S, Kovacicova K, Smit JM, Brancale A, Snijder EJ, van Hemert MJ. 2020. Suramin Inhibits Chikungunya Virus Replication by Interacting with Virions and Blocking the Early Steps of Infection. *Viruses* 12: 314.
- Alvarez DE, Agaisse H. 2015. A role for the small GTPase Rac1 in vaccinia actin-based motility. *Small GTPases* 6: 119–122.
- Andrianantoandro E, Pollard TD. 2006. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Molecular Cell* 24: 13–23.
- Antoine A-F, Montpellier C, Cailliau K, Browaeys-Poly E, Vilain J-P, Dubuisson J. 2007. The alphavirus 6K protein activates endogenous ionic conductances when expressed in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Membrane Biology* 215: 37–48.
- Arankalle VA, Shrivastava S, Cherian S, Gunjekar RS, Walimbe AM, Jadhav SM, Sudeep AB, Mishra AC. 2007. Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. *The Journal of General Virology* 88: 1967–1976.
- Aréchiga-Ceballos N, Aguilar-Setién A. 2015. Alphaviral equine encephalomyelitis (Eastern, Western and Venezuelan). *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)* 34: 491–501.
- Arpin-André C, Mesnard J-M. 2007. The PDZ domain-binding motif of the human T cell leukemia virus type 1 tax protein induces mislocalization of the tumor suppressor hScrib in T cells. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 33132–33141.

- Artsob H, Lindsay R, Drebot M. 2017. Arboviruses. Pages 154–160 in Quah SR, ed. *International Encyclopedia of Public Health (Second Edition)*. Academic Press.
- Arumugam S, Bassereau P. 2015. Membrane nanodomains: contribution of curvature and interaction with proteins and cytoskeleton. *Essays in Biochemistry* 57: 109–119.
- Auerswald H, Boussioux C, In S, Mao S, Ong S, Huy R, Leang R, Chan M, Duong V, Ly S, Tarantola A, Dussart P. 2018. Broad and long-lasting immune protection against various Chikungunya genotypes demonstrated by participants in a cross-sectional study in a Cambodian rural community. *Emerging Microbes & Infections* 7: 13.
- Baenke F, Peck B, Miess H, Schulze A. 2013. Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Disease Models & Mechanisms* 6: 1353–1363.
- Bagny L, Delatte H, Quilici S, Fontenille D. 2009. Progressive decrease in *Aedes aegypti* distribution in Reunion Island since the 1900s. *Journal of Medical Entomology* 46: 1541–1545.
- Baker JL, Courtemanche N, Parton DL, McCullagh M, Pollard TD, Voth GA. 2015. Electrostatic interactions between the Bni1p Formin FH2 domain and actin influence actin filament nucleation. *Structure (London, England: 1993)* 23: 68–79.
- Baker MJ, Cooke M, Kreider-Letterman G, Garcia-Mata R, Janmey PA, Kazanietz MG. 2020. Evaluation of active Rac1 levels in cancer cells: A case of misleading conclusions from immunofluorescence analysis. *The Journal of Biological Chemistry* 295: 13698–13710.
- Bakhache W, Neyret A, Bernard E, Merits A, Briant L. 2020. Palmitoylated Cysteines in Chikungunya Virus nsP1 Are Critical for Targeting to Cholesterol-Rich Plasma Membrane Microdomains with Functional Consequences for Viral Genome Replication. *Journal of Virology* 94.
- Bakhache W, Neyret A, McKellar J, Clop C, Bernard E, Weger-Lucarelli J, Briant L. 2019. Fatty acid synthase and stearoyl-CoA desaturase-1 are conserved druggable cofactors of Old World Alphavirus genome replication. *Antiviral Research* 172: 104642.
- Balavoine S, Pircher M, Hoen B, Herrmann-Storck C, Najioullah F, Madeux B, Signate A, Valentino R, Lannuzel A, Saint Louis M, Cassadou S, Cabié A, Schepers K. 2017. Guillain-Barré Syndrome and Chikungunya: Description of All Cases Diagnosed during the 2014 Outbreak in the French West Indies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 97: 356–360.
- Balcerak A, Trebinska-Stryjewska A, Wakula M, Chmielarczyk M, Smietanka U, Rubel T, Konopinski R, Macech-Klicka E, Zub R, Grzybowska EA. 2019. HAX1 impact on collective cell migration, cell adhesion, and cell shape is linked to the regulation of actomyosin contractility. *Molecular Biology of the Cell* 30: 3024–3036.
- Balistreri G, Caldentey J, Kääriäinen L, Ahola T. 2007. Enzymatic defects of the nsP2 proteins of Semliki Forest virus temperature-sensitive mutants. *Journal of Virology* 81: 2849–2860.

- Bamburg JR, Harris HE, Weeds AG. 1980. Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain. *FEBS letters* 121: 178–182.
- Bangham CRM. 2003. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. *The Journal of General Virology* 84.
- Basore K, Kim AS, Nelson CA, Zhang R, Smith BK. 2019a. Cryo-EM Structure of Chikungunya Virus in Complex with the Mxra8 Receptor. *Cell* 177: 1725–1737.
- Basore K, Ma H, Kafai NM, Mackin S, Kim AS, Nelson CA, Diamond MS, Fremont DH. 2021. Structure of Venezuelan equine encephalitis virus in complex with the LDLRAD3 receptor. *Nature* 598: 672–676.
- Basore, Kim AS, Nelson CA, Zhang R, Smith BK, Uranga C, Vang L, Cheng M, Gross ML, Smith J, Diamond MS, Fremont DH. 2019b. Cryo-EM Structure of Chikungunya Virus in Complex with the Mxra8 Receptor. *Cell* 177: 1725-1737.e16.
- Bassetto M, De Burghgraeve T, Delang L, Massarotti A, Coluccia A, Zonta N, Gatti V, Colombano G, Sorba G, Silvestri R, Tron GC, Neyts J, Leyssen P, Brancale A. 2013. Computer-aided identification, design and synthesis of a novel series of compounds with selective antiviral activity against chikungunya virus. *Antiviral Research* 98: 12–18.
- Baxter VK, Heise MT. 2020. Immunopathogenesis of alphaviruses. *Advances in virus research* 107: 315–382.
- Bear JE, Svitkina TM, Krause M, Schafer DA, Loureiro JJ, Strasser GA, Maly IV, Chaga OY, Cooper JA, Borisy GG, Gertler FB. 2002. Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* 109: 509–521.
- Beerli C, Yakimovich A, Kilcher S, Reynoso GV, Fläschner G, Müller DJ, Hickman HD, Mercer J. 2019. Vaccinia virus hijacks EGFR signalling to enhance virus spread through rapid and directed infected cell motility. *Nature Microbiology* 4: 216–225.
- Belov GA, Nair V, Hansen BT, Hoyt FH, Fischer ER, Ehrenfeld E. 2012. Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes. *J Virol* 86: 302–12.
- Bernard E, Solignat M, Gay B, Chazal N, Higgs S. 2010. Endocytosis of Chikungunya Virus into Mammalian Cells: Role of Clathrin and Early Endosomal Compartments. *PLoS ONE* 5.
- Bi G-Q. 1995. Calcium-regulated exocytosis is required for cell membrane resealing. *The Journal of Cell Biology* 131: 1747–1758.
- Bi J, Wang R, Zeng X. 2018. Lipid rafts regulate the lamellipodia formation of melanoma A375 cells via actin cytoskeleton-mediated recruitment of  $\beta$ 1 and  $\beta$ 3 integrin. *Oncology Letters* 16: 6540–6546.
- Bilder D, Perrimon N. 2000. Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* 403: 676–680.

- Biondo A, Meneses PI. 2022. The Process of Filopodia Induction during HPV Infection. *Viruses* 14: 1150.
- Birdwell CR, Strauss EG, Strauss JH. 1973. Replication of Sindbis virus. III. An electron microscopic study of virus maturation using the surface replica technique. *Virology* 56: 429–438.
- Black JC, Cheney PP, Campbell T, Knowles MK. 2014. Membrane curvature based lipid sorting using a nanoparticle patterned substrate. *Soft Matter* 10: 2016–2023.
- Blake TCA, Gallop JL. 2023. Filopodia In Vitro and In Vivo. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 39: null.
- Block J, Stradal TEB, Hänisch J, Geffers R, Köstler SA, Urban E, Small JV, Rottner K, Faix J. 2008. Filopodia formation induced by active mDia2/Drf3. *Journal of Microscopy* 231: 506–517.
- Bohdanowicz M, Schlam D, Hermansson M, Rizzuti D, Fairn GD, Ueyama T, Somerharju P, Du G, Grinstein S. 2013. Phosphatidic acid is required for the constitutive ruffling and macropinocytosis of phagocytes. *Molecular Biology of the Cell* 24: 1700–1712, S1-7.
- Bonello TT, Peifer M. 2018. Scribble: A master scaffold in polarity, adhesion, synaptogenesis, and proliferation. *Journal of Cell Biology* 218: 742–756.
- Bourai M, Lucas-Hourani M, Gad HH, Drosten C, Jacob Y. 2012. Mapping of Chikungunya virus interactions with host proteins identified nsP2 as a highly connected viral component. *J Virol* 86: 3121–34.
- Bourai M, Lucas-Hourani M, Gad HH, Drosten C, Jacob Y, Tafforeau L, Cassonnet P, Jones LM, Judith D, Couderc T, Lecuit M, André P, Kümmerer BM, Lotteau V, Desprès P, Tangy F, Vidalain P-O. 2012. Mapping of Chikungunya Virus Interactions with Host Proteins Identified nsP2 as a Highly Connected Viral Component. *Journal of Virology* 86: 3121–3134.
- Brighton SW. 1984. Chloroquine phosphate treatment of chronic Chikungunya arthritis. An open pilot study. *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde* 66: 217–218.
- Broeckel R, Haese N, Messaoudi I, Streblow DN. 2015. Nonhuman Primate Models of Chikungunya Virus Infection and Disease (CHIKV NHP Model). *Pathogens* 4: 662–681.
- Brown JE, Evans BR, Zheng W, Obas V, Barrera-Martinez L, Egizi A, Zhao H, Caccone A, Powell JR. 2014. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. *Evolution; international journal of organic evolution* 68: 514–525.
- Brown RS, Wan JJ, Kielian M. 2018. The Alphavirus Exit Pathway: What We Know and What We Wish We Knew. *Viruses* 10: 89.

- Brummer-Korvenkontio M, Vapalahti O, Kuusisto P, Saikku P, Manni T, Koskela P, Nygren T, Brummer-Korvenkontio H, Vaheri A. 2002. Epidemiology of Sindbis Virus Infections in Finland 1981-96: Possible Factors Explaining a Peculiar Disease Pattern. *Epidemiology and Infection* 129: 335–345.
- Bubak AN, Como CN, Blackmon AM, Fietze S, Mescher T, Jones D, Cohrs RJ, Paucek P, Baird NL, Nagel MA. 2018. Varicella Zoster Virus Induces Nuclear Translocation of the Neurokinin-1 Receptor, Promoting Lamellipodia Formation and Viral Spread in Spinal Astrocytes. *The Journal of Infectious Diseases* 218: 1324–1335.
- Buchan JR, Parker R. 2009. Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Out of Translation. *Molecular cell* 36: 932.
- Bucki R, Wang Y-H, Yang C, Kandy SK, Fatunmbi O, Bradley R, Pogoda K, Svitkina T, Radhakrishnan R, Janmey PA. 2019. Lateral distribution of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in membranes regulates formin- and ARP2/3-mediated actin nucleation. *The Journal of Biological Chemistry* 294: 4704–4722.
- Burbelo PD, Drechsel D, Hall A. 1995. A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 29071–29074.
- Burtnick LD, Koepf EK, Grimes J, Jones EY, Stuart DI, McLaughlin PJ, Robinson RC. 1997. The Crystal Structure of Plasma Gelsolin: Implications for Actin Severing, Capping, and Nucleation. *Cell* 90: 661–670.
- Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjano IM. 2007. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 29: 356–370.
- Byrd EA, Kielian M. 2017. An Alphavirus E2 Membrane-Proximal Domain Promotes Envelope Protein Lateral Interactions and Virus Budding. *mBio* 8: e01564-17.
- Byrnes AP, Griffin DE. 1998. Binding of Sindbis Virus to Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Virology* 72: 7349–7356.
- Calisher CH, Karabatsos N. 1988. Arbovirus Serogroups: Definition and Geographic Distribution. *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. CRC Press.
- Calisher CH, Shope RE, Brandt W, Casals J, Karabatsos N, Murphy FA, Tesh RB, Wiebe ME. 1980. Proposed antigenic classification of registered arboviruses I. *Togaviridae, Alphavirus*. *Intervirology* 14: 229–232.
- Callan-Jones A, Sorre B, Bassereau P. 2011. Curvature-Driven Lipid Sorting in Biomembranes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: a004648.
- Carey D. 1971. Chikungunya and dengue: A Case of Mistaken Identity? *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* XXVI: 243–262.

- Carlson L-A, de Marco A, Oberwinkler H, Habermann A, Briggs JAG, Kräusslich H-G, Grünewald K. 2010. Cryo Electron Tomography of Native HIV-1 Budding Sites. *PLoS Pathogens* 6: e1001173.
- Carmona G, Perera U, Gillett C, Naba A, Law A-L, Sharma VP, Wang J, Wyckoff J, Balsamo M, Mosis F, De Piano M, Monypenny J, Woodman N, McConnell RE, Mouneimne G, Van Hemelrijck M, Cao Y, Condeelis J, Hynes RO, Gertler FB, Krause M. 2016. Lamellipodin promotes invasive 3D cancer cell migration via regulated interactions with Ena/VASP and SCAR/WAVE. *Oncogene* 35: 5155–5169.
- Carpenter JE, Hutchinson JA, Jackson W, Grose C. 2008. Egress of Light Particles among Filopodia on the Surface of Varicella-Zoster Virus-Infected Cells. *Journal of Virology* 82: 2821–2835.
- Casartelli N, Sourisseau M, Feldmann J, Guivel-Benhassine F, Mallet A, Marcelin A-G, Guatelli J, Schwartz O. 2010. Tetherin Restricts Productive HIV-1 Cell-to-Cell Transmission. *PLOS Pathogens* 6: e1000955.
- Cassell S, Edwards J, Brown DT. 1984. Effects of lysosomotropic weak bases on infection of BHK-21 cells by Sindbis virus. *Journal of Virology* 52: 857–864.
- de Castro IF, Volonté L, Risco C. 2013. Virus factories: biogenesis and structural design. *Cellular Microbiology* 15: 24–34.
- CDC. 2023. Areas at Risk for Chikungunya | Chikungunya virus | CDC. (28 August 2023; <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>).
- Ces O, Mulet X. 2006. Physical coupling between lipids and proteins: a paradigm for cellular control. *Signal Transduction* 6: 112–132.
- Chang K, Majmudar H, Tandon R, Volin MV, Tiwari V. 2022. Induction of Filopodia During Cytomegalovirus Entry Into Human Iris Stromal Cells. *Frontiers in Microbiology* 13: 834927.
- Chao T-C, Su W-C, Huang J-Y, Chen Y-C, Jeng K-S, Wang H-D, Lai MMC. 2012. Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2 (PSTPIP2), a host membrane-deforming protein, is critical for membranous web formation in hepatitis C virus replication. *Journal of Virology* 86: 1739–1749.
- Chen C-I, Clark DC, Pesavento P, Lerche NW, Luciw PA, Reisen WK, Brault AC. 2010. Comparative Pathogenesis of Epidemic and Enzootic Chikungunya Viruses in a Pregnant Rhesus Macaque Model. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83: 1249–1258.
- Chen GL, Coates EE, Plummer SH, Carter CA, Berkowitz N, Conan-Cibotti M, Cox JH, Beck A, O’Callahan M, Andrews C, Gordon IJ, Larkin B, Lampléy R, Kaltovich F, Gall J, Carlton K, Mendy J, Haney D, May J, Bray A, Bailer RT, Dowd KA, Brockett B, Gordon D, Koup RA, Schwartz R, Mascola JR, Graham BS, Pierson TC, Donastorg Y, Rosario N, Pape JW, Hoen B, Cabié A, Diaz C, Ledgerwood JE, VRC 704 Study Team. 2020. Effect of a Chikungunya

- Virus-Like Particle Vaccine on Safety and Tolerability Outcomes: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 323: 1369–1377.
- Chen L, Wang M, Zhu D, Sun Z, Ma J, Wang J, Kong L, Wang S, Liu Z, Wei L, He Y, Wang J, Zhang X. 2018a. Implication for alphavirus host-cell entry and assembly indicated by a 3.5Å resolution cryo-EM structure. *Nature Communications* 9: 5326.
- Chen R, Mukhopadhyay S, Merits A, Bolling B, Nasar F, Coffey LL, Powers A, Weaver SC, ICTV Report ConsortiumYR 2018. 2018b. ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. *Journal of General Virology* 99: 761–762.
- Cheng S, Castillo V, Welty M, Eliaz I, Sliva D. 2016. Honokiol inhibits migration of renal cell carcinoma through activation of RhoA/ROCK/MLC signaling pathway. *International Journal of Oncology* 49: 1525–1530.
- Chevillon C, Briant L, Renaud F, Devaux C. 2008. The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. *Trends in Microbiology* 16: 80–88.
- Chopra A, Saluja M, Venugopalan A. 2014. Effectiveness of chloroquine and inflammatory cytokine response in patients with early persistent musculoskeletal pain and arthritis following chikungunya virus infection. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66: 319–326.
- Chretien J-P, Anyamba A, Bedno SA, Breiman RF, Sang R, Sergon K, Powers AM, Onyango CO, Small J, Tucker CJ, Linthicum KJ. 2007. Drought-associated chikungunya emergence along coastal East Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76: 405–407.
- Christie J. 1872. Remarks on “Kidinga Pepo”: A Peculiar Form of Exanthematous Disease. *British Medical Journal* 1: 577–579.
- Christie J. 1881. On Epidemics of Dengue Fever: Their Diffusion and Etiology \*Read at the International Medical Congress, in the Section of ‘State Medicine.’ Parts of the Paper were shortened in reading. *Glasgow Medical Journal* 16: 161–176.
- Chua HH, Abdul Rashid K, Law WC, Hamizah A, Chem YK, Khairul AH, Chua KB. 2010. A fatal case of chikungunya virus infection with liver involvement. *The Medical Journal of Malaysia* 65: 83–84.
- Cibrelus L, Graham BS, Ramon-Pardo P, Repik P, Yactayo S. 2015. Chikungunya disease: gaps and opportunities in public health and research in the Americas. *WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD* 6.
- Civril F, Deimling T, de Oliveira Mann CC, Ablasser A, Moldt M, Witte G, Hornung V, Hopfner K-P. 2013. Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS. *Nature* 498: 332–337.
- Clark LE, Clark SA, Lin C, Liu J, Coscia A, Nabel KG, Yang P, Neel DV, Lee H, Brusica V, Stryapunina I, Plante KS, Ahmed AA, Catteruccia F, Young-Pearse TL, Chiu IM, Llopis PM, Weaver

- SC, Abraham J. 2022. VLDLR and ApoER2 are receptors for multiple alphaviruses. *Nature* 602: 475–480.
- Coffey LL, Beeharry Y, Bordería AV, Blanc H, Vignuzzi M. 2011. Arbovirus high fidelity variant loses fitness in mosquitoes and mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 16038–16043.
- Cohen M, Georgiou M, Stevenson NL, Miodownik M, Baum B. 2010. Dynamic filopodia transmit intermittent Delta-Notch signaling to drive pattern refinement during lateral inhibition. *Developmental Cell* 19: 78–89.
- Connolly BA, Rice J, Feig LA, Buchsbaum RJ. 2005. Tiam1-IRSp53 Complex Formation Directs Specificity of Rac-Mediated Actin Cytoskeleton Regulation. *Molecular and Cellular Biology* 25: 4602–4614.
- Contopoulos-Ioannidis D, Newman-Lindsay S, Chow C, LaBeaud AD. 2018. Mother-to-child transmission of Chikungunya virus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases* 12: e0006510.
- Cook DR, Rossman KL, Der CJ. 2014. Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene* 33: 4021–4035.
- Cortese M, Goellner S, Acosta EG, Neufeldt CJ, Oleksiuk O, Lampe M, Haselmann U, Funaya C, Schieber N, Ronchi P, Schorb M, Pruunsild P, Schwab Y, Chatel-Chaix L, Ruggieri A, Bartenschlager R. 2017. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Reports* 18: 2113–2123.
- Couderc T, Chrétien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M. 2008. A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease. *PLOS Pathogens* 4.
- Cristea IM, Carroll JW, Rout MP, Rice CM, Chait BT, MacDonald MR. 2006. Tracking and elucidating alphavirus-host protein interactions. *J Biol Chem* 281: 30269–78.
- Cudmore S, Cossart P, Griffiths G, Way M. 1995. Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* 378: 636–638.
- Cullis PR, de Kruijff B. 1979. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta* 559: 399–420.
- Dadke D, Fryer BH, Golemis EA, Field J. 2003. Activation of p21-activated kinase 1-nuclear factor kappaB signaling by Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor during cellular transformation. *Cancer Research* 63: 8837–8847.
- Damiano-Guercio J, Kurzawa L, Mueller J, Dimchev G, Schaks M, Nemethova M, Pokrant T, Brühmann S, Linkner J, Blanchoin L, Sixt M, Rottner K, Faix J. 2020. Loss of Ena/VASP interferes with lamellipodium architecture, motility and integrin-dependent adhesion. *eLife* 9: e55351.



- Damsky CH, Sheffield JB, Tuszynski GP, Warren L. 1977. Is there a role for actin in virus budding? *The Journal of Cell Biology* 75: 593–605.
- Das I, Basantray I, Mamidi P, Nayak TK, B. M. P, Chattopadhyay S, Chattopadhyay S. 2014a. Heat Shock Protein 90 Positively Regulates Chikungunya Virus Replication by Stabilizing Viral Non-Structural Protein nsP2 during Infection. *PLoS ONE* 9: e100531.
- Das P. 2015. Biochemical perspective on alphaviral nonstructural protein 2: a tale from multiple domains to enzymatic profiling.
- Das PK, Merits A, Lulla A. 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: 5635–5653.
- Das PK, Puusepp L, Varghese FS, Utt A, Ahola T, Kananovich DG, Lopp M, Merits A, Karelson M. 2016. Design and Validation of Novel Chikungunya Virus Protease Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60: 7382–7395.
- Decroly E, Ferron F, Lescar J, Canard B. 2011. Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. *Nat Rev Microbiol* 10: 51–65.
- Decroly E, Ferron F, Lescar J, Canard B. 2012. Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. *Nature Reviews. Microbiology* 10: 51–65.
- Delage E, Cervantes DC, Pénard E, Schmitt C, Syan S, Disanza A, Scita G, Zurzolo C. 2016. Differential identity of Filopodia and Tunneling Nanotubes revealed by the opposite functions of actin regulatory complexes. *Scientific Reports* 6: 39632.
- Delang L, Li C, Tas A, Quérat G, Albuлесcu IC, De Burghgraeve T, Guerrero NAS, Gigante A, Piorkowski G, Decroly E, Jochmans D, Canard B, Snijder EJ, Pérez-Pérez MJ, van Hemert MJ, Coutard B, Leyssen P, Neyts J. 2016. The viral capping enzyme nsP1: a novel target for the inhibition of chikungunya virus infection. *Scientific Reports* 6: 31819.
- Delatte H, Desvars A, Bouétard A, Bord S, Gimonneau G, Vourc'h G, Fontenille D. 2010. Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, a vector of Chikungunya on La Réunion. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 10: 249–258.
- Delogu I, Pastorino B, Baronti C, Nougairède A, Bonnet E, de Lamballerie X. 2011. In vitro antiviral activity of arbidol against Chikungunya virus and characteristics of a selected resistant mutant. *Antiviral Research* 90: 99–107.
- Delorme V, Machacek M, DerMardirossian C, Anderson KL, Wittmann T, Hanein D, Waterman-Storer C, Danuser G, Bokoch GM. 2007. Cofilin activity downstream of Pak1 regulates cell protrusion efficiency by organizing lamellipodium and lamella actin networks. *Developmental Cell* 13: 646–662.
- Delorme-Walker VD, Peterson JR, Chernoff J, Waterman CM, Danuser G, DerMardirossian C, Bokoch GM. 2011. Pak1 regulates focal adhesion strength, myosin IIA distribution, and actin dynamics to optimize cell migration. *Journal of Cell Biology* 193: 1289–1303.

- Dempsey A, Bowie AG. 2015. Innate Immune Recognition of DNA: a recent history. *Virology* 0: 146–152.
- Devaux CA. 2012. Emerging and re-emerging viruses: A global challenge illustrated by Chikungunya virus outbreaks. *World Journal of Virology* 1: 11–22.
- Diallo D, Sall AA, Buenemann M, Chen R, Faye O, Diagne CT, Faye O, Ba Y, Dia I, Watts D, Weaver SC, Hanley KA, Diallo M. 2012. Landscape Ecology of Sylvatic Chikungunya Virus and Mosquito Vectors in Southeastern Senegal. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6: e1649.
- Diaz A, Ahlquist P. 2012. Role of host reticulon proteins in rearranging membranes for positive-strand RNA virus replication. *Current Opinion in Microbiology* 15: 519–524.
- Dickson SH. 1859. *Elements of Medicine: A Compendious View of Pathology and Therapeutics : Or, the History and Treatment of Diseases.* Blanchard and Lea.
- Disanza A, Steffen A, Hertzog M, Frittoli E, Rottner K, Scita G. 2005. Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 62: 955–970.
- Do T, Murphy G, Earl LA, Del Prete GQ, Grandinetti G, Li G-H, Estes JD, Rao P, Trubey CM, Thomas J, Spector J, Bliss D, Nath A, Lifson JD, Subramaniam S. 2014. Three-Dimensional Imaging of HIV-1 Virological Synapses Reveals Membrane Architectures Involved in Virus Transmission. *Journal of Virology* 88: 10327–10339.
- Dobramysl U, Jarsch IK, Inoue Y, Shimo H, Richier B, Gadsby JR, Mason J, Szałapak A, Ioannou PS, Correia GP, Walrant A, Butler R, Hannezo E, Simons BD, Gallop JL. 2021. Stochastic combinations of actin regulatory proteins are sufficient to drive filopodia formation. *The Journal of Cell Biology* 220: e202003052.
- Doerflinger SY, Cortese M, Romero-Brey I, Menne Z, Tubiana T, Schenk C, White PA, Bartenschlager R, Bressanelli S, Hansman GS, Lohmann V. 2017. Membrane alterations induced by nonstructural proteins of human norovirus. *PLoS pathogens* 13: e1006705.
- Dong S, Balaraman V, Kantor AM, Lin J, Grant DG, Held NL, Franz AWE. 2017. Chikungunya virus dissemination from the midgut of *Aedes aegypti* is associated with temporal basal lamina degradation during bloodmeal digestion. *PLoS neglected tropical diseases* 11: e0005976.
- Dow LE, Kauffman JS, Caddy J, Zarbalis K, Peterson AS, Jane SM, Russell SM, Humbert PO. 2007. The tumour-suppressor Scribble dictates cell polarity during directed epithelial migration: regulation of Rho GTPase recruitment to the leading edge. *Oncogene* 26: 2272–2282.
- van Duijl-Richter MKS, Hoornweg TE, Rodenhuis-Zybert IA, Smit JM. 2015. Early Events in Chikungunya Virus Infection-From Virus Cell Binding to Membrane Fusion. *Viruses* 7: 3647–3674.

- Dumaresq. 1828. An Account of Dengue, Danga, or Dandy Fever, as It Occurred in New-Orleans. *The Boston Medical and Surgical Journal* 1: 497–502.
- Dumontier M, Höcht P, Mintert U, Faix J. 2000. Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in *Dictyostelium*. *Journal of Cell Science* 113 ( Pt 12): 2253–2265.
- Dupuis-Maguiraga L, Noret M, Brun S, Le Grand R, Gras G, Roques P. 2012. Chikungunya Disease: Infection-Associated Markers from the Acute to the Chronic Phase of Arbovirus-Induced Arthralgia. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6: e1446.
- Edelman R, Tacket CO, Wasserman SS, Bodison SA, Perry JG, Mangiafico JA. 2000. Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62: 681–685.
- Ertel KJ, Benefield D, Castano-Diez D, Pennington JG, Horswill M. 2017. Cryo-electron tomography reveals novel features of a viral RNA replication compartment. *Elife* 6.
- Eugenin EA, Gaskill PJ, Berman JW. 2009. Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: a potential mechanism for intercellular HIV trafficking. *Cellular Immunology* 254: 142–148.
- Fan J, Goh H, Ding K, Xue B, Robinson RC, Yang D. 2017. Structural Basis for pH-mediated Regulation of F-actin Severing by Gelsolin Domain 1. *Scientific Reports* 7: 45230.
- Favoreel HW, Van Minnebruggen G, Adriaensen D, Nauwynck HJ. 2005. Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 8990–8995.
- Feng J, De Jesus PD, Su V, Han S, Gong D, Wu NC, Tian Y, Li X, Wu T-T, Chanda SK, Sun R. 2014. R1OK3 is an adaptor protein required for IRF3-mediated antiviral type I interferon production. *Journal of Virology* 88: 7987–7997.
- Fernández de Castro I, Fernández JJ, Barajas D, Nagy PD, Risco C. 2017. Three-dimensional imaging of the intracellular assembly of a functional viral RNA replicase complex. *Journal of Cell Science* 130: 260–268.
- Ferreira AC, Reis PA, de Freitas CS, Sacramento CQ, Villas Bôas Hoelz L, Bastos MM, Mattos M, Rocha N, Gomes de Azevedo Quintanilha I, da Silva Gouveia Pedrosa C, Rocha Quintino Souza L, Correia Loiola E, Trindade P, Rangel Vieira Y, Barbosa-Lima G, de Castro Faria Neto HC, Boechat N, Rehen SK, Brüning K, Bozza FA, Bozza PT, Souza TML. 2019. Beyond Members of the Flaviviridae Family, Sofosbuvir Also Inhibits Chikungunya Virus Replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63: e01389-18.
- Ferreira AC, Zaverucha-do-Valle C, Reis PA, Barbosa-Lima G, Vieira YR, Mattos M, Silva P de P, Sacramento C, de Castro Faria Neto HC, Campanati L, Tanuri A, Brüning K, Bozza FA, Bozza PT, Souza TML. 2017. Sofosbuvir protects Zika virus-infected mice from mortality, preventing short- and long-term sequelae. *Scientific Reports* 7: 9409.

- Firth AE, Chung BY, Fleeton MN, Atkins JF. 2008. Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. *Virology Journal* 5: 108.
- Fischer M, Staples JE. 2014. Chikungunya Virus Spreads in the Americas — Caribbean and South America, 2013–2014. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 63: 500–501.
- Fongsaran C, Jirakanwisal K, Kuadkitkan A, Wikan N, Wintachai P, Thepparit C, Ubol S, Phaonakrop N, Roytrakul S, Smith DR. 2014. Involvement of ATP synthase  $\beta$  subunit in chikungunya virus entry into insect cells. *Archives of Virology* 159: 3353–3364.
- Fontana J, López-Iglesias C, Tzeng W-P, Frey TK, Fernández JJ, Risco C. 2010. Three-dimensional structure of Rubella virus factories. *Virology* 405: 579–591.
- Fourié T, Dia A, Savreux Q, Pommier de Santi V, de Lamballerie X, Leparç-Goffart I, Simon F. 2021. Emergence of Indian lineage of ECSA chikungunya virus in Djibouti, 2019. *International Journal of Infectious Diseases* 108: 198–201.
- Foy NJ, Akhrymuk M, Akhrymuk I, Atasheva S, Bopda-Waffo A. 2013. Hypervariable Domains of nsP3 Proteins of New World and Old World Alphaviruses Mediate Formation of Distinct, Virus-Specific Protein Complexes. *Journal of Virology* 87: 1997–2010.
- Frolov I, Hardy R, Rice CM. 2001. Cis-acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. *RNA (New York, N.Y.)* 7: 1638–1651.
- Frolov I, Kim DY, Akhrymuk M, Mobley JA, Frolova EI. 2017. Hypervariable Domain of Eastern Equine Encephalitis Virus nsP3 Redundantly Utilizes Multiple Cellular Proteins for Replication Complex Assembly. *J. Virol* 91.
- Frolova EI, Gorchakov R, Pereboeva L, Atasheva S, Frolov I. 2010. Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane. *Journal of Virology* 84: 11679–11695.
- Fros JJ, Domeradzka NE, Baggen J, Geertsema C, Flipse J. 2012. Chikungunya Virus nsP3 Blocks Stress Granule Assembly by Recruitment of G3BP into Cytoplasmic Foci. *Journal of Virology* 86: 10873–79.
- Fros JJ, Liu WJ, Prow NA, Geertsema C, Ligtenberg M. 2010. Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. *J Virol* 84: 10877–87.
- Froshauer S, Kartenbeck J, Helenius A. 1988. Alphavirus RNA replicase is located on the cytoplasmic surface of endosomes and lysosomes. *J Cell Biol* 107: 2075–86.
- Gaidos G, Soni S, Oswald DJ, Toselli PA, Kirsch KH. 2007. Structure and function analysis of the CMS/CIN85 protein family identifies actin-bundling properties and heterotypic-complex formation. *Journal of Cell Science* 120: 2366–2377.
- Galatas B, Ly S, Duong V, Baisley K, Nguon K, Chan S, Huy R, Ly S, Sorn S, Som L, Buchy P, Tarantola A. 2016. Long-Lasting Immune Protection and Other Epidemiological

- Findings after Chikungunya Emergence in a Cambodian Rural Community, April 2012. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10: e0004281.
- Ganjian N, Riviere-Cinamond A. 2020. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. *Revista Panamericana de Salud Pública* 44: e14.
- Gao Y, Goonawardane N, Ward J, Tuplin A, Harris M. 2019. Multiple roles of the non-structural protein 3 (nsP3) alphavirus unique domain (AUD) during Chikungunya virus genome replication and transcription. *PLoS pathogens* 15: e1007239.
- Garcia-Rejon JE, Navarro J-C, Cigarroa-Toledo N, Baak-Baak CM. 2021. An Updated Review of the Invasive *Aedes albopictus* in the Americas; Geographical Distribution, Host Feeding Patterns, Arbovirus Infection, and the Potential for Vertical Transmission of Dengue Virus. *Insects* 12: 967.
- Gardner CL, Burke CW, Higgs ST, Klimstra WB, Ryman KD. 2012. Interferon-alpha/beta deficiency greatly exacerbates arthritogenic disease in mice infected with wild-type chikungunya virus but not with the cell culture-adapted live-attenuated 181/25 vaccine candidate. *Virology* 425: 103–112.
- Gardner J, Anraku I, Le TT, Larcher T, Major L, Roques P, Schroder WA, Higgs S, Suhrbier A. 2010. Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. *Journal of Virology* 84: 8021–8032.
- Garmashova N, Gorchakov R, Volkova E, Paessler S, Frolova E, Frolov I. 2007. The Old World and New World Alphaviruses Use Different Virus-Specific Proteins for Induction of Transcriptional Shutoff. *Journal of Virology* 81: 2472–2484.
- Gay B, Bernard E, Solignat M, Chazal N, Devaux C, Briant L. 2012. pH-dependent entry of chikungunya virus into *Aedes albopictus* cells. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 12: 1275–1281.
- Gérardin P, Barau G, Michault A, Bintner M, Randrianaivo H, Choker G, Lenglet Y, Touret Y, Bouveret A, Grivard P, Roux KL, Blanc S, Schuffenecker I, Couderc T, Arenzana-Seisdedos F, Lecuit M, Robillard P-Y. 2008. Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya Virus Infections on the Island of La Réunion. *PLOS Medicine* 5: e60.
- Gérardin P, Fianu A, Malvy D, Mussard C, Boussaïd K, Rollot O, Michault A, Gaüzere B-A, Bréart G, Favier F. 2011. Perceived morbidity and community burden after a Chikungunya outbreak: the TELECHIK survey, a population-based cohort study. *BMC Medicine* 9: 5.
- Geuens T, Bouhy D, Timmerman V. 2016. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Human Genetics* 135: 851–867.
- Ghosh A, Lima CD. 2010. Enzymology of RNA cap synthesis. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 1: 152–172.

- Gibbons DL, Ahn A, Liao M, Hammar L, Cheng RH, Kielian M. 2004a. Multistep regulation of membrane insertion of the fusion peptide of Semliki Forest virus. *Journal of Virology* 78: 3312–3318.
- Gibbons DL, Vaney M-C, Roussel A, Vigouroux A, Reilly B, Lepault J, Kielian M, Rey FA. 2004b. Conformational change and protein-protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus. *Nature* 427: 320–325.
- Gigante A, Canela M-D, Delang L, Priego E-M, Camarasa M-J, Querat G, Neyts J, Leyssen P, Pérez-Pérez M-J. 2014. Identification of [1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7(6H)-ones as novel inhibitors of Chikungunya virus replication. *Journal of Medicinal Chemistry* 57: 4000–4008.
- Gigante A, Gómez-SanJuan A, Delang L, Li C, Bueno O, Gamo A-M, Priego E-M, Camarasa M-J, Jochmans D, Leyssen P, Decroly E, Coutard B, Querat G, Neyts J, Pérez-Pérez M-J. 2017. Antiviral activity of [1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7(6H)-ones against chikungunya virus targeting the viral capping nsP1. *Antiviral Research* 144: 216–222.
- Gillespie LK, Hoenen A, Morgan G, Mackenzie JM. 2010. The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *Journal of Virology* 84: 10438–10447.
- Gilpin W, Bull MS, Prakash M. 2020. The multiscale physics of cilia and flagella. *Nature Reviews Physics* 2: 74–88.
- Girard J, Le-Bihan O, Lai-Kee-Him J, Girleanu M, Bernard E, Castellarin C, Neyret A, Spehner D, Holy X, Favier A-L, Briant L, Bron P. 2023a. In situ characterization of late Chikungunya virus replication organelle. 2023.02.25.530016.
- Girard J, Le-Bihan O, Lai-Kee-Him J, Girleanu M, Bernard E, Castellarin C, Neyret A, Spehner D, Holy X, Favier A-L, Briant L, Bron P. 2023b. In situ characterization of late Chikungunya virus replication organelle. 2023.02.25.530016.
- Go YY, Nam S, Hwang WYH, Jung E. 2020. Identification of a heat shock protein 90 inhibitor with antiviral activity against in vitro Chikungunya virus infection. *International Journal of Infectious Diseases* 101: 253.
- Goertz GP, McNally KL, Robertson SJ, Best SM, Pijlman GP, Fros JJ. 2018. The Methyltransferase-Like Domain of Chikungunya Virus nsP2 Inhibits the Interferon Response by Promoting the Nuclear Export of STAT1. *J Virol* 92.
- Goitre L, Trapani E, Trabalzini L, Retta SF. 2014. The Ras Superfamily of Small GTPases: The Unlocked Secrets. Pages 1–18 in Trabalzini L and Retta SF, eds. *Ras Signaling: Methods and Protocols*. Humana Press.
- Golebiewski L, Liu H, Javier RT, Rice AP. 2011. The Avian Influenza Virus NS1 ESEV PDZ Binding Motif Associates with Dlg1 and Scribble To Disrupt Cellular Tight Junctions  $\nabla$ . *Journal of Virology* 85: 10639–10648.

- Gomathinayagam R, Muralidharan J, Ha JH, Varadarajalu L, Dhanasekaran DN. 2014. Hax-1 is required for Rac1-Cortactin interaction and ovarian carcinoma cell migration. *Genes & Cancer* 5: 84–99.
- Gomez de Cedrón M, Ehsani N, Mikkola ML, García JA, Kääriäinen L. 1999. RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2. *FEBS letters* 448: 19–22.
- Gómez-SanJuan A, Gamo A-M, Delang L, Pérez-Sánchez A, Amrun SN, Abdelnabi R, Jacobs S, Priego E-M, Camarasa M-J, Jochmans D, Leyssen P, Ng LFP, Querat G, Neyts J, Pérez-Pérez M-J. 2018. Inhibition of the Replication of Different Strains of Chikungunya Virus by 3-Aryl-[1,2,3]triazolo[4,5- d]pyrimidin-7(6 H)-ones. *ACS infectious diseases* 4: 605–619.
- Gorbalenya AE, Koonin EV. 1993. Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Current Opinion in Structural Biology* 3: 419–429.
- Gorchakov R, Frolova E, Frolov I. 2005. Inhibition of transcription and translation in Sindbis virus-infected cells. *Journal of Virology* 79: 9397–9409.
- Gorchakov R, Wang E, Leal G, Forrester NL, Plante K, Rossi SL, Partidos CD, Adams AP, Seymour RL, Weger J, Borland EM, Sherman MB, Powers AM, Osorio JE, Weaver SC. 2012. Attenuation of Chikungunya Virus Vaccine Strain 181/Clone 25 Is Determined by Two Amino Acid Substitutions in the E2 Envelope Glycoprotein. *Journal of Virology* 86: 6084–6096.
- Gosert R, Kanjanahaluethai A, Egger D, Bienz K, Baker SC. 2002. RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *Journal of Virology* 76: 3697–3708.
- Götte B, Liu L, McInerney G. 2018. The Enigmatic Alphavirus Non-Structural Protein 3 (nsP3) Revealing Its Secrets at Last. *Viruses* 10.
- Götte B, Panas MD, Hellström K, Liu L, Samreen B, Larsson O, Ahola T, McInerney GM. 2019. Separate domains of G3BP promote efficient clustering of alphavirus replication complexes and recruitment of the translation initiation machinery. *PLoS pathogens* 15: e1007842.
- Grandadam M, Caro V, Plumet S, Thiberge J-M, Souarès Y, Failloux A-B, Tolou HJ, Budelot M, Cosserat D, Lepercq-Goffart I, Desprès P. 2011. Chikungunya Virus, Southeastern France - Volume 17, Number 5—May 2011 - *Emerging Infectious Diseases journal* - CDC.
- Greseth MD, Carter DC, Terhune SS, Traktman P. 2017. Proteomic Screen for Cellular Targets of the Vaccinia Virus F10 Protein Kinase Reveals that Phosphorylation of mDia Regulates Stress Fiber Formation. *Molecular & Cellular Proteomics* : MCP 16: S124–S143.
- Grief C, Galler R, Côrtes LM, Barth OM. 1997. Intracellular localisation of dengue-2 RNA in mosquito cell culture using electron microscopic in situ hybridisation. *Archives of Virology* 142: 2347–2357.

- Grimley PM, Berezesky IK, Friedman RM. 1968. Cytoplasmic structures associated with an arbovirus infection: loci of viral ribonucleic acid synthesis. *J Virol* 2: 1326–38.
- Guerrier S, Coutinho-Budd J, Sassa T, Gresset A, Jordan NV, Chen K, Jin W-L, Frost A, Polleux F. 2009. The F-BAR domain of srGAP2 induces membrane protrusions required for neuronal migration and morphogenesis. *Cell* 138: 990–1004.
- Guo R, Katz BB, Tomich JM, Gallagher T, Fang Y. 2016. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Utilizes Nanotubes for Intercellular Spread. *Journal of Virology* 90: 5163–5175.
- Hafer A, Whittlesey R, Brown DT, Hernandez R. 2009. Differential Incorporation of Cholesterol by Sindbis Virus Grown in Mammalian or Insect Cells. *Journal of Virology* 83: 9113–9121.
- Hafez IM, Cullis PR. 2001. Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47: 139–148.
- Haist KC, Burrack KS, Davenport BJ, Morrison TE. 2017. Inflammatory monocytes mediate control of acute alphavirus infection in mice. *PLOS Pathogens* 13.
- Hallengård D, Kakoulidou M, Lulla A, Kümmerer BM, Johansson DX, Mutso M, Lulla V, Fazakerley JK, Roques P, Le Grand R, Merits A, Liljeström P. 2014. Novel Attenuated Chikungunya Vaccine Candidates Elicit Protective Immunity in C57BL/6 mice. *Journal of Virology* 88: 2858–2866.
- Haller C, Rauch S, Michel N, Hannemann S, Lehmann MJ, Keppler OT, Fackler OT. 2006. The HIV-1 pathogenicity factor Nef interferes with maturation of stimulatory T-lymphocyte contacts by modulation of N-Wasp activity. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 19618–19630.
- Halstead SB. 2015. Reappearance of Chikungunya, Formerly Called Dengue, in the Americas. *Emerging Infectious Diseases* 21: 557–561.
- Handa Y, Durkin CH, Dodding MP, Way M. 2013. Vaccinia virus F11 promotes viral spread by acting as a PDZ-containing scaffolding protein to bind myosin-9A and inhibit RhoA signaling. *Cell Host & Microbe* 14: 51–62.
- Harak C, Lohmann V. 2015. Ultrastructure of the replication sites of positive-strand RNA viruses. *Virology*.
- Hardy RW, Rice CM. 2005. Requirements at the 3' End of the Sindbis Virus Genome for Efficient Synthesis of Minus-Strand RNA. *Journal of Virology* 79: 4630–4639.
- Harrison VR, Binn LN, Randall R. 1967. Comparative immunogenicities of chikungunya vaccines prepared in avian and mammalian tissues. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 16: 786–791.



- Harrison VR, Eckels KH, Bartelloni PJ, Hampton C. 1971. Production and evaluation of a formalin-killed Chikungunya vaccine. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 107: 643–647.
- Hatzakis NS, Bhatia VK, Larsen J, Madsen KL, Bolinger P-Y, Kunding AH, Castillo J, Gether U, Hedegård P, Stamou D. 2009. How curved membranes recruit amphipathic helices and protein anchoring motifs. *Nature Chemical Biology* 5: 835–841.
- Heaton NS, Perera R, Berger KL, Khadka S, Lacount DJ, Kuhn RJ, Randall G. 2010. Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 17345–17350.
- Heissler SM, Manstein DJ. 2013. Nonmuscle myosin-2: mix and match. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70: 1–21.
- Hellstrom K, Kallio K, Utt A, Quirin T, Jokitalo E. 2017. Partially Uncleaved Alphavirus Replicase Forms Spherule Structures in the Presence and Absence of RNA Template. *J Virol* 91.
- Henß L, Beck S, Weidner T, Biedenkopf N, Sliva K, Weber C, Becker S, Schnierle BS. 2016. Suramin is a potent inhibitor of Chikungunya and Ebola virus cell entry. *Virology Journal* 13: 149.
- Her Z, Malleret B, Chan M, Ong EKS, Wong S-C. 2010. Active Infection of Human Blood Monocytes by Chikungunya Virus Triggers an Innate Immune Response. *J.I* 184: 5903–13.
- Hernandez-Gonzalez M, Larocque G, Way M. 2021. Viral use and subversion of membrane organization and trafficking. *Journal of cell science* 134: jcs252676.
- Hillaireau H, Couvreur P. 2009. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 66: 2873–2896.
- Hirayama T, Danks L, Sabokbar A, Athanasou NA. 2002. Osteoclast formation and activity in the pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* 41: 1232–1239.
- Ho Y-J, Wang Y-M, Lu J, Wu T-Y, Lin L-I, Kuo S-C, Lin C-C. 2015. Suramin Inhibits Chikungunya Virus Entry and Transmission. *PLoS ONE* 10: e0133511.
- Hoarau J-J, Jaffar Bandjee M-C, Krejbich Trotot P, Das T, Li-Pat-Yuen G, Dassa B, Denizot M, Guichard E, Ribera A, Henni T, Tallet F, Moiton MP, Gauzère BA, Bruniquet S, Jaffar Bandjee Z, Morbidelli P, Martigny G, Jolivet M, Gay F, Grandadam M, Tolou H, Vieillard V, Debré P, Autran B, Gasque P. 2010. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184: 5914–5927.
- van der Hoeven B, Oudshoorn D, Koster AJ, Snijder EJ, Kikkert M, Bárcena M. 2016. Biogenesis and architecture of arterivirus replication organelles. *Virus Research* 220: 70–90.

- Hoorweg TE, van Duijl-Richter MKS, Ayala Nuñez NV, Albuлесcu IC, van Hemert MJ, Smit JM. 2016. Dynamics of Chikungunya Virus Cell Entry Unraveled by Single-Virus Tracking in Living Cells. *Journal of Virology* 90: 4745–4756.
- Hoz JM de la, Bayona B, Vilorio S, Accini JL, Juan-Vergara HS, Viasus D. 2015. Fatal cases of Chikungunya virus infection in Colombia: Diagnostic and treatment challenges. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 69: 27–29.
- Hsu W-B, Shih J-L, Shih J-R, Du J-L, Teng S-C, Huang L-M, Wang W-B. 2013. Cellular Protein HAX1 Interacts with the Influenza A Virus PA Polymerase Subunit and Impedes Its Nuclear Translocation. *Journal of Virology* 87: 110–123.
- Hunziker A, Glas I, Pohl MO, Stertz S. 2022. Phosphoproteomic profiling of influenza virus entry reveals infection-triggered filopodia induction counteracted by dynamic cortactin phosphorylation. *Cell Reports* 38: 110306.
- Hyde JL, Chen R, Trobaugh DW, Diamond MS, Weaver SC, Klimstra WB, Wilusz J. 2015. The 5' and 3' ends of alphavirus RNAs – Non-coding is not non-functional. *Virus Research* 206: 99–107.
- Hylton RK, Heebner JE, Grillo MA, Swulius MT. 2022. Cofilactin filaments regulate filopodial structure and dynamics in neuronal growth cones. *Nature Communications* 13: 2439.
- Infante RE, Wang ML, Radhakrishnan A, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. 2008. NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 15287–15292.
- Inglot AD. 1969. Comparison of the antiviral activity in vitro of some non-steroidal anti-inflammatory drugs. *The Journal of General Virology* 4: 203–214.
- Innocenti M, Zucconi A, Disanza A, Frittoli E, Areces LB, Steffen A, Stradal TEB, Di Fiore PP, Carlier M-F, Scita G. 2004. Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nature Cell Biology* 6: 319–327.
- Inoue S, Morita K, Matias RR, Tuplano JV, Resuello RRG, Candelario JR, Cruz DJM, Mapua CA, Hasebe F, Igarashi A, Natividad FF. 2003. Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines. *Journal of Medical Primatology* 32: 89–94.
- International Vaccine Institute. 2022. A Phase II/III Adaptive Seamless Design, Randomized, Controlled Trial To Evaluate Safety And Immunogenicity of 2 Dose-Regimen Of BBV87 Chikungunya Vaccine In Healthy Subjects Aged 12 to 65 Years In Panama, Colombia, and Thailand. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov). Report no. NCT04566484.
- Ivanova L, Le L, Schlesinger MJ. 1995. Characterization of revertants of a Sindbis virus 6K gene mutant that affects proteolytic processing and virus assembly. *Virus Research* 39: 165–179.

- Ivanova L, Schlesinger MJ. 1993. Site-directed mutations in the Sindbis virus E2 glycoprotein identify palmitoylation sites and affect virus budding. *Journal of Virology* 67: 2546–2551.
- Jacinto A, Wolpert L. 2001. Filopodia. *Current biology: CB* 11: R634.
- Jacquemet G, Green DM, Bridgewater RE, von Kriegsheim A, Humphries MJ, Norman JC, Caswell PT. 2013a. RCP-driven  $\alpha 5\beta 1$  recycling suppresses Rac and promotes RhoA activity via the RacGAP1-IQGAP1 complex. *The Journal of Cell Biology* 202: 917–935.
- Jacquemet G, Morgan MR, Byron A, Humphries JD, Choi CK, Chen CS, Caswell PT, Humphries MJ. 2013b. Rac1 is deactivated at integrin activation sites through an IQGAP1–filamin-A–RacGAP1 pathway. *Journal of Cell Science* 126: 4121–4135.
- Jansen MD, Bang Jensen B, McLoughlin MF, Rodger HD, Taksdal T, Sindre H, Graham DA, Lillehaug A. 2017. The epidemiology of pancreas disease in salmonid aquaculture: a summary of the current state of knowledge. *Journal of Fish Diseases* 40: 141–155.
- Jansens RJJ, Van den Broeck W, De Pelsmaeker S, Lamote JAS, Van Waesberghe C, Couck L, Favoreel HW. 2017. Pseudorabies Virus US3-Induced Tunneling Nanotubes Contain Stabilized Microtubules, Interact with Neighboring Cells via Cadherins, and Allow Intercellular Molecular Communication. *Journal of Virology* 91: e00749-17.
- Jayabalan AK, Adivarahan S, Koppula A, Abraham R, Batish M, Zenklusen D, Griffin DE, Leung AKL. 2021. Stress granule formation, disassembly, and composition are regulated by alphavirus ADP-ribosylhydrolase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118: e2021719118.
- Jemielity S, Wang JJ, Chan YK, Ahmed AA, Li W. 2013. TIM-family proteins promote infection of multiple enveloped viruses through virion-associated phosphatidylserine. *PLoS Pathog* 9.
- Jhan M-K, Tsai T-T, Chen C-L, Tsai C-C, Cheng Y-L, Lee Y-C, Ko C-Y, Lin Y-S, Chang C-P, Lin L-T, Lin C-F. 2017. Dengue virus infection increases microglial cell migration. *Scientific Reports* 7: 91.
- Jin J, Galaz-Montoya JG, Sherman MB, Sun SY, Goldsmith CS, O'Toole ET, Ackerman L, Carlson L-A, Weaver SC, Chiu W, Simmons G. 2018a. Neutralizing Antibodies Inhibit Chikungunya Virus Budding at the Plasma Membrane. *Cell host & microbe* 24: 417-428.e5.
- Jin X, Cao X, Wang X, Jiang J, Wan J, Laliberté J-F, Zhang Y. 2018b. Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Plant Virus Replication. *Frontiers in Plant Science* 9: 57.
- Jones PH, Maric M, Madison MN, Maury W, Roller RJ, Okeoma CM. 2013. BST-2/tetherin-mediated restriction of chikungunya (CHIKV) VLP budding is counteracted by CHIKV non-structural protein 1 (nsP1). *Virology* 438: 37–49.

- Jones R, Bragagnolo G, Arranz R, Reguera J. 2020a. Capping pores of alphavirus nsP1 gate membranous viral replication factories. *Nature*.
- Jones R, Hons M, Rabah N, Zamarreño N, Arranz R, Reguera J. 2023. Structural basis and dynamics of Chikungunya alphavirus RNA capping by nsP1 capping pores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 120: e2213934120.
- Jones T, Liu A, Cui B. 2020b. Light-Inducible Generation of Membrane Curvature in Live Cells with Engineered BAR Domain Proteins. *ACS synthetic biology* 9: 893–901.
- Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ. 2009. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiology* 4: 837–856.
- Jose J, Taylor AB, Kuhn RJ. 2017a. Spatial and Temporal Analysis of Alphavirus Replication and Assembly in Mammalian and Mosquito Cells. *mBio* 8: e02294-16.
- Jose J, Taylor AB, Kuhn RJ. 2017b. Spatial and Temporal Analysis of Alphavirus Replication and Assembly in Mammalian and Mosquito Cells. *mBio* 8: e02294-16.
- Joubert P-E, Stapleford K, Guivel-Benhassine F, Vignuzzi M, Schwartz O, Albert ML. 2015. Inhibition of mTORC1 Enhances the Translation of Chikungunya Proteins via the Activation of the MnK/eIF4E Pathway. *PLoS pathogens* 11: e1005091.
- Jouvenet N, Windsor M, Rietdorf J, Hawes P, Monaghan P, Way M, Wileman T. 2006. African swine fever virus induces filopodia-like projections at the plasma membrane. *Cellular Microbiology* 8: 1803–1811.
- Jupille HJ, Oko L, Stoermer KA, Heise MT, Mahalingam S. 2011. Mutations in nsP1 and PE2 are critical determinants of Ross River virus-induced musculoskeletal inflammatory disease in a mouse model. *Virology* 410: 216–27.
- Kage F, Döring H, Mietkowska M, Schaks M, Grüner F, Stahnke S, Steffen A, Müsken M, Stradal TEB, Rottner K. 2022. Lamellipodia-like actin networks in cells lacking WAVE regulatory complex. *Journal of Cell Science* 135: jcs260364.
- Kallio K, Hellstrom K, Balistreri G, Spuul P, Jokitalo E, Ahola T. 2013. Template RNA length determines the size of replication complex spherules for Semliki Forest virus. *J Virol* 87: 9125–34.
- Kamal MM, Mills D, Grzybek M, Howard J. 2009. Measurement of the membrane curvature preference of phospholipids reveals only weak coupling between lipid shape and leaflet curvature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 22245–22250.
- Kamer G, Argos P. 1984. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Research* 12: 7269–7282.
- Kameritsch P, Kiemer F, Beck H, Pohl U, Pogoda K. 2015. Cx43 increases serum induced filopodia formation via activation of p21-activated protein kinase 1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853: 2907–2917.

- Kanlaya R, Pattanakitsakul S, Sinchaikul S, Chen S-T, Thongboonkerd V. 2010. Vimentin interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and dengue nonstructural protein 1 and is important for viral replication and release. *Molecular bioSystems* 6: 795–806.
- Kariuki Njenga M, Nderitu L, Ledermann JP, Ndirangu A, Logue CH, Kelly CHL, Sang R, Serگون K, Breiman R, Powers AM. 2008. Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. *The Journal of General Virology* 89: 2754–2760.
- Kast DJ, Yang C, Disanza A, Boczkowska M, Madasu Y, Scita G, Svitkina T, Dominguez R. 2014. Mechanism of IRSp53 inhibition and combinatorial activation by Cdc42 and downstream effectors. *Nature Structural & Molecular Biology* 21: 413–422.
- Keck F, Brooks-Faulconer T, Lark T, Ravishankar P, Bailey C, Salvador-Morales C, Narayanan A. 2017. Altered mitochondrial dynamics as a consequence of Venezuelan Equine encephalitis virus infection. *Virulence* 8: 1849–1866.
- Kedersha N, Panas MD, Achorn CA, Lyons S, Tisdale S. 2016. G3BP-Caprin1-USP10 complexes mediate stress granule condensation and associate with 40S subunits. *J Cell Biol* 212: 845–60.
- Kendra JA, de la Fuente C, Brahms A, Woodson C, Bell TM, Chen B, Khan YA, Jacobs JL, Kehn-Hall K, Dinman JD. 2017. Ablation of Programmed –1 Ribosomal Frameshifting in Venezuelan Equine Encephalitis Virus Results in Attenuated Neuropathogenicity. *Journal of Virology* 91: e01766-16.
- Khan AH, Morita K, Parquet MDC, Hasebe F, Mathenge EGM, Igarashi A. 2002. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *The Journal of General Virology* 83: 3075–3084.
- Kiiver K, Tagen I, Žusinaite E, Tamberg N, Fazakerley JK, Merits A. 2008. Properties of non-structural protein 1 of Semliki Forest virus and its interference with virus replication. *The Journal of General Virology* 89: 1457–1466.
- Kim DY, Reynaud JM, Rasaloukaya A, Akhrymuk I, Mobley JA. 2016. New World and Old World Alphaviruses Have Evolved to Exploit Different Components of Stress Granules, FXR and G3BP Proteins, for Assembly of Viral Replication Complexes. *PLOS Pathogens* 12.
- Kirchhausen T, Owen D, Harrison SC. 2014. Molecular Structure, Function, and Dynamics of Clathrin-Mediated Membrane Traffic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6: a016725.
- Klimstra WB, Nangle EM, Smith MS, Yurochko AD, Ryman KD. 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: 12022–12032.
- ten Klooster JP, Jaffer ZM, Chernoff J, Hordijk PL. 2006. Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor beta-Pix. *The Journal of Cell Biology* 172: 759–769.

- Knoops K, Bárcena M, Limpens RWAL, Koster AJ, Mommaas AM, Snijder EJ. 2012. Ultrastructural characterization of arterivirus replication structures: reshaping the endoplasmic reticulum to accommodate viral RNA synthesis. *Journal of Virology* 86: 2474–2487.
- Knoops K, Kikkert M, Worm SH, Zevenhoven-Dobbe JC, Meer Y. 2008. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol* 6.
- Koh WH, Lopez P, Ajibola O, Parvarchian R, Mohammad U, Hnatiuk R, Kindrachuk J, Murooka TT. 2020. HIV-Captured DCs Regulate T Cell Migration and Cell-Cell Contact Dynamics to Enhance Viral Spread. *iScience* 23: 101427.
- Kolesnikova L, Bohil AB, Cheney RE, Becker S. 2007. Budding of Marburgvirus is associated with filopodia. *Cellular Microbiology* 9: 939–951.
- Kooijman EE, Chupin V, Fuller NL, Kozlov MM, de Kruijff B, Burger KNJ, Rand PR. 2005. Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry* 44: 2097–2102.
- Koonin EV. 1991. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *The Journal of General Virology* 72 ( Pt 9): 2197–2206.
- Koonin EV, Senkevich TG, Dolja VV. 2006. The ancient Virus World and evolution of cells. *Biology Direct* 1: 29.
- Koonin EV, Wolf YI, Nagasaki K, Dolja VV. 2008. The Big Bang of picorna-like virus evolution antedates the radiation of eukaryotic supergroups. *Nature Reviews. Microbiology* 6: 925–939.
- Kopek BG, Perkins G, Miller DJ, Ellisman MH, Ahlquist P. 2007. Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. *PLoS Biol* 5.
- Kopek BG, Settles EW, Friesen PD, Ahlquist P. 2010. Nodavirus-Induced Membrane Rearrangement in Replication Complex Assembly Requires Replicase Protein A, RNA Templates, and Polymerase Activity. *Journal of Virology* 84: 12492–12503.
- Korobova F, Svitkina T. 2008. Arp2/3 Complex Is Important for Filopodia Formation, Growth Cone Motility, and Neuritogenesis in Neuronal Cells. *Molecular Biology of the Cell* 19: 1561–1574.
- Kovar DR, Pollard TD. 2004. Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14725–14730.
- Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, Moore CG, Carvalho RG, Coelho GE, Van Bortel W, Hendrickx G, Schaffner F, Elyazar IR, Teng H-J, Brady OJ, Messina JP, Pigott DM, Scott TW, Smith DL, Wint GW, Golding N, Hay SI. 2015. The

- global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife* 4: e08347.
- Kril V, Aïqui-Reboul-Paviet O, Briant L, Amara A. 2021. New Insights into Chikungunya Virus Infection and Pathogenesis. *Annual Review of Virology* 8: 327–347.
- Krimm S. 1980. The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes, Charles Tanford, Wiley-Interscience, New York, 1980, 233 pp. price: \$18.50. *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition* 18: 687–687.
- Krishnamoorthy K, Harichandrakumar KT, Krishna Kumari A, Das LK. 2009. Burden of chikungunya in India: estimates of disability adjusted life years (DALY) lost in 2006 epidemic. *Journal of Vector Borne Diseases* 46: 26–35.
- Kuadkitkan A, Wikan N, Fongsaran C, Smith DR. 2010. Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. *Virology* 406: 149–61.
- Kuhn R. 1958. The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *The American Journal of Psychiatry* 115: 459–464.
- Kuhn RJ, Hong Z, Strauss JH. 1990. Mutagenesis of the 3' nontranslated region of Sindbis virus RNA. *Journal of Virology* 64: 1465–1476.
- Kumar A, Kim JH, Ranjan P, Metcalfe MG, Cao W, Mishina M, Gangappa S, Guo Z, Boyden ES, Zaki S, York I, García-Sastre A, Shaw M, Sambhara S. 2017. Influenza virus exploits tunneling nanotubes for cell-to-cell spread. *Scientific Reports* 7: 40360.
- Kumar M, Sudeep AB, Arankalle VA. 2012. Evaluation of recombinant E2 protein-based and whole-virus inactivated candidate vaccines against chikungunya virus. *Vaccine* 30: 6142–6149.
- Kumar NP, Joseph R, Kamaraj T, Jambulingam P. 2008. A226V mutation in virus during the 2007 chikungunya outbreak in Kerala, India. *The Journal of General Virology* 89: 1945–1948.
- Kümmerer BM, Grywna K, Gläser S, Wieseler J, Drosten C. 2012. Construction of an infectious Chikungunya virus cDNA clone and stable insertion of mCherry reporter genes at two different sites. *The Journal of General Virology* 93: 1991–1995.
- Kurella VB, Richard JM, Parke CL, LeCour LF, Bellamy HD, Worthylake DK. 2009. Crystal Structure of the GTPase-activating Protein-related Domain from IQGAP1. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 14857–14865.
- Kusumi A, Nakada C, Ritchie K, Murase K, Suzuki K, Murakoshi H, Kasai RS, Kondo J, Fujiwara T. 2005. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 34: 351–378.

- Laakkonen P, Ahola T, Kaariainen L. 1996. The effects of palmitoylation on membrane association of Semliki forest virus RNA capping enzyme. *J Biol Chem* 271: 28567–71.
- Laakkonen P, Auvinen P, Kujala P, Kääriäinen L. 1998a. Alphavirus replicase protein NSP1 induces filopodia and rearrangement of actin filaments. *Journal of Virology* 72: 10265–10269.
- Laakkonen P, Auvinen P, Kujala P, Kaariainen L. 1998b. Alphavirus replicase protein NSP1 induces filopodia and rearrangement of actin filaments. *J Virol* 72: 10265–9.
- Laakkonen P, Hyvönen M, Peränen J, Kääriäinen L. 1994. Expression of Semliki Forest virus nsP1-specific methyltransferase in insect cells and in *Escherichia coli*. *Journal of Virology* 68: 7418–7425.
- Labadie K, Larcher T, Joubert C, Mannioui A, Delache B, Brochard P, Guigand L, Dubreil L, Lebon P, Verrier B, de Lamballerie X, Suhrbier A, Cherel Y, Le Grand R, Roques P. 2010. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *The Journal of Clinical Investigation* 120: 894–906.
- Lahariya C, Pradhan SK. 2006. Emergence of chikungunya virus in Indian subcontinent after 32 years: A review. *Journal of Vector Borne Diseases* 43: 151–160.
- Lam CK, Zhao W, Cai W, Vafiadaki E, Florea SM, Ren X, Liu Y, Robbins N, Zhang Z, Zhou X, Jiang M, Rubinstein J, Jones WK, Kranias EG. 2013. Novel role of HAX-1 in ischemic injury protection involvement of heat shock protein 90. *Circulation Research* 112: 79–89.
- Lamb MC, Tootle TL. 2020. Fascin in Cell Migration: More Than an Actin Bundling Protein. *Biology* 9: 403.
- de Lamballerie X, Leroy E, Charrel RN, Tsetsarkin K, Higgs S, Gould EA. 2008. Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *Virology Journal* 5: 33.
- Lampio A, Ahola T, Darzynkiewicz E, Stepinski J, Jankowska-Anyszka M, Kääriäinen L. 1999. Guanosine nucleotide analogs as inhibitors of alphavirus mRNA capping enzyme. *Antiviral Research* 42: 35–46.
- Lampio A, Kilpeläinen I, Pesonen S, Karhi K, Auvinen P, Somerharju P, Kääriäinen L. 2000. Membrane binding mechanism of an RNA virus-capping enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 37853–37859.
- Lanciotti RS, Valadere AM. 2014. Transcontinental Movement of Asian Genotype Chikungunya Virus. *Emerging Infectious Diseases* 20: 1400–1402.
- Lange K. 2011. Fundamental role of microvilli in the main functions of differentiated cells: Outline of an universal regulating and signaling system at the cell periphery. *Journal of Cellular Physiology* 226: 896–927.
- Langsjoen RM, Haller SL, Roy CJ, Vinet-Oliphant H, Bergren NA, Erasmus JH, Livengood JA, Powell TD, Weaver SC, Rossi SL. 2018. Chikungunya Virus Strains Show Lineage-Specific



- Variations in Virulence and Cross-Protective Ability in Murine and Nonhuman Primate Models. *mBio* 9: e02449-17.
- LaPointe AT, Gebhart NN, Meller ME, Hardy RW, Sokoloski KJ. 2018a. Identification and Characterization of Sindbis Virus RNA-Host Protein Interactions. *Journal of Virology* 92: e02171-17.
- LaPointe AT, Landers VD, Westcott CE, Sokoloski KJ. 2020. Production of Noncapped Genomic RNAs Is Critical to Sindbis Virus Disease and Pathogenicity. *mBio* 11: e02675-20.
- LaPointe AT, Moreno-Contreras J, Sokoloski KJ. 2018b. Increasing the Capping Efficiency of the Sindbis Virus nsP1 Protein Negatively Affects Viral Infection. *mBio* 9: e02342-18.
- Lasswitz L, Zapatero-Belinchón FJ, Moeller R, Hülskötter K, Laurent T, Carlson L-A, Goffinet C, Simmons G, Baumgärtner W, Gerold G. 2022. The Tetraspanin CD81 Is a Host Factor for Chikungunya Virus Replication. *mBio* 13: e0073122.
- Laurent T, Kumar P, Liese S, Zare F, Jonasson M, Carlson A, Carlson L-A. 2022. Architecture of the chikungunya virus replication organelle. *eLife* 11: e83042.
- Lavergne A, de Thoisy B, Lacoste V, Pascalis H, Pouliquen J-F, Mercier V, Tolou H, Dussart P, Morvan J, Talarmin A, Kazanji M. 2006. Mayaro virus: complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. *Virus Research* 117: 283–290.
- Law Y-S, Wang S, Tan YB, Shih O, Utt A, Goh WY, Lian B-J, Chen MW, Jeng U-S, Merits A, Luo D. 2021. Interdomain Flexibility of Chikungunya Virus nsP2 Helicase-Protease Differentially Influences Viral RNA Replication and Infectivity. *Journal of Virology* 95: e01470-20.
- Lawson CD, Ridley AJ. 2018. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *The Journal of Cell Biology* 217: 447–457.
- Le Breton M, Meyniel-Schicklin L, Deloire A, Coutard B, Canard B, de Lamballerie X, Andre P, Rabourdin-Combe C, Lotteau V, Davoust N. 2011. Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen. *BMC Microbiology* 11: 234.
- Lee CH Regina, Mohamed Hussain K, Chu JJH. 2019. Macropinocytosis dependent entry of Chikungunya virus into human muscle cells. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13: e0007610.
- Lee CY, Kam Y-W, Fric J, Malleret B, Koh EGL, Prakash C, Huang W, Lee WWL, Lin C, Lin RTP, Renia L, Wang C-I, Ng LFP, Warter L. 2011. Chikungunya Virus Neutralization Antigens and Direct Cell-to-Cell Transmission Are Revealed by Human Antibody-Escape Mutants. *PLoS Pathogens* 7: e1002390.
- Lee E, Marcucci M, Daniell L, Pypaert M, Weisz OA, Ochoa G-C, Farsad K, Wenk MR, De Camilli P. 2002. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science (New York, N.Y.)* 297: 1193–1196.

- Lee K, Gallop JL, Rambani K, Kirschner MW. 2010. Self-Assembly of Filopodia-Like Structures on Supported Lipid Bilayers. *Science (New York, N.Y.)* 329: 1341–1345.
- Lee S, Owen KE, Choi HK, Lee H, Lu G, Wengler G, Brown DT, Rossmann MG, Kuhn RJ. 1996. Identification of a protein binding site on the surface of the alphavirus nucleocapsid and its implication in virus assembly. *Structure (London, England: 1993)* 4: 531–541.
- Lehmann MJ, Sherer NM, Marks CB, Pypaert M, Mothes W. 2005. Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *The Journal of Cell Biology* 170: 317–325.
- Lello LS, Bartholomeeusen K, Wang S, Coppens S, Fragkoudis R, Alphey L, Ariën KK, Merits A, Utt A. 2021. nsP4 Is a Major Determinant of Alphavirus Replicase Activity and Template Selectivity. *Journal of Virology* 95: e00355-21.
- Levitt NH, Ramsburg HH, Hasty SE, Repik PM, Cole FE, Lupton HW. 1986. Development of an attenuated strain of chikungunya virus for use in vaccine production. *Vaccine* 4: 157–162.
- Li G, Rice CM. 1993. The signal for translational readthrough of a UGA codon in Sindbis virus RNA involves a single cytidine residue immediately downstream of the termination codon. *Journal of Virology* 67: 5062–5067.
- Li L, Jose J, Xiang Y, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2010a. Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. *Nature* 468: 705–708.
- Li L, Jose J, Xiang Y, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2010b. Structural Changes of Envelope Proteins During Alphavirus Fusion. *Nature* 468: 705–708.
- Lim KYB, Gödde NJ, Humbert PO, Kvensakul M. 2017. Structural basis for the differential interaction of Scribble PDZ domains with the guanine nucleotide exchange factor  $\beta$ -PIX. *The Journal of Biological Chemistry* 292: 20425–20436.
- Limpens RWAL, van der Schaar HM, Kumar D, Koster AJ, Snijder EJ, van Kuppeveld FJM, Bárcena M. 2011. The transformation of enterovirus replication structures: a three-dimensional study of single- and double-membrane compartments. *mBio* 2: e00166-11.
- Liu R-J, Niu X-L, Yuan J-P, Chen H-D, Gao X-H, Qi R-Q. 2021. DnaJA4 is involved in responses to hyperthermia by regulating the expression of F-actin in HaCaT cells. *Chinese Medical Journal* 134: 456–462.
- Loewy A, Smyth J, von Bonsdorff CH, Liljeström P, Schlesinger MJ. 1995. The 6-kilodalton membrane protein of Semliki Forest virus is involved in the budding process. *Journal of Virology* 69: 469–475.
- Lorzate M, Kräusslich H-G. 2011. Role of lipids in virus replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: a004820.

- Lu M, Witke W, Kwiatkowski DJ, Kosik KS. 1997. Delayed Retraction of Filopodia in Gelsolin Null Mice. *The Journal of Cell Biology* 138: 1279–1287.
- Lu T, He JC, Wang Z, Feng X, Fukumi-Tominaga T, Chen N, Xu J, Iyengar R, Klotman PE. 2008. HIV-1 Nef Disrupts the Podocyte Actin Cytoskeleton by Interacting with Diaphanous Interacting Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 8173–8182.
- Lu X, Wu X, Plemenitas A, Yu H, Sawai ET, Abo A, Peterlin BM. 1996. CDC42 and Rac1 are implicated in the activation of the Nef-associated kinase and replication of HIV-1. *Current biology: CB* 6: 1677–1684.
- Luisi PL, Walde P, Oberholzer T. 1999. Lipid vesicles as possible intermediates in the origin of life. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 4: 33–39.
- Lukash T, Agback T, Dominguez F, Shiliaev N, Meshram C, Frolova EI, Agback P, Frolov I. 2020. Structural and Functional Characterization of Host FHL1 Protein Interaction with Hypervariable Domain of Chikungunya Virus nsP3 Protein. *Journal of Virology* 95: e01672-20.
- Lulla A, Lulla V, Tints K, Ahola T, Merits A. 2006. Molecular determinants of substrate specificity for Semliki Forest virus nonstructural protease. *Journal of Virology* 80: 5413–5422.
- Lumsden WH. 1955. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 49: 33–57.
- Ma B, Huang C, Ma J, Xiang Y, Zhang X. 2021. Structure of Venezuelan equine encephalitis virus with its receptor LDLRAD3. *Nature* 598: 677–681.
- Ma H, Kim AS, Kafai NM, Earnest JT, Shah AP, Case JB, Basore K, Gilliland TC, Sun C, Nelson CA, Thackray LB, Klimstra WB, Fremont DH, Diamond MS. 2020. LDLRAD3 is a receptor for Venezuelan equine encephalitis virus. *Nature* 588: 308–314.
- Macdonald G. 1957. *The Epidemiology and Control of Malaria*. The Epidemiology and Control of Malaria.
- Machesky LM, Insall RH. 1998. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Current biology: CB* 8: 1347–1356.
- Mackenzie JM, Khromykh AA, Parton RG. 2007. Cholesterol manipulation by West Nile virus perturbs the cellular immune response. *Cell Host & Microbe* 2: 229–239.
- Maldarelli F, King NW, Yagi MJ. 1987. Effects of cytoskeletal disrupting agents on mouse mammary tumor virus replication. *Virus Research* 7: 281–295.
- Mancinelli G, Lamparter L, Nosov G, Saha T, Pawluchin A, Kurre R, Rasch C, Ebrahimkutty M, Klingauf J, Galic M. 2021. Dendrite tapering actuates a self-organizing signaling circuit

- for stochastic filopodia initiation in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118: e2106921118.
- Mancini EJ, Clarke M, Gowen BE, Rutten T, Fuller SD. 2000. Cryo-electron microscopy reveals the functional organization of an enveloped virus, Semliki Forest virus. *Molecular Cell* 5: 255–266.
- Marei H, Carpy A, Woroniuk A, Vennin C, White G, Timpson P, Macek B, Malliri A. 2016. Differential Rac1 signalling by guanine nucleotide exchange factors implicates FLII in regulating Rac1-driven cell migration. *Nature Communications* 7: 10664.
- Martin S, Saha B, Riley JL. 2012. The Battle over mTOR: An Emerging Theatre in Host–Pathogen Immunity. *PLoS Pathogens* 8: e1002894.
- Martín-Acebes MA, Blázquez A-B, Jiménez de Oya N, Escribano-Romero E, Saiz J-C. 2011. West Nile virus replication requires fatty acid synthesis but is independent on phosphatidylinositol-4-phosphate lipids. *PloS One* 6: e24970.
- Martinez MG, Kielian M. 2016. Intercellular Extensions Are Induced by the Alphavirus Structural Proteins and Mediate Virus Transmission. *PLoS pathogens* 12: e1006061.
- Martinez MG, Snapp E-L, Perumal GS, Macaluso FP, Kielian M. 2014a. Imaging the Alphavirus Exit Pathway. *Journal of Virology* 88: 6922–6933.
- Martinez MG, Snapp EL, Perumal GS, Macaluso FP, Kielian M. 2014b. Imaging the alphavirus exit pathway. *J Virol* 88: 6922–33.
- Mathiot CC, Grimaud G, Garry P, Bouquety JC, Mada A, Daguisy AM, Georges AJ. 1990. An outbreak of human Semliki Forest virus infections in Central African Republic. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42: 386–393.
- Matkovic R, Bernard E, Fontanel S, Eldin P, Chazal N, Hassan Hersi D, Merits A, Péloponèse J-M, Briant L. 2019. The Host DHX9 DExH-Box Helicase Is Recruited to Chikungunya Virus Replication Complexes for Optimal Genomic RNA Translation. *Journal of Virology* 93: e01764-18.
- Mavalankar D, Govil D, Trivedi N, Patel V. 2010. Prevalence of various symptoms and cost of treatment during the chikungunya epidemic in Ahmedabad, Gujarat, India, in 2006.
- Mazur AJ, Gremm D, Dansranjavin T, Litwin M, Jockusch BM, Wegner A, Weeds AG, Mannherz HG. 2010. Modulation of actin filament dynamics by actin-binding proteins residing in lamellipodia. *European Journal of Cell Biology* 89: 402–413.
- Mazzon M, Castro C, Thaa B, Liu L, Mutso M, Liu X, Mahalingam S, Griffin JL, Marsh M, McInerney GM. 2018. Alphavirus-induced hyperactivation of PI3K/AKT directs pro-viral metabolic changes. *PLoS Pathogens* 14: e1006835.
- McAllister N, Liu Y, Silva LM, Lentscher AJ, Chai W. 2020. Chikungunya Virus Strains from Each Genetic Clade Bind Sulfated Glycosaminoglycans as Attachment Factors. *Journal of Virology* 94.

- McCullough BR, Grintsevich EE, Chen CK, Kang H, Hutchison AL, Henn A, Cao W, Suarez C, Martiel J-L, Blanchoin L, Reisler E, De La Cruz EM. 2011. Cofilin-Linked Changes in Actin Filament Flexibility Promote Severing. *Biophysical Journal* 101: 151–159.
- McMahon HT, Gallop JL. 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* 438: 590–596.
- McPherson RL, Abraham R, Sreekumar E, Ong SE, Cheng SJ. 2017. ADP-ribosylhydrolase activity of Chikungunya virus macrodomain is critical for virus replication and virulence. *P Natl Acad Sci USA* 114: 1666–71.
- Medlock JM, Hansford KM, Schaffner F, Versteirt V, Hendrickx G, Zeller H, Bortel WV. 2012. A Review of the Invasive Mosquitoes in Europe: Ecology, Public Health Risks, and Control Options. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 12: 435–447.
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9: 112–124.
- Meertens L, Carnec X, Lecoïn MP, Ramdasi R, Guivel-Benhassine F, Lew E, Lemke G, Schwartz O, Amara A. 2012. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host & Microbe* 12: 544–557.
- Meertens L, Hafirassou ML, Couderc T, Bonnet-Madin L, Kril V. 2019. FHL1 is a major host factor for chikungunya virus infection. *Nature* 574: 259–63.
- Mehedi M, McCarty T, Martin SE, Nouën CL, Buehler E, Chen Y-C, Smelkinson M, Ganesan S, Fischer ER, Brock LG, Liang B, Munir S, Collins PL, Buchholz UJ. 2016. Actin-Related Protein 2 (ARP2) and Virus-Induced Filopodia Facilitate Human Respiratory Syncytial Virus Spread. *PLOS Pathogens* 12: e1006062.
- Melancon P, Garoff H. 1987. Processing of the Semliki Forest virus structural polyprotein: role of the capsid protease. *Journal of Virology* 61: 1301–1309.
- Melia CE, Peddie CJ, de Jong AWM, Snijder EJ, Collinson LM, Koster AJ, van der Schaar HM, van Kuppeveld FJM, Bárcena M. 2019. Origins of Enterovirus Replication Organelles Established by Whole-Cell Electron Microscopy. *mBio* 10: e00951-19.
- Melton JV, Ewart GD, Weir RC, Board PG, Lee E, Gage PW. 2002. Alphavirus 6K proteins form ion channels. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 46923–46931.
- Menna E, Disanza A, Cagnoli C, Schenk U, Gelsomino G, Frittoli E, Hertzog M, Offenhauser N, Sawallisch C, Kreienkamp H-J, Gertler FB, Di Fiore PP, Scita G, Matteoli M. 2009. Eps8 Regulates Axonal Filopodia in Hippocampal Neurons in Response to Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). *PLoS Biology* 7: e1000138.
- Mercer J, Helenius A. 2009. Virus entry by macropinocytosis. *Nature Cell Biology* 11: 510–520.
- Mercer J, Schelhaas M, Helenius A. 2010. Virus entry by endocytosis. *Annual Review of Biochemistry* 79: 803–833.

- Meshki J, Douglas SD, Hu M, Leeman SE, Tuluc F. 2011. Substance P Induces Rapid and Transient Membrane Blebbing in U373MG Cells in a p21-Activated Kinase-Dependent Manner. *PLoS ONE* 6: e25332.
- Meshki J, Douglas SD, Lai J-P, Schwartz L, Kilpatrick LE, Tuluc F. 2009. Neurokinin 1 Receptor Mediates Membrane Blebbing in HEK293 Cells through a Rho/Rho-associated Coiled-coil Kinase-dependent Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 9280–9289.
- Meshram CD, Agback P, Shiliaev N, Urakova N, Mobley JA. 2018. Multiple Host Factors Interact with the Hypervariable Domain of Chikungunya Virus nsP3 and Determine Viral Replication in Cell-Specific Mode. *J. Virol* 92.
- Metz SW, Geertsema C, Martina BE, Andrade P, Heldens JG, van Oers MM, Goldbach RW, Vlak JM, Pijlman GP. 2011. Functional processing and secretion of Chikungunya virus E1 and E2 glycoproteins in insect cells. *Virology Journal* 8: 353.
- Metz SW, Martina BE, van den Doel P, Geertsema C, Osterhaus AD, Vlak JM, Pijlman GP. 2013. Chikungunya virus-like particles are more immunogenic in a lethal AG129 mouse model compared to glycoprotein E1 or E2 subunits. *Vaccine* 31: 6092–6096.
- ModernaTX, Inc. 2020. A Phase 1, Randomized, Placebo-Controlled, Dose-Ranging Study to Evaluate the Safety and Immunogenicity of VAL-181388 in Healthy Adults in a Non Endemic Chikungunya Region. *clinicaltrials.gov*. Report no. NCT03325075.
- Mogilner A, Oster G. 2003. Force Generation by Actin Polymerization II: The Elastic Ratchet and Tethered Filaments. *Biophysical Journal* 84: 1591–1605.
- Mohankumar V, Dhanushkodi NR, Raju R. 2011. Sindbis virus replication, is insensitive to rapamycin and torin1, and suppresses Akt/mTOR pathway late during infection in HEK cells. *Biochemical and biophysical research communications* 406: 262–267.
- Moissoglu K, Kiessling V, Wan C, Hoffman BD, Norambuena A, Tamm LK, Schwartz MA. 2014. Regulation of Rac1 translocation and activation by membrane domains and their boundaries. *Journal of Cell Science* 127: 2565–2576.
- Møller LLV, Klip A, Sylow L. 2019. Rho GTPases—Emerging Regulators of Glucose Homeostasis and Metabolic Health. *Cells* 8: 434.
- Momboisse F, Lonchamp E, Calco V, Ceridono M, Vitale N, Bader M-F, Gasman S. 2009.  $\beta$ PIX-activated Rac1 stimulates the activation of phospholipase D, which is associated with exocytosis in neuroendocrine cells. *Journal of Cell Science* 122: 798–806.
- Mordecai EA, Cohen JM, Evans MV, Gudapati P, Johnson LR, Lippi CA, Miazgowicz K, Murdock CC, Rohr JR, Ryan SJ, Savage V, Shocket MS, Stewart Ibarra A, Thomas MB, Weikel DP. 2017. Detecting the impact of temperature on transmission of Zika, dengue, and chikungunya using mechanistic models. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11: e0005568.

- Morizono K, Xie Y, Olafsen T, Lee B, Dasgupta A, Wu AM, Chen ISY. 2011. The soluble serum protein Gas6 bridges virion envelope phosphatidylserine to the TAM receptor tyrosine kinase Axl to mediate viral entry. *Cell Host & Microbe* 9: 286–298.
- Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 6181–6186.
- Murray CJ. 1994. Quantifying the burden of disease: the technical basis for disability-adjusted life years. *Bulletin of the World Health Organization* 72: 429–445.
- Mutso M, Morro AM, Smedberg C, Kasvandik S, Aquilimeba M, Teppor M, Tarve L, Lulla A, Lulla V, Saul S, Thaa B, McInerney GM, Merits A, Varjak M. 2018. Mutation of CD2AP and SH3KBP1 Binding Motif in Alphavirus nsP3 Hypervariable Domain Results in Attenuated Virus. *Viruses* 10: 226.
- Nam S, Ga YJ, Lee J-Y, Hwang W-Y, Jung E, Shin JS, Chen W, Choi G, Zhou B, Yeh J-Y, Go YY. 2021. Radicol Inhibits Chikungunya Virus Replication by Targeting Nonstructural Protein 2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 65: 10.1128/aac.00135-21.
- Nasar F, Palacios G, Gorchakov RV, Guzman H, Da Rosa APT, Savji N, Popov VL, Sherman MB, Lipkin WI, Tesh RB, Weaver SC. 2012. Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 14622–14627.
- Navarro-Lérida I, Sánchez-Perales S, Calvo M, Rentero C, Zheng Y, Enrich C, Del Pozo MA. 2012. A palmitoylation switch mechanism regulates Rac1 function and membrane organization. *The EMBO Journal* 31: 534–551.
- Nayal A, Webb DJ, Brown CM, Schaefer EM, Vicente-Manzanares M, Horwitz AR. 2006. Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1–PIX–PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics. *Journal of Cell Biology* 173: 587–589.
- Neto ASL, Sousa GS, Nascimento OJ, Castro MC. 2019. Chikungunya-attributable deaths: A neglected outcome of a neglected disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13: e0007575.
- Neufeldt CJ, Joyce MA, Levin A, Steenbergen RH, Pang D, Shields J, Tyrrell DLJ, Wozniak RW. 2013. Hepatitis C Virus-Induced Cytoplasmic Organelles Use the Nuclear Transport Machinery to Establish an Environment Conducive to Virus Replication. *PLOS Pathogens* 9: e1003744.
- Neuvonen M, Kazlauskas A, Martikainen M, Hinkkanen A, Ahola T, Saksela K. 2011. SH3 Domain-Mediated Recruitment of Host Cell Amphiphysins by Alphavirus nsP3 Promotes Viral RNA Replication. *PLOS Pathogens* 7.
- Nevzorov IA, Levitsky DI. 2011. Tropomyosin: Double helix from the protein world. *Biochemistry (Moscow)* 76: 1507–1527.

- Neyret A, Bernard E, Aïqui-Reboul-Paviet O, Bakhache W, Eldin P, Chaloin L, Briant L. 2022. Identification of a non-canonical G3BP-binding sequence in a Mayaro virus nsP3 hypervariable domain. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12: 958176.
- Ng ML, Hong SS. 1989. Flavivirus infection: essential ultrastructural changes and association of Kunjin virus NS3 protein with microtubules. *Archives of Virology* 106: 103–120.
- Ngo KX, Kodera N, Katayama E, Ando T, Uyeda TQP. 2015. Cofilin-induced unidirectional cooperative conformational changes in actin filaments revealed by high-speed atomic force microscopy. *eLife* 4: e04806.
- Nikolic DS, Lehmann M, Felts R, Garcia E, Blanchet FP, Subramaniam S, Piguet V. 2011. HIV-1 activates Cdc42 and induces membrane extensions in immature dendritic cells to facilitate cell-to-cell virus propagation. *Blood* 118: 4841–4852.
- Nishioka T, Frohman MA, Matsuda M, Kiyokawa E. 2010. Heterogeneity of Phosphatidic Acid Levels and Distribution at the Plasma Membrane in Living Cells as Visualized by a Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Biosensor. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 35979–35987.
- Niyas KP, Abraham R, Unnikrishnan RN, Mathew T, Nair S, Manakkadan A, Issac A, Sreekumar E. 2010. Molecular characterization of Chikungunya virus isolates from clinical samples and adult *Aedes albopictus* mosquitoes emerged from larvae from Kerala, South India. *Virology Journal* 7: 189.
- Nobile C, Rudnicka D, Hasan M, Aulner N, Porrot F, Machu C, Renaud O, Prévost M-C, Hivroz C, Schwartz O, Sol-Foulon N. 2010. HIV-1 Nef Inhibits Ruffles, Induces Filopodia, and Modulates Migration of Infected Lymphocytes. *Journal of Virology* 84: 2282–2293.
- Nola S, Sebbagh M, Marchetto S, Osmani N, Nourry C, Audebert S, Navarro C, Rachel R, Montcouquiol M, Sans N, Etienne-Manneville S, Borg J-P, Santoni M-J. 2008. Scrib regulates PAK activity during the cell migration process. *Human Molecular Genetics* 17: 3552–3565.
- Nunes MRT, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MU, de Oliveira LF, Azevedo R do S da S, da Silva DEA, da Silva EVP, da Silva SP, Carvalho VL, Coelho GE, Cruz ACR, Rodrigues SG, da Silva Gonçalves Vianez JL, Nunes BT, Cardoso JF, Tesh RB, Hay SI, Pybus OG, da Costa Vasconcelos PF. 2015. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine* 13: 102.
- Nyamwaya DK, Otiende M, Omuoyo DO, Githinji G, Karanja HK, Gitonga JN, R. de Laurent Z, Otieno JR, Sang R, Kamau E, Cheruiyot S, Otieno E, Agoti CN, Bejon P, Thumbi SM, Warimwe GM. 2021. Endemic chikungunya fever in Kenyan children: a prospective cohort study. *BMC Infectious Diseases* 21: 186.
- Oh M-J, Akhtar J, Desai P, Shukla D. 2010. A role for heparan sulfate in viral surfing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391: 176–181.



- de Oliveira EC, Fonseca V, Xavier J, Adelino T, Morales Claro I, Fabri A, Marques Macario E, Viniski AE, Campos Souza CL, Gomes da Costa ES, Soares de Sousa C, Guimarães Dias Duarte F, Correia de Medeiros A, Campelo de Albuquerque CF, Venancio Cunha R, Oliveira De Moura NF, Bispo de Filippis AM, Oliveira T de, Lourenço J, de Abreu AL, Alcantara LCJ, Giovanetti M. 2021. Short report: Introduction of chikungunya virus ECSA genotype into the Brazilian Midwest and its dispersion through the Americas. *PLoS neglected tropical diseases* 15: e0009290.
- Oliver AW, He X, Borthwick K, Donne AJ, Hampson L, Hampson IN. 2011. The HPV16 E6 binding protein Tip-1 interacts with ARHGEF16, which activates Cdc42. *British Journal of Cancer* 104: 324–331.
- Osmani N, Vitale N, Borg J-P, Etienne-Manneville S. 2006. Scrib controls Cdc42 localization and activity to promote cell polarization during astrocyte migration. *Current biology: CB* 16: 2395–2405.
- Oudshoorn D, van der Hoeven B, Limpens RWAL, Beugeling C, Snijder EJ, Bárcena M, Kikkert M. 2016. Antiviral Innate Immune Response Interferes with the Formation of Replication-Associated Membrane Structures Induced by a Positive-Strand RNA Virus. *mBio* 7: e01991-16.
- Oudshoorn D, Rijs K, Limpens RWAL, Groen K, Koster AJ, Snijder EJ, Kikkert M, Bárcena M. 2017. Expression and Cleavage of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus nsp3-4 Polyprotein Induce the Formation of Double-Membrane Vesicles That Mimic Those Associated with Coronaviral RNA Replication. *mBio* 8: e01658-17.
- Oviedo-Pastrana M, Méndez N, Mattar S, Arrieta G, Gomezcaceres L. 2018. Lessons learned of emerging Chikungunya virus in two populations of social vulnerability of the Colombian tropics: epidemiological analysis. *Archives of Public Health* 76: 36.
- Owen KE, Kuhn RJ. 1996. Identification of a region in the Sindbis virus nucleocapsid protein that is involved in specificity of RNA encapsidation. *Journal of Virology* 70: 2757–2763.
- Ozden S, Lucas-Hourani M, Ceccaldi P-E, Basak A, Valentine M, Benjannet S, Hamelin J, Jacob Y, Mamchaoui K, Mouly V, Desprès P, Gessain A, Butler-Browne G, Chrétien M, Tangy F, Vidalain P-O, Seidah NG. 2008. Inhibition of Chikungunya virus infection in cultured human muscle cells by furin inhibitors: impairment of the maturation of the E2 surface glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 21899–21908.
- Padrick SB, Doolittle LK, Brautigam CA, King DS, Rosen MK. 2011. Arp2/3 complex is bound and activated by two WASP proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: E472–E479.
- PAHO/WHO. 2011. Preparedness and Response for Chikungunya Virus: Introduction in the Americas. PAHO.
- PAHO/WHO. 2022. Chikungunya - PAHO/WHO | Pan American Health Organization. (27 April 2022; <https://www.paho.org/en/topics/chikungunya>).

- Panas MD, Schulte T, Thaa B, Sandalova T, Kedersha N, Achour A, McInerney GM. 2015. Viral and Cellular Proteins Containing FGDF Motifs Bind G3BP to Block Stress Granule Formation. *PLoS Pathogens* 11: e1004659.
- Panas MD, Varjak M, Lulla A, Er Eng K, Merits A. 2012. Sequestration of G3BP coupled with efficient translation inhibits stress granules in Semliki Forest virus infection. *Molecular Biology of the Cell* 23: 4701–12.
- Partidos CD, Weger J, Brewoo J, Seymour R, Borland EM, Ledermann JP, Powers AM, Weaver SC, Stinchcomb DT, Osorio JE. 2011. Probing the Attenuation and Protective Efficacy of a Candidate Chikungunya Virus Vaccine in Mice with Compromised Interferon (IFN) Signaling. *Vaccine* 29: 3067–3073.
- Paul D, Bartenschlager R. 2013. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World Journal of Virology* 2: 32–48.
- Paul D, Hoppe S, Saher G, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. 2013. Morphological and biochemical characterization of the membranous hepatitis C virus replication compartment. *Journal of Virology* 87: 10612–10627.
- Paul D, Romero-Brey I, Gouttenoire J, Stoitsova S, Krijnse-Locker J, Moradpour D, Bartenschlager R. 2011. NS4B Self-Interaction through Conserved C-Terminal Elements Is Required for the Establishment of Functional Hepatitis C Virus Replication Complexes. *Journal of Virology* 85: 6963–6976.
- Paul SD, Singh KR. 1968. Experimental infection of *Macaca radiata* with Chikungunya virus and transmission of virus by mosquitoes. *The Indian Journal of Medical Research* 56: 802–811.
- Pavri K. 1986. Disappearance of Chikungunya virus from India and South East Asia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80: 491.
- Pegtel DM, Ellenbroek SIJ, Mertens AEE, van der Kammen RA, de Rooij J, Collard JG. 2007. The Par-Tiam1 complex controls persistent migration by stabilizing microtubule-dependent front-rear polarity. *Current biology: CB* 17: 1623–1634.
- Peng J, Wallar BJ, Flanders A, Swiatek PJ, Alberts AS. 2003. Disruption of the Diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42. *Current biology: CB* 13: 534–545.
- Peranen J, Laakkonen P, Hyvonen M, Kaariainen L. 1995. The alphavirus replicase protein nsP1 is membrane-associated and has affinity to endocytic organelles. *Virology* 208: 610–20.
- Peränen J, Takkinen K, Kalkkinen N, Kääriäinen L. 1988. Semliki Forest virus-specific non-structural protein nsP3 is a phosphoprotein. *The Journal of General Virology* 69 ( Pt 9): 2165–2178.

- Perera R, Owen KE, Tellinghuisen TL, Gorbalenya AE, Kuhn RJ. 2001. Alphavirus Nucleocapsid Protein Contains a Putative Coiled Coil  $\alpha$ -Helix Important for Core Assembly. *Journal of Virology* 75: 1–10.
- Peton Klein D. 2006. CHIKUNGUNYA : GESTION D'UNE CRISE LONGUE.
- Petrie RJ, Doyle AD, Yamada KM. 2009. Random versus directionally persistent cell migration. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10: 538–549.
- Petrie RJ, Yamada KM. 2012. At the leading edge of three-dimensional cell migration. *Journal of Cell Science* 125: 5917–5926.
- Pfeffer M, Kinney RM, Kaaden OR. 1998. The alphavirus 3'-nontranslated region: size heterogeneity and arrangement of repeated sequence elements. *Virology* 240: 100–108.
- Phuklia W, Kasisith J, Modhiran N, Rodpai E, Thannagith M. 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: 179–88.
- Pohjala L, Utt A, Varjak M, Lulla A, Merits A, Ahola T, Tammela P. 2011. Inhibitors of Alphavirus Entry and Replication Identified with a Stable Chikungunya Replicon Cell Line and Virus-Based Assays. *PLOS ONE* 6: e28923.
- Pollard TD. 1975. Electron microscopy of synthetic myosin filaments. Evidence for cross-bridge. Flexibility and copolymer formation. *The Journal of Cell Biology* 67: 93–104.
- Pollard TD. 2016. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8: a018226.
- Pollitt AY, Insall RH. 2009. WASP and SCAR/WAVE proteins: the drivers of actin assembly. *Journal of Cell Science* 122: 2575–2578.
- de Poret A, Dibsby R, Merida P, Trausch A, Inamdar K, Muriaux D. 2022. Extracellular vesicles containing the I-BAR protein IRSp53 are released from the cell plasma membrane in an Arp2/3 dependent manner. *Biology of the Cell* 114: 259–275.
- Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. 2000. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *The Journal of General Virology* 81: 471–479.
- Powers AM, Logue CH. 2007. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *The Journal of General Virology* 88: 2363–2377.
- Prévost C, Zhao H, Manzi J, Lemichez E, Lappalainen P, Callan-Jones A, Bassereau P. 2015. IRSp53 senses negative membrane curvature and phase separates along membrane tubules. *Nature Communications* 6: 8529.

- Pulmanausahakul R, Roytrakul S, Auewarakul P, Smith DR. 2011. Chikungunya in Southeast Asia: understanding the emergence and finding solutions. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases* 15: e671-676.
- Qin Y, Capaldo C, Gumbiner BM, Macara IG. 2005. The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin. *The Journal of Cell Biology* 171: 1061–1071.
- Rack JGM, Perina D, Ahel I. 2016. Macrodomains: Structure, Function, Evolution, and Catalytic Activities. *Annual Review of Biochemistry* 85: 431–454.
- Radhika V, Onesime D, Ha JH, Dhanasekaran N. 2004a. G $\alpha$ 13 stimulates cell migration through cortactin-interacting protein Hax-1. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 49406–49413.
- Radhika V, Onesime D, Ha JH, Dhanasekaran N. 2004b. G $\alpha$ 13 Stimulates Cell Migration through Cortactin-interacting Protein Hax-1\*. *Journal of Biological Chemistry* 279: 49406–49413.
- Radoshitzky SR, Pegoraro G, Chī X, Dǒng L, Chiang C-Y, Jozwick L, Clester JC, Cooper CL, Courier D, Langan DP, Underwood K, Kuehl KA, Sun MG, Cai Y, Yú S, Burk R, Zamani R, Kota K, Kuhn JH, Bavari S. 2016. siRNA Screen Identifies Trafficking Host Factors that Modulate Alphavirus Infection. *PLOS Pathogens* 12: e1005466.
- Raghu P. 2020. Functional diversity in a lipidome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117: 11191–11193.
- Rajah A, Boudreau CG, Ilie A, Wee T-L, Tang K, Borisov AZ, Orlowski J, Brown CM. 2019. Paxillin S273 Phosphorylation Regulates Adhesion Dynamics and Cell Migration through a Common Protein Complex with PAK1 and  $\beta$ PIX. *Scientific Reports* 9: 11430.
- Ramsey J, Mukhopadhyay S. 2017. Disentangling the Frames, the State of Research on the Alphavirus 6K and TF Proteins. *Viruses* 9: 228.
- Ramsey J, Renzi EC, Arnold RJ, Trinidad JC, Mukhopadhyay S. 2017. Palmitoylation of Sindbis Virus TF Protein Regulates Its Plasma Membrane Localization and Subsequent Incorporation into Virions. *Journal of Virology* 91: e02000-16.
- Rao TR, Carey DE, Pavri KM. 1965. Preliminary isolation and identification of chikungunya virus from cases of dengue-like illness in Madras city. *The Indian Journal of Medical Research* 53: 689–693.
- Rathore APS, Haystead T, Das PK, Merits A, Ng M-L, Vasudevan SG. 2014. Chikungunya virus nsP3 & nsP4 interacts with HSP-90 to promote virus replication: HSP-90 inhibitors reduce CHIKV infection and inflammation in vivo. *Antiviral Research* 103: 7–16.
- Reisinger EC, Tschismarov R, Beubler E, Wiedermann U, Firbas C, Loebermann M, Pfeiffer A, Muellner M, Tauber E, Ramsauer K. 2019. Immunogenicity, safety, and tolerability of

- the measles-vectored chikungunya virus vaccine MV-CHIK: a double-blind, randomised, placebo-controlled and active-controlled phase 2 trial. *Lancet* (London, England) 392: 2718–2727.
- Reiss S, Rebhan I, Backes P, Romero-Brey I, Erfle H, Matula P, Kaderali L, Poenisch M, Blankenburg H, Hiet M-S, Longerich T, Diehl S, Ramirez F, Balla T, Rohr K, Kaul A, Bühler S, Pepperkok R, Lengauer T, Albrecht M, Eils R, Schirmacher P, Lohmann V, Bartenschlager R. 2011. Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host & Microbe* 9: 32–45.
- Renault P, Solet J-L, Sissoko D, Balleydier E, Larrieu S, Filleul L, Lassalle C, Thiria J, Rachou E, de Valk H, Ilf D, Ledrans M, Quatresous I, Quenel P, Pierre V. 2007. A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77: 727–731.
- Renkema GH, Manninen A, Mann DA, Harris M, Saksela K. 1999. Identification of the Nef-associated kinase as p21-activated kinase 2. *Current biology: CB* 9: 1407–1410.
- Reyes Ballista JM, Miazgowicz KL, Acciani MD, Jimenez AR, Belloli RS, Havranek KE, Brindley MA. 2023. Chikungunya virus entry and infectivity is primarily facilitated through cell line dependent attachment factors in mammalian and mosquito cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 11: 1085913.
- Reynaud JM, Lulla V, Kim DY, Frolova EI, Frolov I. 2016. The SD1 Subdomain of Venezuelan Equine Encephalitis Virus Capsid Protein Plays a Critical Role in Nucleocapsid and Particle Assembly. *Journal of Virology* 90: 2008–2020.
- Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli A, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini M, Majori G, Cassone A. 2007. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *The Lancet* 370: 1840–1846.
- van Rheenen J, Song X, van Roosmalen W, Cammer M, Chen X, DesMarais V, Yip S-C, Backer JM, Eddy RJ, Condeelis JS. 2007. EGF-induced PIP2 hydrolysis releases and activates cofilin locally in carcinoma cells. *The Journal of Cell Biology* 179: 1247–1259.
- Rikkonen M. 1996. Functional significance of the nuclear-targeting and NTP-binding motifs of Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *Virology* 218: 352–361.
- Rikkonen M, Peränen J, Kääriäinen L. 1992. Nuclear and nucleolar targeting signals of Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *Virology* 189: 462–473.
- Roberts GC, Zothner C, Remenyi R, Merits A, Stonehouse NJ, Harris M. 2017. Evaluation of a range of mammalian and mosquito cell lines for use in Chikungunya virus research. *Sci Rep* 7.
- Roberts KL, Manicassamy B, Lamb RA. 2015. Influenza A virus uses intercellular connections to spread to neighboring cells. *Journal of Virology* 89: 1537–1549.

- Robinson MC. 1955. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 49: 28–32.
- Rodriguez JL, Costlow JL, Sheedy M, Yoon KT, Gabaldón AM, Steel JJ. 2022. Sindbis Virus Replication Reduces Dependence on Mitochondrial Metabolism During Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12.
- Rogers KJ, Jones-Burroughs S, Maury W, Mukhopadhyay S. 2020. TF protein of Sindbis virus antagonizes host type I interferon responses in a palmitoylation-dependent manner. *Virology* 542: 63–70.
- Romero-Brey I, Berger C, Kallis S, Kolovou A, Paul D, Lohmann V, Bartenschlager R. 2015. NS5A Domain 1 and Polyprotein Cleavage Kinetics Are Critical for Induction of Double-Membrane Vesicles Associated with Hepatitis C Virus Replication. *mBio* 6: e00759.
- Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee J-Y, Chlanda P, Haselman U, Santarella-Mellwig R, Habermann A, Hoppe S, Kallis S, Walther P, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. 2012. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS pathogens* 8: e1003056.
- Roques P, Ljungberg K, Kümmerer BM, Gosse L, Dereuddre-Bosquet N, Tchitchek N, Hallengård D, García-Arriaza J, Meinke A, Esteban M, Merits A, Le Grand R, Liljeström P. 2017. Attenuated and vectored vaccines protect nonhuman primates against Chikungunya virus. *JCI Insight* 2: e83527.
- Rose PP, Hanna SL, Spiridigliozzi A, Wannissorn N, Beiting DP, Ross SR, Hardy RW, Bambina SA, Heise MT, Cherry S. 2011. Natural Resistance-associated Macrophage Protein (NRAMP) is a cellular receptor for Sindbis virus in both insect and mammalian hosts. *Cell host & microbe* 10: 97–104.
- Ross RW. 1956. The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *Epidemiology & Infection* 54: 177–191.
- Rossi SL, Comer JE, Wang E, Azar SR, Lawrence WS, Plante JA, Ramsauer K, Schrauf S, Weaver SC. 2019. Immunogenicity and Efficacy of a Measles Virus-Vectored Chikungunya Vaccine in Nonhuman Primates. *The Journal of Infectious Diseases* 220: 735–742.
- Rotty JD, Wu C, Bear JE. 2013. New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14: 7–12.
- Rouiller I, Xu X-P, Amann KJ, Egile C, Nickell S, Nicastro D, Li R, Pollard TD, Volkman N, Hanein D. 2008. The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *The Journal of Cell Biology* 180: 887–895.
- Rousso T, Shewan AM, Mostov KE, Schejter ED, Shilo B-Z. 2013. Apical targeting of the formin Diaphanous in *Drosophila* tubular epithelia. *eLife* 2: e00666.

- Rubach JK, Wasik BR, Rupp JC, Kuhn RJ, Hardy RW, Smith JL. 2009. Characterization of purified Sindbis virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase activity in vitro. *Virology* 384: 201–208.
- Rubino S. 1984. Location of actin, myosin, and microtubular structures during directed locomotion of *Dictyostelium* amebae. *The Journal of Cell Biology* 98: 382–390.
- Rupp JC, Jundt N, Hardy RW. 2011. Requirement for the amino-terminal domain of sindbis virus nsP4 during virus infection. *Journal of Virology* 85: 3449–3460.
- Russo AT, White MA, Watowich SJ. 2006. The Crystal Structure of the Venezuelan Equine Encephalitis Alphavirus nsP2 Protease. *Structure* 14: 1449–1458.
- Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes H-H. 2004. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science (New York, N.Y.)* 303: 1007–1010.
- Růžek D, Vancová M, Tesařová M, Ahantarig A, Kopecký J, Grubhoffer L. 2009. Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection. *The Journal of General Virology* 90: 1649–1658.
- Ryan C, Ivanova L, Schlesinger MJ. 1998. Effects of site-directed mutations of transmembrane cysteines in sindbis virus E1 and E2 glycoproteins on palmitoylation and virus replication. *Virology* 249: 62–67.
- Ryan SJ, Carlson CJ, Mordecai EA, Johnson LR. 2019. Global expansion and redistribution of Aedes-borne virus transmission risk with climate change. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13: e0007213.
- Sahadeo NSD, Allicock OM, De Salazar PM, Auguste AJ, Widen S, Olowokure B, Gutierrez C, Valadere AM, Polson-Edwards K, Weaver SC, Carrington CVF. 2017. Understanding the evolution and spread of chikungunya virus in the Americas using complete genome sequences. *Virus Evolution* 3: vex010.
- Salbreux G, Charras G, Paluch E. 2012. Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis. *Trends in Cell Biology* 22: 536–545.
- Sali TM, Pryke KM, Abraham J, Liu A, Archer I, Broeckel R, Staverosky JA, Smith JL, Al-Shammari A, Amsler L, Sheridan K, Nilsen A, Streblow DN, DeFilippis VR. 2015. Characterization of a Novel Human-Specific STING Agonist that Elicits Antiviral Activity Against Emerging Alphaviruses. *PLoS Pathogens* 11: e1005324.
- Sanderson CM, Way M, Smith GL. 1998. Virus-Induced Cell Motility. *Journal of Virology* 72: 1235–1243.
- Sanjuán R, Domingo-Calap P. 2016. Mechanisms of viral mutation. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 73: 4433–4448.
- Santoni M-J, Pontarotti P, Birnbaum D, Borg J-P. 2002. The LAP family: a phylogenetic point of view. *Trends in genetics: TIG* 18: 494–497.

- Sarkar JK, Chatterjee SN, Chakravarty SK, Mitra AC. 1965. The causative agent of Calcutta haemorrhagic fever: chikungunya or dengue. *Bulletin of the Calcutta School of Tropical Medicine* 13: 53–54.
- Schaks M, Döring H, Kage F, Steffen A, Klünemann T, Blankenfeldt W, Stradal T, Rottner K. 2021. RhoG and Cdc42 can contribute to Rac-dependent lamellipodia formation through WAVE regulatory complex-binding. *Small GTPases* 12: 122–132.
- Schelhaas M, Ewers H, Rajamäki M-L, Day PM, Schiller JT, Helenius A. 2008. Human Papillomavirus Type 16 Entry: Retrograde Cell Surface Transport along Actin-Rich Protrusions. *PLoS Pathogens* 4: e1000148.
- Schelhaas M, Shah B, Holzer M, Blattmann P, Kühling L, Day PM, Schiller JT, Helenius A. 2012. Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS pathogens* 8: e1002657.
- Schilte C, Couderc T, Chretien F, Sourisseau M, Gangneux N. 2010. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. *J Exp Med* 207: 429–42.
- Schirenbeck A, Bretschneider T, Arasada R, Schleicher M, Faix J. 2005. The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nature Cell Biology* 7: 619–625.
- Scholte FEM, Tas A, Albulescu IC, Žusinaite E, Merits A. 2015. Stress Granule Components G3BP1 and G3BP2 Play a Proviral Role Early in Chikungunya Virus Replication. *Journal of Virology* 89: 4457–69.
- Schudt G, Kolesnikova L, Dolnik O, Sodeik B, Becker S. 2013. Live-cell imaging of Marburg virus-infected cells uncovers actin-dependent transport of nucleocapsids over long distances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 14402–14407.
- Schuffenecker I, Iteaman I, Michault A, Murri S, Frangeul L. 2006. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. *PLoS Med* 3.
- Schwartz M, Chen J, Janda M, Sullivan M, den Boon J, Ahlquist P. 2002. A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Molecular Cell* 9: 505–514.
- Schwartz O, Albert ML. 2010. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature Reviews Microbiology* 8: 491–500.
- Seetharaman S, Etienne-Manneville S. 2020. Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. *Trends in Cell Biology* 30: 720–735.
- Sells MA, Knaus UG, Bagrodia S, Ambrose DM, Bokoch GM, Chernoff J. 1997. Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Current Biology* 7: 202–210.



- Sengupta R, Mihelc EM, Angel S, Lanman JK, Kuhn RJ, Stahelin RV. 2022. Contribution of the Golgi apparatus in morphogenesis of a virus-induced cytopathic vacuolar system. *Life Science Alliance* 5: e202000887.
- Sharma A, Bhomia M, Yeh T-J, Singh J, Maheshwari RK. 2018a. Miltefosine inhibits Chikungunya virus replication in human primary dermal fibroblasts. *F1000Research* 7: 9.
- Sharma R, Kesari P, Kumar P, Tomar S. 2018b. Structure-function insights into chikungunya virus capsid protein: Small molecules targeting capsid hydrophobic pocket. *Virology* 515: 223–234.
- Sharma-Walia N, Naranatt PP, Krishnan HH, Zeng L, Chandran B. 2004. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 envelope glycoprotein gB induces the integrin-dependent focal adhesion kinase-Src-phosphatidylinositol 3-kinase-rho GTPase signal pathways and cytoskeletal rearrangements. *Journal of Virology* 78: 4207–4223.
- Sharp TV, Wang H-W, Koumi A, Hollyman D, Endo Y, Ye H, Du M-Q, Boshoff C. 2002. K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is latently expressed and binds to HAX-1, a protein with antiapoptotic function. *Journal of Virology* 76: 802–816.
- Shaw C, Panther L, August A, Zaks T, Smolenov I, Bart S, Watson M. 2019. Safety and immunogenicity of a mRNA-based chikungunya vaccine in a phase 1 dose-ranging trial. *International Journal of Infectious Diseases* 79: 17.
- Shimizu JF, Martins DOS, McPhillie MJ, Roberts GC, Zothner C, Merits A, Harris M, Jardim ACG. 2020. Is the ADP ribose site of the Chikungunya virus NSP3 Macro domain a target for antiviral approaches? *Acta Tropica* 207: 105490.
- Shirako Y, Strauss JH. 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: 1874–1885.
- Simons K, Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569–572.
- Simons K, van Meer G. 1988. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27: 6197–6202.
- Singh I, Helenius A. 1992. Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. *Journal of Virology* 66: 7049–7058.
- Skoging U, Vihinen M, Nilsson L, Liljeström P. 1996. Aromatic interactions define the binding of the alphavirus spike to its nucleocapsid. *Structure (London, England: 1993)* 4: 519–529.
- Slonchak A, Khromykh AA. 2018. Subgenomic flaviviral RNAs: What do we know after the first decade of research. *Antiviral Research* 159: 13–25.
- Small JV, Isenberg G, Celis JE. 1978. Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. *Nature* 272: 638–639.

- Smith JL, Lidke DS, Ozbun MA. 2008. Virus activated filopodia promote human papillomavirus type 31 uptake from the extracellular matrix. *Virology* 381: 16–21.
- Snijder EJ, van Tol H, Roos N, Pedersen KW. 2001. Non-structural proteins 2 and 3 interact to modify host cell membranes during the formation of the arterivirus replication complex. *The Journal of General Virology* 82: 985–994.
- Snyder AJ, Mukhopadhyay S. 2012. The Alphavirus E3 Glycoprotein Functions in a Clade-Specific Manner. *Journal of Virology* 86: 13609–13620.
- Snyder JE, Azizgolshani O, Wu B, He Y, Lee AC, Jose J, Suter DM, Knobler CM, Gelbart WM, Kuhn RJ. 2011. Rescue of Infectious Particles from Preassembled Alphavirus Nucleocapsid Cores  $\nabla$ . *Journal of Virology* 85: 5773–5781.
- Snyder JE, Kulcsar KA, Schultz KLW, Riley CP, Neary JT, Marr S, Jose J, Griffin DE, Kuhn RJ. 2013. Functional Characterization of the Alphavirus TF Protein. *Journal of Virology* 87: 8511–8523.
- Sokoloski KJ, Haist KC, Morrison TE, Mukhopadhyay S, Hardy RW. 2015. Noncapped Alphavirus Genomic RNAs and Their Role during Infection. *Journal of Virology* 89: 6080–6092.
- Sokoloski KJ, Nease LM, May NA, Gebhart NN, Jones CE, Morrison TE, Hardy RW. 2017. Identification of Interactions between Sindbis Virus Capsid Protein and Cytoplasmic vRNA as Novel Virulence Determinants. *PLoS Pathogens* 13: e1006473.
- Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C. 2009. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. *Virology* 393: 183–197.
- Soonsawad P, Xing L, Milla E, Espinoza JM, Kawano M, Marko M, Hsieh C, Furukawa H, Kawasaki M, Weerachatanukul W, Srivastava R, Barnett SW, Srivastava IK, Cheng RH. 2010. Structural Evidence of Glycoprotein Assembly in Cellular Membrane Compartments prior to Alphavirus Budding. *Journal of Virology* 84: 11145–11151.
- Sorre B, Callan-Jones A, Manneville J-B, Nassoy P, Joanny J-F, Prost J, Goud B, Bassereau P. 2009. Curvature-driven lipid sorting needs proximity to a demixing point and is aided by proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 5622–5626.
- Soumahoro M-K, Boelle P-Y, Gaüzere B-A, Atsou K, Pelat C, Lambert B, Ruche GL, Gastellu-Etchegorry M, Renault P, Sarazin M, Yazdanpanah Y, Flahault A, Malvy D, Hanslik T. 2011. The Chikungunya Epidemic on La Réunion Island in 2005–2006: A Cost-of-Illness Study. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 5: e1197.
- Sourisseau M, Schilte C, Casartelli N, Trouillet C, Guivel-Benhassine F. 2007. Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog* 3.
- Sowinski S, Jolly C, Berninghausen O, Purbhoo MA, Chauveau A, Köhler K, Oddos S, Eissmann P, Brodsky FM, Hopkins C, Onfelt B, Sattentau Q, Davis DM. 2008. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nature Cell Biology* 10: 211–219.

- Spuul P, Balistreri G, Kääriäinen L, Ahola T. 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: 7543–7557.
- Spuul P, Salonen A, Merits A, Jokitalo E, Kääriäinen L, Ahola T. 2007. Role of the Amphipathic Peptide of Semliki Forest Virus Replicase Protein nsP1 in Membrane Association and Virus Replication. *Journal of Virology* 81: 872–883.
- Squire J. 2019. Special Issue: The Actin-Myosin Interaction in Muscle: Background and Overview. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 5715.
- Srivastava P, Kumar A, Hasan A, Mehta D, Kumar R, Sharma C, Sunil S. 2020. Disease Resolution in Chikungunya—What Decides the Outcome? *Frontiers in Immunology* 11: 695.
- Stapleford KA, Moratorio G, Henningsson R, Chen R, Matheus S, Enfissi A, Weissglas-Volkov D, Isakov O, Blanc H, Mounce BC, Dupont-Rouzeyrol M, Shomron N, Weaver S, Fontes M, Rousset D, Vignuzzi M. 2016. Whole-Genome Sequencing Analysis from the Chikungunya Virus Caribbean Outbreak Reveals Novel Evolutionary Genomic Elements. *PLoS neglected tropical diseases* 10: e0004402.
- Steffen A, Faix J, Resch GP, Linkner J, Wehland J, Small JV, Rottner K, Stradal TEB. 2006. Filopodia Formation in the Absence of Functional WAVE- and Arp2/3-Complexes. *Molecular Biology of the Cell* 17: 2581–2591.
- Steffen A, Rottner K, Ehinger J, Innocenti M, Scita G, Wehland J, Stradal TEB. 2004. Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *The EMBO Journal* 23: 749–759.
- Stewart H, Palmulli R, Johansen KH, McGovern N, Shehata OM, Carnell GW, Jackson HK, Lee JS, Brown JC, Burgoyne T, Heeney JL, Okkenhaug K, Firth AE, Peden AA, Edgar JR. 2022. Tetherin antagonism by SARS-CoV-2 enhances virus release: multiple mechanisms including ORF3a-mediated defective retrograde traffic. *bioRxiv* 2021.01.06.425396.
- Stoeck IK, Lee J-Y, Tabata K, Romero-Brey I, Paul D, Schult P, Lohmann V, Kaderali L, Bartenschlager R. 2018. Hepatitis C Virus Replication Depends on Endosomal Cholesterol Homeostasis. *Journal of Virology* 92: e01196-17.
- Stoermer Burrack KA, Hawman DW, Jupille HJ, Oko L, Minor M, Shives KD, Gunn BM, Long KM, Morrison TE. 2014. Attenuating mutations in nsP1 reveal tissue-specific mechanisms for control of Ross River virus infection. *Journal of Virology* 88: 3719–3732.
- Stolp B, Reichman-Fried M, Abraham L, Pan X, Giese SI, Hannemann S, Goulimari P, Raz E, Grosse R, Fackler OT. 2009. HIV-1 Nef interferes with host cell motility by deregulation of Cofilin. *Cell Host & Microbe* 6: 174–186.
- Strochlic TI, Viaud J, Rennefahrt UEE, Anastassiadis T, Peterson JR. 2010. Phosphoinositides are essential co-activators for p21-activated kinase 1 (Pak1). *Molecular cell* 40: 493–500.

- Suetsugu S, Kurisu S, Oikawa T, Yamazaki D, Oda A, Takenawa T. 2006. Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *The Journal of Cell Biology* 173: 571–585.
- Sumi T, Matsumoto K, Takai Y, Nakamura T. 1999. Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *The Journal of Cell Biology* 147: 1519–1532.
- Sun T, Yang L, Kaur H, Pestel J, Looso M, Nolte H, Krasel C, Heil D, Krishnan RK, Santoni M-J, Borg J-P, Bünemann M, Offermanns S, Swiercz JM, Worzfeld T. 2016. A reverse signaling pathway downstream of Sema4A controls cell migration via Scrib. *Journal of Cell Biology* 216: 199–215.
- Sung BH, Zhu X, Kaverina I, Weaver AM. 2011. Cortactin controls cell motility and lamellipodial dynamics by regulating ECM secretion. *Current biology: CB* 21: 1460–1469.
- Svitkina T. 2018. *The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 10: a018267.
- Svitkina TM, Borisy GG. 1999. Arp2/3 Complex and Actin Depolymerizing Factor/Cofilin in Dendritic Organization and Treadmilling of Actin Filament Array in Lamellipodia. *Journal of Cell Biology* 145: 1009–1026.
- Tabachnick WJ. 1991. Evolutionary Genetics and Arthropod-borne Disease: The Yellow Fever Mosquito. *American Entomologist* 37: 14–26.
- Takahashi K, Suzuki K. 2010. WAVE2 targeting to phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate mediated by insulin receptor substrate p53 through a complex with WAVE2. *Cellular Signalling* 22: 1708–1716.
- Tan YB, Chmielewski D, Law MCY, Zhang K, He Y, Chen M, Jin J, Luo D. 2022. Molecular architecture of the Chikungunya virus replication complex. *Science Advances* 8: eadd2536.
- Tanabe ISB, Tanabe ELL, Santos EC, Martins WV, Araújo IMTC, Cavalcante MCA, Lima ARV, Câmara NOS, Anderson L, Yunusov D, Bassi ÊJ. 2018. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8: 345.
- Tanaka A, Tumkosit U, Nakamura S, Motooka D, Kishishita N. 2017. Genome-Wide Screening Uncovers the Significance of N-Sulfation of Heparan Sulfate as a Host Cell Factor for Chikungunya Virus Infection. *J Virol* 91.
- Tang W-F, Yang S-Y, Wu B-W, Jheng J-R, Chen Y-L, Shih C-H, Lin K-H, Lai H-C, Tang P, Horng J-T. 2007. Reticulon 3 binds the 2C protein of enterovirus 71 and is required for viral replication. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 5888–5898.

- Tardugno R, Giancotti G, De Burghgraeve T, Delang L, Neyts J, Leyssen P, Brancale A, Bassetto M. 2018. Design, synthesis and evaluation against Chikungunya virus of novel small-molecule antiviral agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 26: 869–874.
- Taylor GM, Hanson PI, Kielian M. 2007. Ubiquitin Depletion and Dominant-Negative VPS4 Inhibit Rhabdovirus Budding without Affecting Alphavirus Budding. *Journal of Virology* 81: 13631–13639.
- Taylor RM, Hurlbut HS, Work TH, Kingston JR, Frothingham TE. 1955. Sindbis virus: a newly recognized arthropodtransmitted virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 4: 844–862.
- Teo CSH, Chu JJH. 2014. Cellular vimentin regulates construction of dengue virus replication complexes through interaction with NS4A protein. *Journal of Virology* 88: 1897–1913.
- Teo T-H, Her Z, Tan JLL, Lum F-M, Lee WWL, Chan Y-H, Ong R-Y, Kam Y-W, Leparc-Goffart I, Gallian P, Rénia L, de Lamballerie X, Ng LFP. 2015. Caribbean and La Réunion Chikungunya Virus Isolates Differ in Their Capacity To Induce Proinflammatory Th1 and NK Cell Responses and Acute Joint Pathology. *Journal of Virology* 89: 7955–7969.
- Thaa B, Biasiotto R, Eng K, Neuvonen M, Gotte B. 2015. Differential Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt-mTOR Activation by Semliki Forest and Chikungunya Viruses Is Dependent on nsP3 and Connected to Replication Complex Internalization. *J Virol* 89: 11420–37.
- Theriot JA, Mitchison TJ. 1991. Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature* 352: 126–131.
- Thiberville S-D, Boisson V, Gaudart J, Simon F, Flahault A, de Lamballerie X. 2013. Chikungunya Fever: A Clinical and Virological Investigation of Outpatients on Reunion Island, South-West Indian Ocean. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7: e2004.
- Thomas S, Rai J, John L, Schaefer S, Pützer BM, Herchenröder O. 2013. Chikungunya virus capsid protein contains nuclear import and export signals. *Virology Journal* 10: 269.
- Tilney LG. 1975. The role of actin in nonmuscle cell motility. *Society of General Physiologists Series* 30: 339–388.
- Tomar S, Hardy RW, Smith JL, Kuhn RJ. 2006. Catalytic Core of Alphavirus Nonstructural Protein nsP4 Possesses Terminal Adenylyltransferase Activity. *Journal of Virology* 80: 9962.
- Trebinska A, Rembiszewska A, Ciosek K, Ptaszynski K, Rowinski S, Kupryjanczyk J, Siedlecki JA, Grzybowska EA. 2010. HAX-1 overexpression, splicing and cellular localization in tumors. *BMC cancer* 10: 76.
- Trebinska-Stryjewska A, Szafron L, Rembiszewska A, Wakula M, Tabor S, Sienkiewicz R, Owczarek J, Balcerak A, Felisiak-Golabek A, Grzybowska EA. 2019. Cytoplasmic HAX1 Is an Independent Risk Factor for Breast Cancer Metastasis. *Journal of Oncology* 2019: 6375025.

- Tsai F-C, Henderson JM, Jarin Z, Kremneva E, Senju Y, Pernier J, Mikhajlov O, Manzi J, Kogan K, Le Clainche C, Voth GA, Lappalainen P, Bassereau P. 2022. Activated I-BAR IRSp53 clustering controls the formation of VASP-actin-based membrane protrusions. *Science Advances* 8: eabp8677.
- Tsetsarkin KA, Chen R, Leal G, Forrester N, Higgs S, Huang J, Weaver SC. 2011a. Chikungunya virus emergence is constrained in Asia by lineage-specific adaptive landscapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 7872–7877.
- Tsetsarkin KA, Chen R, Sherman MB, Weaver SC. 2011b. Chikungunya Virus: Evolution and Genetic Determinants of Emergence. *Current opinion in virology* 1: 310–317.
- Tsetsarkin KA, Chen R, Weaver SC. 2016. Interspecies transmission and chikungunya virus emergence. *Current opinion in virology* 16: 143–150.
- Tsetsarkin KA, Chen R, Yun R, Rossi SL, Plante KS, Guerbois M, Forrester N, Perng GC, Sreekumar E, Leal G, Huang J, Mukhopadhyay S, Weaver SC. 2014. Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Nature Communications* 5: 4084.
- Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. 2007. A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. *PLOS Pathogens* 3: e201.
- Tsetsarkin KA, Weaver SC. 2011. Sequential Adaptive Mutations Enhance Efficient Vector Switching by Chikungunya Virus and Its Epidemic Emergence. *PLOS Pathogens* 7: e1002412.
- Uchime O, Fields W, Kielian M. 2013. The Role of E3 in pH Protection during Alphavirus Assembly and Exit. *Journal of Virology* 87: 10255–10262.
- Utt A, Das PK, Varjak M, Lulla V, Lulla A, Merits A. 2015. Mutations conferring a noncytotoxic phenotype on chikungunya virus replicons compromise enzymatic properties of nonstructural protein 2. *J Virol* 89: 3145–62.
- Utt A, Rausalu K, Jakobson M, Männik A, Alphey L, Fragkoudis R, Merits A. 2019. Design and Use of Chikungunya Virus Replication Templates Utilizing Mammalian and Mosquito RNA Polymerase I-Mediated Transcription. *Journal of Virology* 93: 10.1128/jvi.00794-19.
- Vadlamudi RK, Barnes CJ, Rayala S, Li F, Balasenthil S, Marcus S, Goodson HV, Sahin AA, Kumar R. 2005. p21-Activated Kinase 1 Regulates Microtubule Dynamics by Phosphorylating Tubulin Cofactor B. *Molecular and Cellular Biology* 25: 3726–3736.
- Valderrama F, Cordeiro JV, Schleich S, Frischknecht F, Way M. 2006. Vaccinia virus-induced cell motility requires F11L-mediated inhibition of RhoA signaling. *Science (New York, N.Y.)* 311: 377–381.

- Valerius NH, Stendahl O, Hartwig JH, Stossel TP. 1981. Distribution of actin-binding protein and myosin in polymorphonuclear leukocytes during locomotion and phagocytosis. *Cell* 24: 195–202.
- Van den Broeke C, Radu M, Deruelle M, Nauwynck H, Hofmann C, Jaffer ZM, Chernoff J, Favoreel HW. 2009a. Alphaherpesvirus US3-mediated reorganization of the actin cytoskeleton is mediated by group A p21-activated kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 8707–8712.
- Van den Broeke C, Radu M, Deruelle M, Nauwynck H, Hofmann C, Jaffer ZM, Chernoff J, Favoreel HW. 2009b. Alphaherpesvirus US3-mediated reorganization of the actin cytoskeleton is mediated by group A p21-activated kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 8707–8712.
- Van Prooyen N, Gold H, Andresen V, Schwartz O, Jones K, Ruscetti F, Lockett S, Gudla P, Venzon D, Franchini G. 2010. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 20738–20743.
- Varjak M, Saul S, Arike L, Lulla A, Peil L, Merits A. 2013. Magnetic fractionation and proteomic dissection of cellular organelles occupied by the late replication complexes of Semliki Forest virus. *J Virol* 87: 10295–312.
- Vasilakis N, Tesh RB, Popov VL, Widen SG, Wood TG, Forrester NL, Gonzalez JP, Saluzzo JF, Alkhovsky S, Lam SK, Mackenzie JS, Walker PJ. 2019. Exploiting the Legacy of the Arbovirus Hunters. *Viruses* 11: 471.
- Vasiljeva L, Merits A, Auvinen P, Kääriäinen L. 2000. Identification of a novel function of the alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 17281–17287.
- Vasiljeva L, Merits A, Golubtsov A, Sizemskaja V, Kääriäinen L, Ahola T. 2003. Regulation of the sequential processing of Semliki Forest virus replicase polyprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 41636–41645.
- Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M, Thiria J, Dehecq J-S, Fontenille D, Schuffenecker I, Despres P, Failloux A-B. 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: e1168.
- Vérollet C, Le Cabec V, Maridonneau-Parini I. 2015. HIV-1 Infection of T Lymphocytes and Macrophages Affects Their Migration via Nef. *Frontiers in Immunology* 6: 514.
- Verrier B, Le Grand R, Ataman-Onal Y, Terrat C, Guillon C, Durand P-Y, Hurtrel B, Aubertin A-M, Sutter G, Erfle V, Girard M. 2002. Evaluation in rhesus macaques of Tat and rev-targeted immunization as a preventive vaccine against mucosal challenge with SHIV-BX08. *DNA and cell biology* 21: 653–658.

- Vierboom MPM, Jonker M, Tak PP, 't Hart BA. 2007. Preclinical models of arthritic disease in non-human primates. *Drug Discovery Today* 12: 327–335.
- Vihinen H, Ahola T, Tuittila M, Merits A, Kääriäinen L. 2001. Elimination of phosphorylation sites of Semliki Forest virus replicase protein nsP3. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 5745–5752.
- Vihinen H, Saarinen J. 2000. Phosphorylation site analysis of Semliki forest virus nonstructural protein 3. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 27775–27783.
- Volk SM, Chen R, Tsetsarkin KA, Adams AP, Garcia TI, Sall AA, Nasar F, Schuh AJ, Holmes EC, Higgs S, Maharaj PD, Brault AC, Weaver SC. 2010. Genome-Scale Phylogenetic Analyses of Chikungunya Virus Reveal Independent Emergences of Recent Epidemics and Various Evolutionary Rates. *Journal of Virology* 84: 6497–6504.
- Voss JE, Vaney MC, Duquerroy S, Vonrhein C, Girard-Blanc C. 2010. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 468: 709–12.
- Wan JJ, Ooi YS, Kielian M. 2019. Mechanism of Tetherin Inhibition of Alphavirus Release. *Journal of Virology* 93: e02165-18.
- Wang HL, O'Rear J, Stollar V. 1996. Mutagenesis of the Sindbis virus nsP1 protein: effects on methyltransferase activity and viral infectivity. *Virology* 217: 527–531.
- Wang KS, Kuhn RJ, Strauss EG, Ou S, Strauss JH. 1992. High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. *Journal of Virology* 66: 4992–5001.
- Wang X, Chen W, Yuan Y. 2020a. KSHV enhances mesenchymal stem cell homing and promotes KS-like pathogenesis. *Virology* 549: 5–12.
- Wang Y, Lu H, Fang C, Xu J. 2020b. Palmitoylation as a Signal for Delivery. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1248: 399–424.
- Wang Y, Yago T, Zhang N, Abdisalaam S, Alexandrakis G, Rodgers W, McEver RP. 2014. Cytoskeletal regulation of CD44 membrane organization and interactions with E-selectin. *The Journal of Biological Chemistry* 289: 35159–35171.
- Wauquier N, Becquart P, Nkoghe D, Padilla C, Ndjoi-Mbiguino A, Leroy EM. 2011. The Acute Phase of Chikungunya Virus Infection in Humans Is Associated With Strong Innate Immunity and T CD8 Cell Activation. *The Journal of Infectious Diseases* 204: 115–123.
- Weaver SC, Brault AC, Kang W, Holland JJ. 1999. Genetic and Fitness Changes Accompanying Adaptation of an Arbovirus to Vertebrate and Invertebrate Cells. *Journal of Virology* 73: 4316–4326.
- Weaver SC, Chen R, Diallo M. 2020. Chikungunya Virus: Role of Vectors in Emergence from Enzootic Cycles. *Annual Review of Entomology* 65: 313–332.



- Weaver SC, Kang W, Shirako Y, Rumenapf T, Strauss EG, Strauss JH. 1997. Recombinational history and molecular evolution of western equine encephalomyelitis complex alphaviruses. *Journal of Virology* 71: 613–623.
- Weaver SC, Winegar R, Manger ID, Forrester NL. 2012. Alphaviruses: population genetics and determinants of emergence. *Antiviral Research* 94: 242–257.
- Webb LG, Fernandez-Sesma A. 2022. RNA viruses and the cGAS-STING pathway: reframing our understanding of innate immune sensing. *Current Opinion in Virology* 53: 101206.
- Webb LG, Veloz J, Pintado-Silva J, Zhu T, Rangel MV. 2020. Chikungunya virus antagonizes cGAS-STING mediated type-I interferon responses by degrading cGAS. *PLoS Pathog* 16.
- Weber K, Groeschel-Stewart U. 1974. Antibody to Myosin: The Specific Visualization of Myosin-Containing Filaments in Nonmuscle Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71: 4561–4564.
- Weed SA, Karginov AV, Schafer DA, Weaver AM, Kinley AW, Cooper JA, Parsons JT. 2000. Cortactin Localization to Sites of Actin Assembly in Lamellipodia Requires Interactions with F-Actin and the Arp2/3 Complex. *The Journal of Cell Biology* 151: 29–40.
- Weger-Lucarelli J, Aliota MT, Wlodarchak N, Kamlangdee A, Swanson R, Osorio JE. 2016. Dissecting the Role of E2 Protein Domains in Alphavirus Pathogenicity. *Journal of Virology* 90: 2418–2433.
- Wei Chiam C, Fun Chan Y, Chai Ong K, Thong Wong K, Sam I-C. 2015. Neurovirulence comparison of chikungunya virus isolates of the Asian and East/Central/South African genotypes from Malaysia. *The Journal of General Virology* 96: 3243–3254.
- Welch MD, Way M. 2013. Arp2/3-mediated actin-based motility: a tail of pathogen abuse. *Cell host & microbe* 14: 242–255.
- Welch WJ, Sefton BM. 1980. Characterization of a small, nonstructural viral polypeptide present late during infection of BHK cells by Semliki Forest virus. *Journal of Virology* 33: 230–237.
- Welf ES, Miles CE, Huh J, Sapoznik E, Chi J, Driscoll MK, Isogai T, Noh J, Weems AD, Pohlkamp T, Dean K, Fiolka R, Mogilner A, Danuser G. 2020. Actin-Membrane Release Initiates Cell Protrusions. *Developmental Cell* 55: 723-736.e8.
- Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK. 2009. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* 5: 365–75.
- Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. 2005. The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* 118: 843–846.
- Werme K, Wigerius M, Johansson M. 2008. Tick-borne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signalling. *Cellular Microbiology* 10: 696–712.

- Wichit S, Hamel R, Bernard E, Talignani L, Diop F, Ferraris P, Liegeois F, Ekchariyawat P, Luplertlop N, Surasombatpattana P, Thomas F, Merits A, Choumet V, Roques P, Yssel H, Briant L, Missé D. 2017. Imipramine Inhibits Chikungunya Virus Replication in Human Skin Fibroblasts through Interference with Intracellular Cholesterol Trafficking. *Scientific Reports* 7: 3145.
- Wichit S, Hamel R, Yainoy S, Gumpangseth N, Panich S, Phuadraksa T, Saetear P, Monteil A, Morales Vargas R, Missé D. 2019. Interferon-inducible protein (IFI) 16 regulates Chikungunya and Zika virus infection in human skin fibroblasts. *EXCLI Journal* 18: 467–476.
- Wikan N, Sakoonwatanyoo P, Ubol S, Yoksan S, Smith DR. 2012. Chikungunya virus infection of cell lines: analysis of the East, Central and South African lineage. *PloS One* 7: e31102.
- Wileman T, Netherton CL, Powell PP. 2016. Virus Factories and Mini-Organelles Generated for Virus Replication. *Encyclopedia of Cell Biology* 819–827.
- Wimalasiri-Yapa BMCR, Stassen L, Huang X, Hafner LM, Hu W, Devine GJ, Yakob L, Jansen CC, Faddy HM, Viennet E, Frentiu FD. 2019. Chikungunya virus in Asia – Pacific: a systematic review. *Emerging Microbes & Infections* 8: 70–79.
- Wit CB, Hiesinger PR. 2023. Neuronal filopodia: From stochastic dynamics to robustness of brain morphogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 133: 10–19.
- Wolf YI, Kazlauskas D, Iranzo J, Lucía-Sanz A, Kuhn JH, Krupovic M, Dolja VV, Koonin EV. 2018. Origins and Evolution of the Global RNA Virome. *mBio* 9: e02329-18.
- Wolff G, Bárcena M. 2021. Multiscale Electron Microscopy for the Study of Viral Replication Organelles. *Viruses* 13: 197.
- Wolff G, Limpens RWAL, Zevenhoven-Dobbe JC, Laugks U, Zheng S, de Jong AWM, Koning RI, Agard DA, Grünewald K, Koster AJ, Snijder EJ, Bárcena M. 2020a. A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle. *Science* 369: 1395–1398.
- Wolff G, Melia CE, Snijder EJ, Bárcena M. 2020b. Double-Membrane Vesicles as Platforms for Viral Replication. *Trends in Microbiology* 28: 1022–1033.
- Wu C, Asokan SB, Berginski ME, Haynes EM, Sharpless NE, Griffith JD, Gomez SM, Bear JE. 2012. Arp2/3 complex is critical for lamellipodia and organization of cell-matrix adhesion but dispensable for fibroblast chemotaxis. *Cell* 148: 973–987.
- Xu X, Zhang X, Xing H, Liu Z, Jia J, Jin C, Zhang Y. 2019. Importin-4 functions as a driving force in human primary gastric cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 120: 12638–12646.
- Xue F, Janzen DM, Knecht DA. 2010. Contribution of Filopodia to Cell Migration: A Mechanical Link between Protrusion and Contraction. *International Journal of Cell Biology* 2010: 507821.

- Yactayo S, Staples JE, Millot V, Cibrelus L, Ramon-Pardo P. 2016. Epidemiology of Chikungunya in the Americas. *The Journal of Infectious Diseases* 214: S441–S445.
- Yamashita YM, Inaba M, Buszczak M. 2018. Specialized Intercellular Communications via Cytonemes and Nanotubes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 34: 59–84.
- Yang C, Czech L, Gerboth S, Kojima S, Scita G, Svitkina T. 2007. Novel Roles of Formin mDia2 in Lamellipodia and Filopodia Formation in Motile Cells. *PLoS Biology* 5: e317.
- Yang C, Svitkina T. 2011. Filopodia initiation. *Cell Adhesion & Migration* 5: 402–408.
- Yao H, Zhang S, Xie H, Fan Y, Miao M, Zhu R, Yuan L, Gu M, You Y, You B. 2023a. RCN2 promotes Nasopharyngeal carcinoma progression by curbing Calcium flow and Mitochondrial apoptosis. *Cellular Oncology (Dordrecht)* 46: 1031–1048.
- Yao Z, Ramachandran S, Huang S, Jami-Alahmadi Y, Wohlschlegel JA, Li MMH. 2023b. Chikungunya virus glycoproteins transform macrophages into productive viral dissemination vessels. 2023.05.29.542714.
- Yap SV, Vafiadaki E, Strong J, Kontrogianni-Konstantopoulos A. 2010. HAX-1: a multifaceted antiapoptotic protein localizing in the mitochondria and the sarcoplasmic reticulum of striated muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48: 1266–1279.
- Yaseen HM, Simon F, Deparis X, Marimoutou C. 2012. Estimation of Lasting Impact of a Chikungunya Outbreak in Reunion Island. *Epidemiology: Open Access* 2: 1–6.
- Yin P, Davenport BJ, Wan JJ, Kim AS, Diamond MS, Ware BC, Tong K, Couderc T, Lecuit M, Lai JR, Morrison TE, Kielian M. 2023a. Chikungunya virus cell-to-cell transmission is mediated by intercellular extensions in vitro and in vivo. *Nature Microbiology* 8: 1653–1667.
- Yin P, Davenport BJ, Wan JJ, Kim AS, Diamond MS, Ware BC, Tong K, Couderc T, Lecuit M, Lai JR, Morrison TE, Kielian M. 2023b. Chikungunya virus cell-to-cell transmission is mediated by intercellular extensions in vitro and in vivo. *Nature Microbiology* 8: 1653–1667.
- Yin P, Jian X, Liu Y, Liu Y, Lv L, Cui H, Zhang L. 2023c. Elucidating cellular interactome of chikungunya virus identifies host dependency factors. *Virologica Sinica* 38: 497–507.
- Young AR, Locke MC, Cook LE, Hiller BE, Zhang R, Hedberg ML, Monte KJ, Veis DJ, Diamond MS, Lenschow DJ. 2019. Dermal and muscle fibroblasts and skeletal myofibers survive chikungunya virus infection and harbor persistent RNA. *PLOS Pathogens* 15: e1007993.
- Zaid A, Burt FJ, Liu X, Poo YS, Zandi K, Suhrbier A, Weaver SC, Texeira MM, Mahalingam S. 2021. Arthritogenic alphaviruses: epidemiological and clinical perspective on emerging arboviruses. *The Lancet Infectious Diseases* 21: e123–e133.

- Zamudio-Meza H, Castillo-Alvarez A, González-Bonilla C, Meza I. 2009. Cross-talk between Rac1 and Cdc42 GTPases regulates formation of filopodia required for dengue virus type-2 entry into HMEC-1 cells. *Journal of General Virology* 90: 2902–2911.
- Zayat V, Balcerak A, Korczynski J, Trebinska A, Wysocki J, Sarnowska E, Chmielarczyk M, Macech E, Konopiński R, Dziembowska M, Grzybowska EA. 2015. HAX-1: A Novel P-Body Protein. *DNA and Cell Biology* 34: 43–54.
- Zeitler J, Hsu CP, Dionne H, Bilder D. 2004. Domains controlling cell polarity and proliferation in the *Drosophila* tumor suppressor Scribble. *The Journal of Cell Biology* 167: 1137–1146.
- Zeller H, Van Bortel W, Sudre B. 2016. Chikungunya: Its History in Africa and Asia and Its Spread to New Regions in 2013–2014. *The Journal of Infectious Diseases* 214: S436–S440.
- Zhang K, Law MCY, Nguyen TM, Tan YB, Wirawan M, Law Y-S, Jeong LS, Luo D. 2022. Molecular basis of specific viral RNA recognition and 5'-end capping by the Chikungunya virus nsP1. *Cell Reports* 40.
- Zhang K, Law Y-S, Law MCY, Tan YB, Wirawan M, Luo D. 2021. Structural insights into viral RNA capping and plasma membrane targeting by Chikungunya virus nonstructural protein 1. *Cell Host & Microbe* 29: 757-764.e3.
- Zhang, Kim AS, Fox JM, Nair S, Basore K. 2018. Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature* 557: 570–74.
- Zhang N, Zhao H, Zhang L. 2019. Fatty Acid Synthase Promotes the Palmitoylation of Chikungunya Virus nsP1. *Journal of Virology* 93: e01747-18.
- Zhang S, Grosse F. 2004. Multiple functions of nuclear DNA helicase II (RNA helicase A) in nucleic acid metabolism. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 36: 177–183.
- Zhao J, Bruck S, Cemerski S, Zhang L, Butler B, Dani A, Cooper JA, Shaw AS. 2013. CD2AP Links Cortactin and Capping Protein at the Cell Periphery To Facilitate Formation of Lamellipodia. *Molecular and Cellular Biology* 33: 38–47.
- Zhong P, Agosto LM, Munro JB, Mothes W. 2013. Cell-to-cell transmission of viruses. *Current opinion in virology* 3: 44–50.
- Zuo Y, Oh W, Frost JA. 2014. Controlling the switches: Rho GTPase regulation during animal cell mitosis. *Cellular signalling* 26: 2998–3006.
- Zurzolo C. 2021. Tunneling nanotubes: Reshaping connectivity. *Current Opinion in Cell Biology* 71: 139–147.
- Žusinaite E, Tints K, Kiiver K, Spuul P, Karo-Astover L, Merits A, Sarand I. 2007. Mutations at the palmitoylation site of non-structural protein nsP1 of Semliki Forest virus attenuate virus replication and cause accumulation of compensatory mutations. *The Journal of General Virology* 88: 1977–1985.



# Annexe



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Ricardo Soto-Rifo,  
University of Chile, Chile

REVIEWED BY  
Angie Hilliker,  
University of Richmond, United States  
Encarna Martínez-Salas  
Centre for Molecular Biology Severo  
Ochoa, Spanish National Research  
Council (CSIC), Spain  
Fernando Valiente-Echeverría,  
University of Chile, Chile

\*CORRESPONDENCE  
Laurence Briant  
laurence.briant@irim.cnrs.fr

SPECIALTY SECTION  
This article was submitted to  
Virus and Host,  
a section of the journal  
Frontiers in Cellular and  
Infection Microbiology

RECEIVED 31 May 2022  
ACCEPTED 18 July 2022  
PUBLISHED 11 August 2022

CITATION  
Neyret A, Bernard E,  
Aïqui-Reboul-Paviet O, Bakhache W,  
Eldin P, Chaloin L and Briant L (2022)  
Identification of a non-canonical  
G3BP-binding sequence in a Mayaro  
virus nsP3 hypervariable domain.  
*Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12:958176.  
doi: 10.3389/fcimb.2022.958176

COPYRIGHT  
© 2022 Neyret, Bernard, Aïqui-Reboul-  
Paviet, Bakhache, Eldin, Chaloin and  
Briant. This is an open-access article  
distributed under the terms of the  
Creative Commons Attribution License  
(CC BY). The use, distribution or  
reproduction in other forums is  
permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s)  
are credited and that the original  
publication in this journal is cited, in  
accordance with accepted academic  
practice. No use, distribution or  
reproduction is permitted which does  
not comply with these terms.

# Identification of a non-canonical G3BP-binding sequence in a Mayaro virus nsP3 hypervariable domain

Aymeric Neyret, Eric Bernard, Olivier Aïqui-Reboul-Paviet, William Bakhache, Patrick Eldin, Laurent Chaloin and Laurence Briant\*

Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM), Université de Montpellier - CNRS, Montpellier, France

Ras-GTPase-activating SH3 domain-binding-proteins 1 (G3BP1) and 2 (G3BP2) are multifunctional RNA-binding proteins involved in stress granule nucleation, previously identified as essential cofactors of Old World alphaviruses. They are recruited to viral replication complexes formed by the Chikungunya virus (CHIKV), Semliki Forest virus (SFV), and Sindbis virus (SINV) via an interaction with a duplicated FGxF motif conserved in the hypervariable domain (HVD) of virus-encoded nsP3. According to mutagenesis studies, this FGxF duplication is strictly required for G3BP binding and optimal viral growth. Contrasting with this scenario, nsP3 encoded by Mayaro virus (MAYV), an arthritogenic virus grouped with Old World alphaviruses, contains a single canonical FGxF sequence. In light of this unusual feature, we questioned MAYV nsP3/G3BP relationships. We report that G3BP1 and G3BP2 are both required for MAYV growth in human cells and bind nsP3 protein. In infected cells, they are recruited to nsP3-containing cytosolic foci and active replication complexes. Unexpectedly, deletion of the single FGxF sequence in MAYV nsP3 did not abolish these phenotypes. Using mutagenesis and *in silico* modeling, we identify an upstream FGAP amino acid sequence as an additional MAYV nsP3/G3BP interaction motif required for optimal viral infectivity. These results, therefore, highlight a non-conventional G3BP binding sequence in MAYV nsP3.

## KEYWORDS

Mayaro virus, alphavirus, G3BP, nsP3, host-pathogen interactions

## Introduction

Ras-GTPase-activating SH3 domain-binding proteins (G3BPs) are evolutionarily conserved multifunctional RNA-binding proteins, detected in humans, yeast, plants, and insects (in which they are referred to as Rasputin (Rin)) (Parker et al., 1996; Pazman et al., 2000; Krapp, 2017). In mammalian cells, these proteins are present in the form of two paralogs G3BP1 and G3BP2 which is separated into two spliced variants G3BP2a and G3BP2b (Kennedy et al., 2002). G3BPs are essential regulators of cellular RNA metabolism involved in transcript stabilization/decay (Martin et al., 2016; Fischer et al., 2020). They are also considered as critical nucleators of stress granules (SGs) where translation-stalled mRNAs complexed with RNA-binding proteins are accumulating in response to various cellular stresses (e.g., hypoxia, oxidative stress, and viral infections (Tourriere et al., 2003; Kedersha et al., 2016; Protter and Parker, 2016). In viral infections, assembly of these non-membranous cytosolic aggregates is part of the cellular responses mounted to block viral genome translation and subsequent progeny production. These compartments that sequester viral proteins and RNAs might also serve as platforms for the recruitment and activation of innate immune sensors (e.g., PKR, RIG-I, MDA5, cGAS) and antiviral proteins (e.g. TRIM5, ADAR1), therefore contributing to the initiation of an innate immune response (Onomoto et al., 2012; Law et al., 2019; Liu et al., 2019; Yang et al., 2019). To overcome such SG-associated antiviral responses and ensure productive infection, viruses have evolved a variety of mechanisms [reviewed in (Zhang et al., 2019)]. These strategies especially rely on the direct interaction and manipulation of G3BPs. This scenario has especially been reported for Old World (OW) alphaviruses, a group of mosquito-borne viruses in the *Togaviridae* family responsible for an acute musculoskeletal disease often evolving into chronic disease in humans. These pathogens, which include Sindbis (SINV), Semliki Forest (SFV), and Chikungunya (CHIKV) viruses, are positive-sense single-stranded RNA viruses. Their genome, characterized by a 5'-cap and a poly(A) tail, behaves as an mRNA. Upon delivery in the host cytoplasm, the alphavirus genome is translated into non-structural polyproteins targeted to the plasma membrane and sequentially processed into four non-structural proteins nsP1–4 that assemble themselves to produce the viral replication complex. Depending on the nsPs maturation state, this complex synthesizes a double-stranded RNA (dsRNA) replication intermediate and then uses this template to transcribe new positive-stranded viral genomes and a subgenomic RNA translated into structural proteins. NsP1, nsP2, nsP3, and nsP4 display methyl/guanylyltransferase, helicase/protease/NTPase, ADP ribosyl hydrolase, and RNA-dependent RNA polymerase activities, respectively (Kriš et al., 2021). In addition, nsP3 supports the formation of a functional alphavirus replication machinery by recruiting a set of host-encoded factors depending on the host cell (Cristea et al., 2006; Gorchakov et al., 2008; Gotte et al., 2018;

Meshram et al., 2018). This function was mapped in the intrinsically disordered C-terminal domain of nsP3 referred to as HVD for the “hypervariable domain,” which, despite being highly variable in size and showing very low identity even between closely related OW alphaviruses, mediates conserved interaction with host-encoded cofactors (Strauss et al., 1988; Gotte et al., 2018; Meshram et al., 2018). These include the four-and-a-half-LIM-only proteins FHL1, FHL2, and FHL3 (Meertens et al., 2019; Lukash et al., 2020), the SH3 domain-containing proteins CD2AP and SH3KBP1 (Mutso et al., 2018; Agback et al., 2019), the histone chaperones NAP1L1/4 (Meshram et al., 2018; Dominguez et al. 2021), the nucleolar transcriptional regulator MYBBP1A (Meshram et al., 2018), and the BIN-1/amphiphysin 2 F-BAR-containing protein (Neuvonen et al., 2011; Meshram et al., 2018). nsP3-HVD also contains a conserved duplicated FGxF motif that mediates binding to a hydrophobic pocket in the G3BP NTF2-like domain (Cristea et al., 2006; Panas et al., 2014; Panas et al., 2015; Schulte et al., 2016; Götte et al., 2019). As a consequence, CHIKV, SFV, and SINV nsP3 expressed in mammalian cells either as an ectopic protein or by an infectious virus recruit G3BPs to cytoplasmic aggregates, thereby preventing the G3BP-mediated nucleation of SGs (Fros et al., 2012; Panas et al., 2012). In infected cells, the FGxF tandem repeat also accounts for the redistribution of a fraction of G3BPs to cell membrane-anchored viral replication complexes where it is supposed to assist the assembly of an active viral replicase with negative-strand RNA synthesis activity (Gorchakov et al., 2008; Fros et al., 2012; Scholte et al., 2015; Remenyi et al., 2018; Götte et al., 2020), to protect the nascent genomic RNA (Kim et al., 2016), and to promote efficient translation of neosynthesized viral mRNAs by recruiting the translation initiation machinery (Götte et al., 2019). Mutational explorations revealed that duplication of the FGxF motif in nsP3-HVD is strictly required for G3BP binding, SG inhibition, and optimal OW alphavirus replication. Indeed, the deletion of even one of the two motifs, or phenylalanine-to-alanine substitution in these sequences, results in an attenuated SFV viral growth and non-viable CHIKV (Kim et al., 2016; Schulte et al., 2016; Meshram et al., 2018; Götte et al., 2019). The evolutionary conservation of this sequence repeat across Old World alphaviruses further supports its functional importance (Nowee et al., 2021). Despite how this sequence duplication impacts viral replication still remains elusive, structural studies recently revealed its requirement for assembly of higher-order oligomers of G3BP dimers interconnected by nsP3, probably required for efficient G3BP sequestration (Schulte et al., 2016).

Mayaro virus (MAYV) is an arthritogenic alphavirus endemic and enzootic in Pan-Amazonian countries, which is progressively extending to central/south America (Acosta-Ampudia et al., 2018) and is punctually imported in countries with a temperate climate (Hassing et al., 2010; Receveur et al., 2010). Phylogeny has grouped MAYV in the SFV serocomplex of alphaviruses (Lavergne et al., 2006). Its proximity with SFV and CHIKV was recently reasserted based on nsP3 amino acid



sequence analysis (Nowee et al., 2021). However, contrasting with these viruses, the MAYV nsP3-HVD sequence only contains a single FGxF canonical motif, emphasizing the need to investigate MAYV requirement for G3BPs and the potential mechanisms contributing to G3BP/nsP3 interactions in this model. Here, we report that, while lacking FGxF duplication, MAYV depends on G3BPs for replication in mammalian cells. In infected cells, endogenous G3BP1 is recruited to nsP3-containing cytosolic foci and also frequently colocalizes with dsRNA replication intermediate as reported for other Old World alphaviruses (Gorchakov et al., 2008; Kim et al., 2016; Remenyi et al., 2018). We demonstrate that MAYV nsP3 indeed binds G3BPs. Unexpectedly, the mutation or deletion of the single FGxF canonical G3BP-binding sequence present in nsP3-HVD did not inhibit nsP3/G3BP interaction or colocalization, nor abolished MAYV infectivity when inserted in an infectious clone. Instead, the simultaneous deletion of an upstream FGAP sequence was required to abolish these. Altogether, these results show that MAYV nsP3 recruits G3BPs using an FGAP/FGDF tandem motif to promote viral replication in mammalian cells. Surprisingly, deletion of this sequence results in nsP3 nuclear accumulation. This study, therefore, sheds light on MAYV/host interactions required for replication in mammalian cells and brings novel information on the mechanisms evolved by OW alphaviruses to subvert SG components for their own genome replication.

## Results

### Identification of a vertebrate cell model for MAYV molecular studies

As MAYV is an understudied virus, we first sought to identify cell models useful for functional and molecular studies on this pathogen by testing its ability to replicate in a panel of immortalized vertebrate cell lines. For this, we took advantage of the previously reported MAYV-luc reporter virus developed from the TRVL4675 genotype D virus, bearing a *Renilla* luciferase reporter gene inserted within the C-terminal hypervariable domain of nsP3 (Chuong et al., 2019). Cells selected based on their relevance to MAYV-associated symptoms and according to their previous use in alphavirus research were challenged with the MAYV-luc reporter virus at an MOI of 0.1. Vero kidney epithelial cells derived from African green monkey, frequently used for alphavirus amplification, are shown as control. Expression of the virus-encoded luciferase gene was used as a simplified evaluation of virus spread in the cell culture. After 24 or 48 h of infection, most cell lines tested supported MAYV-luc replication (Figure 1). SH-SY5Y neuroblastoma cells and HEK293T and HeLa epithelial cells produced the highest luciferase levels. Cell lines relevant for alphavirus disease, namely, U2OS osteosarcoma cells, HUH7

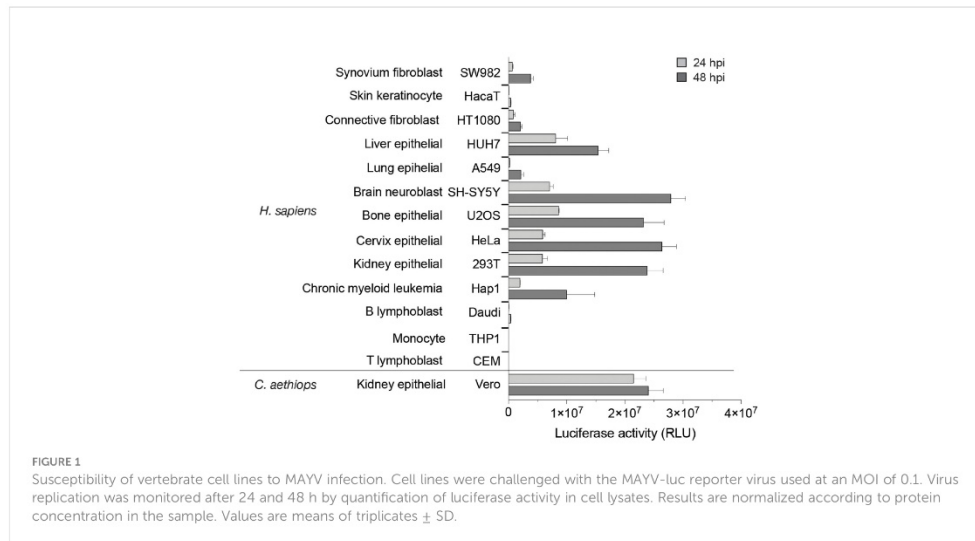
hepatocytes, SW982 synoviocytes, and HT1080 fibroblasts, as well as the A549 pulmonary epithelial cells also supported detectable replication. Interestingly, the near-haploid HAP-1 iPSC-derived cell line was permissive for MAYV replication, therefore opening avenues for its utilization in genetic screens devoted to the study of MAYV/host interactions (Carette et al., 2011). Finally, HaCaT keratinocytes were poorly replicating MAYV thereby confirming the low susceptibility of this cell line to alphavirus replication (Bernard et al., 2014). As previously reported for CHIKV (Solignat et al., 2009), MAYV also poorly replicated in cells from the hematopoietic lineage, including T and B lymphoblasts and monocytes. According to these results, HeLa and HEK293T cells were selected as suitable cell models for functional studies of MAYV.

### G3BP1 and G3BP2 are critical for MAYV replication in vertebrate cells

We primarily investigated the G3BP requirement for MAYV replication using siRNA-mediated silencing followed by infection. HeLa cells were transfected with siRNA specific for G3BP1 (siG3BP1) or G3BP2 (siG3BP2) or a mixture of both siRNA (siG3BP1/2). After 48 h, immunoblot analysis assessed that G3BP1 and G3BP2 expression was decreased by >80% by individual siRNA and the siG3BP1/2 cell displayed 92% G3BP1 and 56% G3BP2 protein level reduction (Figures 2A, B). siRNA-transfected cells were then infected with MAYV-luc at an MOI of 0.1. As a control, the same cells were infected with a CHIKV-nanoLuc virus using similar infection conditions. After 48 h, quantification of luciferase activity in the cell lysates revealed that MAYV replication was reduced by more than 50% in both siG3BP1 and siG3BP2 cells when compared with control cells. It was almost abolished (>97% reduction) in siG3BP1/2 cells (Figure 2C). CHIKV-nanoLuc replication was less dramatically reduced by individual siRNA but was decreased by >75% when G3BP1 and G3BP2 protein levels were simultaneously reduced as reported by others (Scholte et al., 2015; Kim et al., 2016) (Figure 2D). According to these results, MAYV replication in human cells requires both G3BP1 and G3BP2 expression and is dramatically reduced in cells depleted for both proteins, therefore paralleling CHIKV behavior and that of previously studied OW alphaviruses (Scholte et al., 2015; Kim et al., 2016).

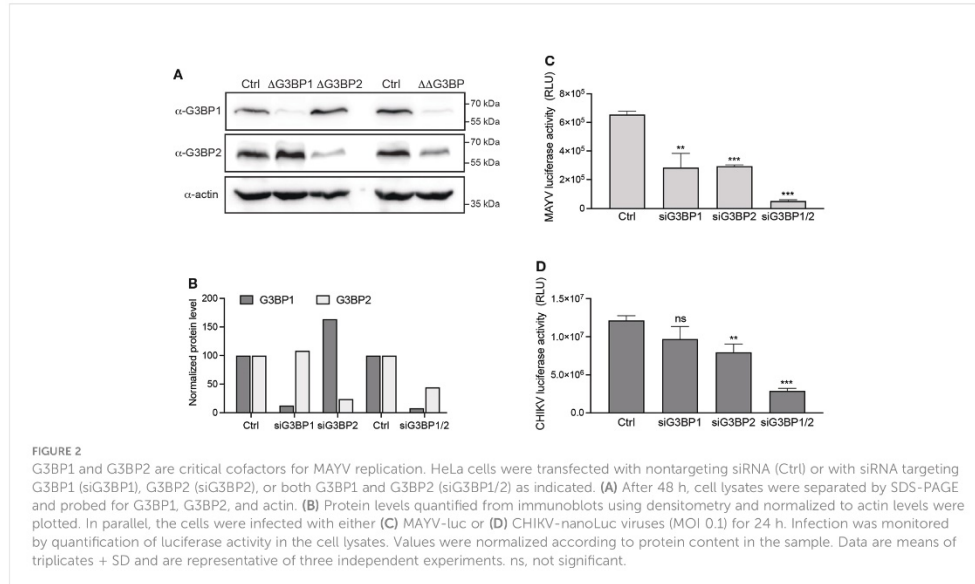
### G3BP1 colocalizes with nsP3 and dsRNA in the cytoplasm of MAYV-infected cells

In alphavirus-infected cells, G3BPs are redistributed from a diffuse cytosolic pattern to discrete foci colocalizing with nsP3-containing cytosolic granules and with dsRNA-containing active replication complexes (Gorchakov et al., 2008; Kim et al., 2016; Remenyi et al., 2018). We therefore investigated G3BP



subcellular localization in HeLa cells infected for 24 h with MAYV-luc. In the absence of commercially available anti-MAYV nsP3 antibodies, we used antibodies against luciferase to detect the virus-encoded nsP3-luciferase fusion protein. Confocal microscopy revealed that MAYV nsP3 expressed in

infectious conditions forms large cytosolic foci, frequently located near the nuclear envelope (Figure 3B). In these cells, G3BP1 was re-localized from a diffuse staining observed in uninfected cells (Figure 3A) to cytosolic foci where it almost completely overlapped with nsP3 as attested by cross-sectional



analysis of fluorescent signals (Mander's overlap coefficient = 0.89). Unexpectedly, G3BP1 granular localization was sometimes detected in nsP3-negative cells. In this case, G3BP1 foci were larger and more irregularly shaped than those formed in nsP3-positive cells. This observation could reflect either a very early step of infection in which nsP3 is below our detection level or instead some paracrine response triggered by infection in uninfected bystander cells as recently reported (Iadevaia et al., 2022). Immunostaining of MAYV-infected cells with anti-dsRNA antibodies detected the viral replication complexes as punctate foci across the cytoplasm often colocalized with G3BP1 (Mander's overlap coefficient  $0.474 \pm 0.16$ ) (Figure 3C). By contrast, a significant fraction of G3BP1 did not overlap the dsRNA signal as previously reported by others (Mander's overlap coefficient  $0.222 \pm 0.14$ ) (Kim et al., 2016). This pattern was very similar to that observed for CHIKV-infected cells processed in the same conditions (Figure 3D). These observations therefore show that upon MAYV infection, G3BPs aggregate to nsP3-containing foci and to dsRNA-containing active replication complexes.

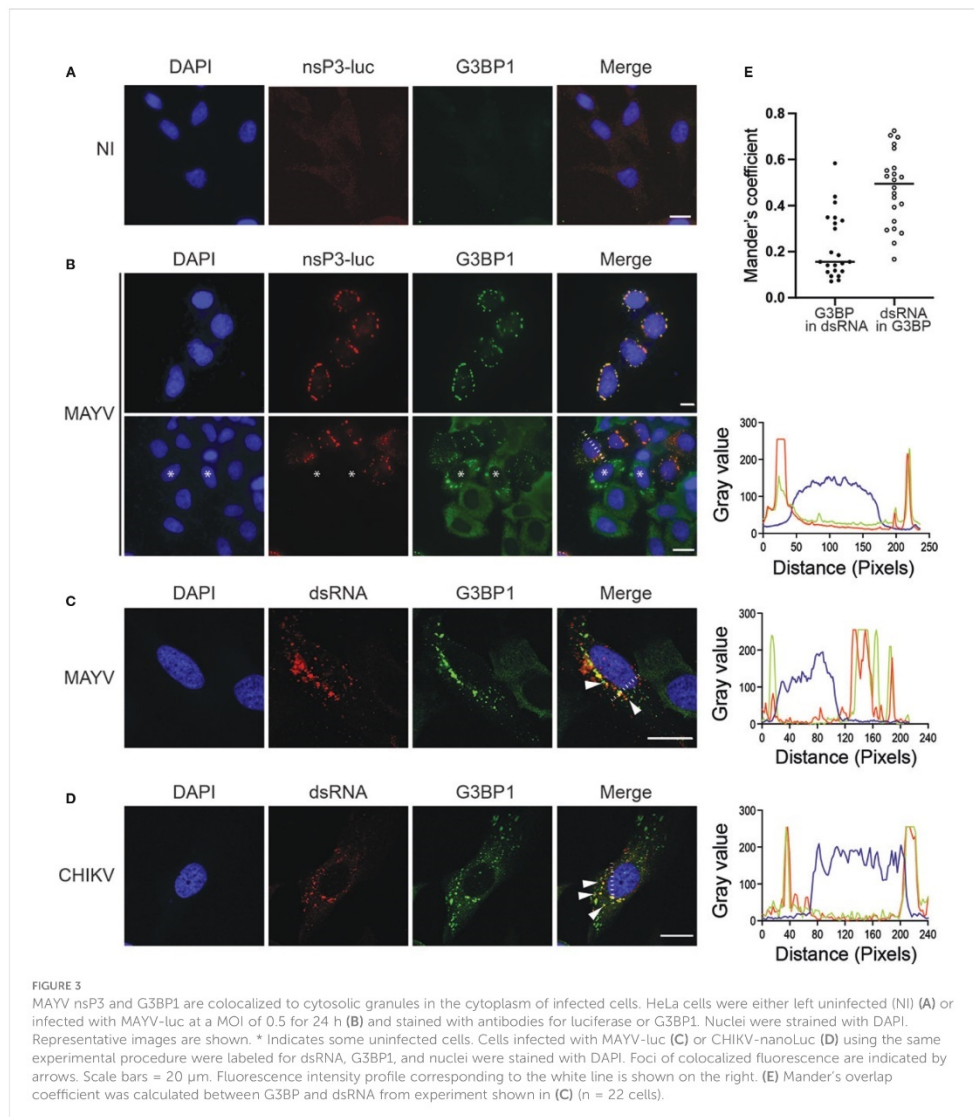
### MAYV nsP3 recruits G3BPs in the absence of a duplicated FGxF-binding motif

G3BP1 manipulation by SINV, CHIKV, and SFV alphavirus is mediated by the direct interaction of the G3BP NTF2-like domain with two conserved FGxF consensus motifs located in nsP3 HVD moiety (Panas et al., 2015; Schulte et al., 2016; Götte et al., 2019). In light of the reported critical requirement for this motif duplication, we interrogated its conservation in the MAYV nsP3 protein. The amino acid sequence of nsP3-HVD was aligned with that of other known OW alphaviruses replicating in mammalian cells (Figure 4). CHIKV and MAYV HVD sequences shared 24.7% amino acid identity (50.6% sequence similarity) compared with 64% identity and 88% similarity for nsP3 N-terminal moiety (not shown). We noticed that the FGxF repeat motifs, which constitute the G3BP-binding site of nsP3, are well conserved in the OW alphaviruses with limited variation at the fourth amino acid. Contrasting with all these viruses that contained two tandemly organized FGxF-like sequences, MAYV HVD contains a single FGDF motif. In light of this unusual feature, we questioned MAYV nsP3 direct contribution in G3BP relocalization. HeLa cells were transfected to express a GFP-fused nsP3 protein, stained with anti-G3BP1 antibodies, and processed for confocal microscopy. As observed in MAYV-infected cells (Figure 3), ectopically expressed GFP-nsP3 was detected as punctate and rod-like foci often located near the nucleus (Figures 5A, B). Moreover, endogenous G3BP1 was relocalized from a diffuse fluorescence observed in the control condition to cytosolic granular compartments almost completely colocalized with nsP3 (Mander's overlap coefficient  $0.923 \pm$

0.05). This phenotype was reminiscent of that detected in cells transfected to express CHIKV GFP-nsP3. To determine the ability of MAYV nsP3 to bind G3BPs, total cell extracts were prepared from the transfected cells and subjected to GFP pull-down. Immunoblotting of the precipitated complexes with G3BP1 or G3BP2 antisera revealed that both endogenous proteins co-precipitate with MAYV GFP-nsP3 as also observed for CHIKV GFP-nsP3 (Figure 5C). Altogether, these results support the fact that G3BP1 and G3BP2 both bind MAYV nsP3 and are recruited to cytosolic nsP3 aggregates in the absence of any other viral component.

### Identification of G3BP-binding elements in MAYV nsP3.

Alanine substitution of either phenylalanine in the OW alphavirus FGxF motif disrupts G3BP binding and nsP3/G3BP colocalization (Panas et al., 2015; Schulte et al., 2016). To decipher the role of the MAYV nsP3 single FGDF sequence in G3BP binding, we mutated this sequence into AGDA and tested the subcellular distribution of the mutant protein with respect to endogenous G3BP1 localization (Figure 6A). Unexpectedly, this mutant displayed a wild-type phenotype, forming cytoplasmic foci colocalized with endogenous G3BP1 (Figure 6B). This phenotype was also conserved for an nsP3 protein in which the FGDF sequence was deleted ( $\Delta$ FGDF), suggesting that MAYV nsP3 binding to G3BPs either occurs independently of this FGDF sequence or requires the combined action of an additional binding motif. Previous mutagenesis studies of CHIKV nsP3 that confirmed the pivotal role of FGxF sequences also revealed the critical contribution of the 16-aa-long sequence upstream of these canonical G3BP-binding repeats (Meshram et al., 2018). Reanalyzing this sequence in MAYV sequence, we noticed the presence of phenylalanine and glycine forming part of a conserved FGAP sequence. Phenylalanine with glycine in the second position is critical for interaction with the NTF2-like sequence in G3BP (Schulte et al., 2016). To determine whether it may contribute to G3BP binding, the FGAP motif was deleted in the MAYV nsP3 sequence. In transfected cells, the corresponding  $\Delta$ FGAP mutant formed cytosolic foci. Despite overlapping nsP3 staining in some instance, G3BP1 fluorescence was also detected as a diffuse signal in the cytoplasm, contrasting with profiles observed with the wild-type protein or other nsP3 mutants (Figure 6B). In light of this observation, we generated a  $\Delta$ 2 GFP-nsP3 protein lacking both the FGAP and FGDF sequences. This protein was detected as discrete cytosolic aggregates. In cells expressing the  $\Delta$ 2 GFP protein, endogenous G3BP1 was mostly detected as diffuse staining. Some G3BP1 cytosolic foci that did not overlap with nsP3 fluorescence were also observed in the cytoplasm, suggesting that the combined deletion of FGDF and FGAP sequences abolishes G3BP1 recruitment to nsP3 foci. To



validate this hypothesis, GFP-nsP3 or mutant versions of this fusion protein were subjected to GFP pull-down and immunoblotted with anti-G3BPs antibodies. In these conditions, the  $\Delta$ FGDF mutant coprecipitated with G3BP1 and G3BP2, attesting that the deletion of this single canonical G3BP binding sequence did not abolish interaction (Figure 6C). Similarly,  $\Delta$ FGAP nsP3 interacted with G3BP1 and G3BP2.

Contrasting with these results, the  $\Delta$ 2A mutant bearing a simultaneous deletion of the FGDF and FGAP sequences bound neither G3BP1 nor G3BP2. Altogether, these observations support the fact that MAYV nsP3 interacts with G3BP depending on the integrity of FGAP and FGDF sequences in its HVD. This result, therefore, identifies the FGAP sequence in MAYV HVD as a noncanonical G3BP-binding sequence

```

SINV 484...DVPMSFGSFS DGEIDELSRRTVESEPV.....LFGSFEPEGVNSIISSRSVSPFLRKQRRRRSRRTTEY
RRV 520...DVDIQFGDFETPK.....IQFGDIDFDQF
BFV 424...HPGPTFGDFGEHEVELTASP.....LTFGDFAEGEIQGMGVEFE
WHAV 447...NPPITFGFSEDGEIDNLQKKTSEP.....FMGSPFEPGE
MIDV 422...PERISFGDLDAECMAIINDD.....LTFGDFGAGEFERLTSAXLDRAGA
BeBV 467...VPGLTFGDLPEPSSTPAVELPWEPEESSG.....LSFGDFGTFWLGRAGA
GETV 490...DLDIQFGDLEPRRRNRDRDVTG.....IQFGDIDFNQSLGRAGA
CHIKV 474...TFPITFGDFNEGEIESLSSEL.....LTFGDFLPGEVDDLTDSDWSTCSDTDEELRLDRAGG
ONNV 505...LEPITFGDFAEGEIDNLGTA.....LTFGDFPEGEVELTDSWSTCSDTDEELRLDRAGG
SFV 446...KLPLTFGDFDEHEVDALASG.....ITFGDFDDVLRGRAGA
UNAV 503...DDIITFGDFTEEEVASLDSEGVMPWDAQPEIRHMLTTFGDFSDEWETVSSSSS
MAYV 453...TVDVVEFGAPTEEDS.....EITFGDFSASEWETISNSSSINV
    
```

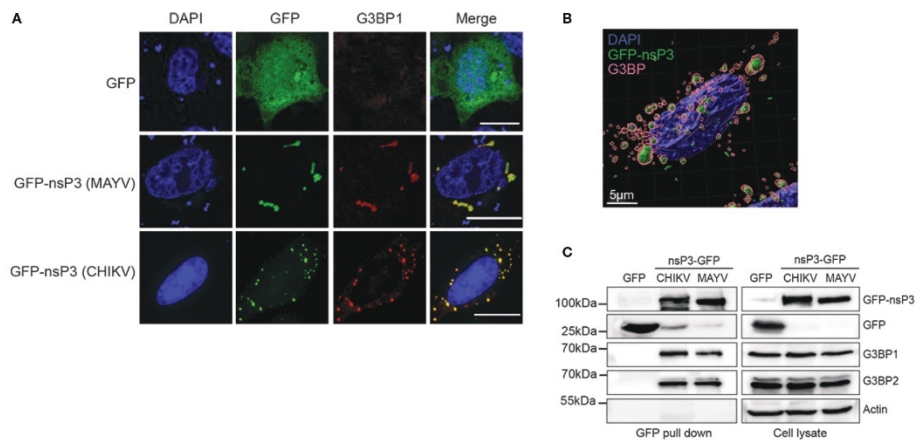
**FIGURE 4**  
Conservation of G3BP canonical binding motifs in Old World alphavirus nsP3. The C-terminal sequence of nsP3 HVD encoded by alphavirus was aligned. The conserved canonical G3BP-binding sequences are boxed in red. SINV, Sindbis virus; RRV, Ross River virus; BFV, Barmah forest virus; WHAV, Whataora virus; MIDV, Middleburg virus; BeBV, Bebaru virus; GETV, Getah virus; CHIKV, Chikungunya virus; ONNV, O'nyong'nyong virus; SFV, Semliki Forest virus; UNAV, Una virus; MAYV, Mayaro virus.

acting in coordination with the single conventional FGDF sequence in this protein.

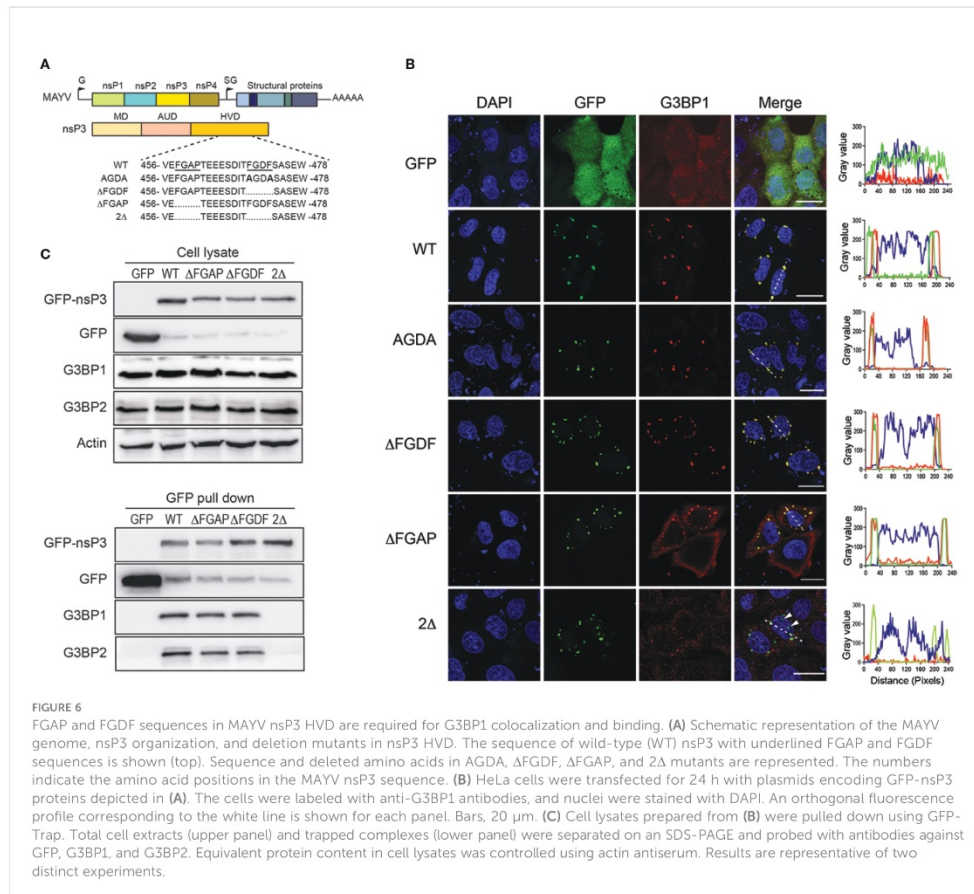
### *In silico* modeling of the MAYV nsP3: G3BP interaction

The recent elucidation of the crystal structure of G3BP complexed with a 25-amino acid peptide derived from SFV

nsP3-HVD has revealed the critical role of FGDF duplication in the assembly of G3BP aggregates (Schulte et al., 2016). According to this structure, each motif in this tandem repeat contacts the same hydrophobic pocket in the NTF2-like domain of two different G3BP molecules, thereby favoring the formation of a (G3BP)<sub>2</sub>:nsP3 oligomer proposed as critical for the assembly of functional replication complexes at the plasma membrane. Based on our results highlighting the critical role of FGAP and FGDF motifs in G3BP interaction, we modeled this

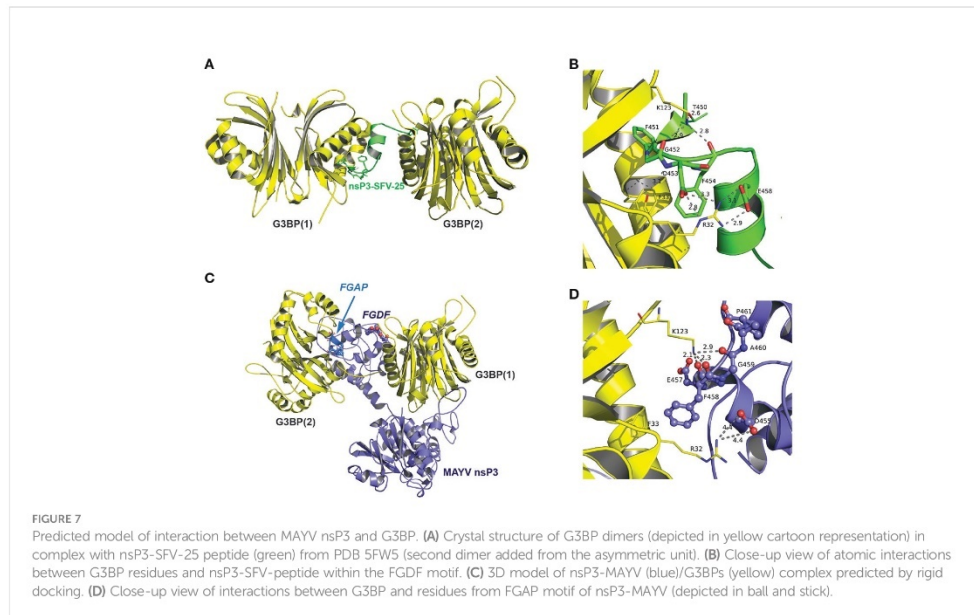


**FIGURE 5**  
MAYV GFP-nsP3 interacts with G3BP and co-segregates in cytoplasmic foci. (A) HeLa cells transfected with GFP, MAYV GFP-nsP3, or CHIKV GFP-nsP3 expression vector were processed for immunofluorescence using anti-G3BP1 antibodies. Nuclei were visualized with DAPI staining, and cells were observed in confocal microscopy. Scale bars are 20  $\mu$ m. (B) 3D image reconstruction was performed from confocal images and z-stacks acquired from cells expressing the MAYV GFP-nsP3 protein. (C) Total cell extracts prepared from (A) were pulled down using GFP-Trap. Lysates and pulled complexes were separated by SDS-PAGE and probed for GFP, G3BP1, G3BP2, and actin. Results are representative of two distinct experiments.



interaction *in silico*. The G3BP NTF2-like domain was considered a homodimer based on previous reports (Vognsen and Kristensen, 2012). As no experimental structure was available for full-length MAYV nsP3, a 3D model was built by homology with the SFV nsP3 N-terminal domain (residues 1–159) using the known NMR structure (Tsika et al., 2019), while the C-domain was predicted *ab initio*. Note that the lack of 3D information in this C-terminal moiety renders more delicate the prediction and should be taken with care. The rigid docking study was performed in two successive steps in order to form a tripartite complex between MAYV nsP3 protein and two G3BP dimers (Figure 7). First, the crystal structure of G3BP bound to the nsP3 SFV-25 peptide was used as a control and further analyzed to describe the main residues of G3BP interacting with the FGDF motif (Figures 7A, B). Two phenylalanine residues from SFV fit into a cavity formed by two short  $\alpha$ -helices of G3BP

including another Phe residue (Phe-33). Two strong interactions are also involved in this complex, one between Lys-123 and backbone oxygens of Gly-452 and Phe-454 and one salt bridge between Arg-32 and Asp-453/Glu-458 (Figure 7B). From rigid docking studies with nsP3-MAYV, the main population of predicted complexes was reproducing the interaction with the canonical FGDF motif, and an additional G3BP docking predicted the interaction with the noncanonical FGAP motif (Figure 7C). A closer view indicates that key residues of G3BP (Arg-32 and Lys-123) formed salt bridges and hydrogen bonds with the FGAP motif, with additional hydrophobic contacts mediated between Phe-458 from this motif and Phe-33 from G3BP similarly to that observed in the crystal structure (Figure 7D). Note that the quite long distance (4.4 Å) for Arg-32-Asp-455 interaction was labeled on purpose as it could be stronger if side-chain flexibility could have been introduced in



the rigid docking. Interestingly, the Glu-457 residue located near Lys-131 and just preceding the FGAP motif could also contribute to strengthening the complex. Therefore, this *in silico* simulation further corroborates the capacity of FGAP and FGDF sequences in MAYV nsP3-HVD to mediate G3BPs dimer binding.

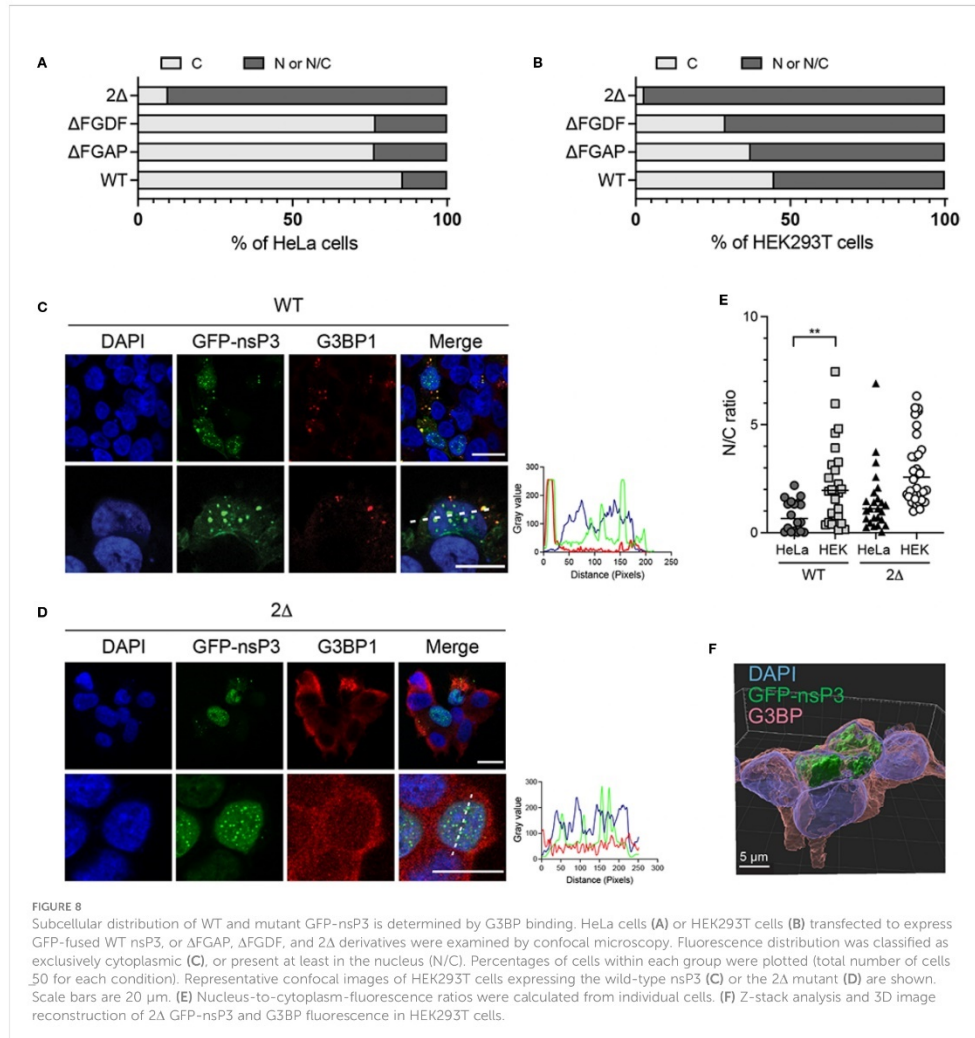
### Loss of G3BP binding relocates MAYV nsP3 to the nuclear compartment

Having a closer examination of the 2Δ nsP3 mutant outcome upon ectopic expression, we noticed that in a significant number of cells, this protein aggregated into nuclear foci (Figure 6B). We, therefore, reinvestigated the behavior of GFP-nsP3 and its mutants to provide a statistical view of their subcellular distribution. From an analysis of >50 HeLa cells, we observed that GFP-nsP3 was generally detected in the form of cytoplasmic foci (Figure 8A). Rarely, this fusion protein was detected in the nucleus of transfected cells, either in the form of a diffuse fluorescence or forming punctate aggregates. The ΔFGDF and ΔFGAP nsP3 mutants were also mostly localized to the cytoplasm in a similar ratio as the wild-type protein, indicating that the individual deletion of these sequences did not change nsP3 subcellular localization. Contrasting with this result, the 2Δ nsP3 was rarely exclusively cytoplasmic. Instead, in >90% of the cells examined, this mutant was detected at least in part in the

nucleus. To investigate whether these phenotypes depended on a particular cell type, we repeated these experiments in HEK293T cells. In this cell line, the wild-type nsP3 was more frequently detected in the nucleus than observed in HeLa cells (Figures 8B, C). Indeed, the fluorescence was exclusively cytosolic in only ~45% of the cells observed. In 20% of the cells, GFP-nsP3 was exclusively observed in the nucleus. This tendency was confirmed calculating the nuclear-to-cytoplasmic-fluorescence ratio (Figure 8E). In these conditions, the ΔFGDF and ΔFGAP mutants behaved similarly to the parental protein. Finally, the 2Δ nsP3 was very frequently (~95%) detected in the nucleus of transfected cells (Figure 8D, E), as confirmed by z-stack analysis and 3D image reconstruction (Figure 8F). Altogether, our experiments indicate that nsP3 subcellular localization may differ according to the cell model considered and is also altered by deletion of both G3BP-binding sites.

### Functional importance of the FGAP motif in MAYV infection

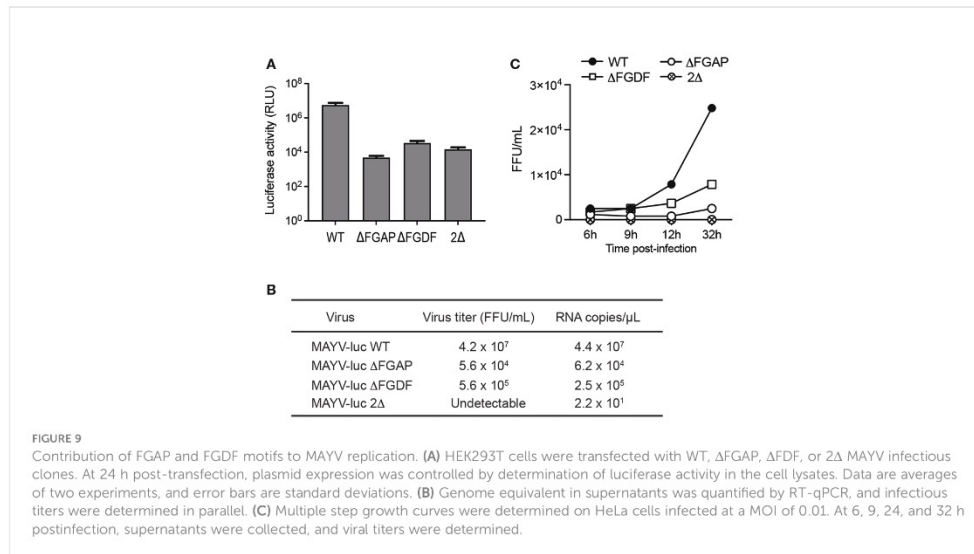
Previous investigations reported the critical role of the FGDF tandem repeat in alphavirus infectivity. Deletion of any G3BP-binding sequence resulted in an attenuated SFV replication in vertebrate cells and in nonviable CHIKV (Panás et al., 2015; Schulte et al., 2016). To determine the biological significance of the nonconventional G3BP-binding sequence identified in



MAYV nsP3-HVD, we generated MAYV-luc mutant viruses carrying a deletion of FGDF ( $\Delta$ FGDF), FGAP ( $\Delta$ FGAP), or both motifs ( $2\Delta$ ). After transfection of HEK293T cells, mutant viral genomes were efficiently transcribed and translated according to genome-directed luciferase reporter gene expression in the cell lysate, albeit reduced by over 2Log compared with the parental virus (Figure 9A). Infectious titers of the corresponding supernatants were determined against Vero cells, and the RNA genome content in the inoculum was quantified by RT-qPCR

(Figure 9B). In these conditions, the  $\Delta$ FGDF and  $\Delta$ FGAP mutants showed a two-to-three-order-of-magnitude reduction in viral titers and genome copy numbers compared to wild-type MAYV, while the  $2\Delta$  mutant was nonviable. Multiple-step growth curve experiments were performed in order to determine whether nsP3 deletions affect viral infectivity (Figure 9C). HeLa cells were infected with a normalized amount of wild-type,  $\Delta$ FGAP, or  $\Delta$ FGDF-mutant viruses diluted to an MOI of 0.01, or with undiluted culture





supernatant harvested from the 2Δ condition. Viral titer determination in culture supernatants at 6, 9, 24, and 32 h after infection revealed that ΔFGAP and ΔFGDF MAYV replicated more slowly than the parental virus. In these conditions, the ΔFGDF mutant showed a slight replicative advantage when compared with the ΔFGAP MAYV. Again, no infectious particle was recovered from the 2Δ-mutant condition. Altogether, these results indicate that the integrity of both canonical FGDF and noncanonical FGAP binding sequences is required for optimal infection. They also argue for a possible predominant requirement for the FGAP motif over the FGDF sequence for viral replication.

## Discussion

The intense research effort devoted to the study of alphavirus interaction with their host has identified G3BPs as essential cell-encoded cofactors recruited to viral replication complexes (Cristea et al., 2010; Fros et al., 2012; Panas et al., 2012; Scholte et al., 2015; Kim et al., 2016; Schulte et al., 2016; Götte et al., 2019). Molecular investigations performed on a few model viruses (CHIKV, SINV, and SFV) have established the strict requirement for a conserved duplicated FGxF motif in nsP3-HVD to divert G3BPs from their SG assembly function and to assemble a functional replicase. According to structural modeling, the essential need for this FGxF tandem repeat is supposed to reflect its contribution in the assembly of (G3BPs)<sub>2</sub>: nsP3 polycomplexes in which each FGxF motif binds a separate

G3BP dimer (Götte et al., 2019). The infectivity loss observed upon deletion of one of the two FGxF motifs (Panas et al., 2015) and sequence conservation of evolution across OW alphaviruses further support the essential functional need for FGxF motif duplication. This motif duplication, with limited variation at the fourth amino acid position (FGx[IL/F]), is indeed detected in nsP3-HVD from almost all alphaviruses replicating in humans. Contrasting with this knowledge, MAYV, despite being grouped in the SFV serocomplex, contains a single FGxF motif, raising the question of its G3BP dependency for replication and of the eventual molecular mechanisms accounting for nsP3/G3BP binding. Here, we report that MAYV has evolved an FGAP sequence in nsP3 HVD to assist its single FGDF motif for G3BPs binding. Both motifs are required to ensure optimal MAYV infectivity.

The presence of a single FGxF sequence is a peculiarity of MAYV nsP3, which is conserved in the sequence of all isolates sequenced so far, including the ancestral TRVL4675 strain, used in this study, and isolates more recently detected in various countries across South America. This conservation is also observed whether these strains were grouped with genotype D like TRVL4675 or with genotype L, which are >15% divergent at the nucleic acid level (Chandler et al., 2006). Compared with other known alphaviruses, a single FGxF motif was only detected in the sequence of mosquito-restricted alphaviruses, namely, the Mwinilunga virus (MWNV) and the Tai Forest (TALV) virus recently reported unable to recruit G3BPs in cytosolic foci (Nowee et al., 2021). MAYV is therefore the only known human-adapted OW alphavirus with such characteristics.

Despite this singularity, we observed that MAYV nsP3 binds G3BP1 and G3BP2 paralogs that are recruited to replication complexes in infected cells and are strictly required for MAYV infectivity. Based on this evidence, we undertook a mutagenesis approach to validate the role of the single MAYV FGDF in G3BP binding. Contrary to other studied OW alphaviruses, phenylalanine mutation or total deletion of this single motif in MAYV did not abolish nsP3/G3BP colocalization in cytosolic granules or co-immunoprecipitation of these proteins (Schulte et al., 2016), suggesting that G3BP interaction with MAYV HVD relies on additional noncanonical interaction sequence(s). Our search for such motif(s) was guided by the examination of sequence conservation in known cellular and viral G3BP-binding partners. The cell nucleoporin Nup62 (FxFGxG) and nsP3 encoded by CHIKV and SFV (FGDF), SINV (FGSF), GETV (FGDI/L), and RRV (FGDF/I), as well as nonstructural proteins from plant viruses in the *Nanoviridae* family (FGEF), all display strict conservation of a phenylalanine/glycine di-amino-acid sequence combined with an acidic environment (Clarkson et al., 1996). This sequence, together with the phenylalanine side chains, plays a critical role in contacting G3BPs as attested by mutagenesis studies and crystal structure analysis of NTF2-like domains with its ligands (Kristensen, 2015; Schulte et al., 2016). According to this information, we explored the functional importance of a conserved FGAP sequence located upstream of the FGDF consensus motif in MAYV nsP3-HVD. The slightly reduced G3BP-binding capacity observed upon deletion of the FGAP sequence encouraged us to combine this deletion with that of the FGDF motif, which did not by itself prevent G3BP interaction. MAYV nsP3 simultaneously lacking FGAP and FGDF sequences was unable to recruit and bind G3BPs, attesting to the combined role of these motifs. This result therefore identifies the FGAP motif as a previously unreported G3BP binding sequence that differs from the canonical FGxG tandem repeat in which the phenylalanine conservation at position 4 is critical for OW alphavirus infectivity (Panas et al., 2015). The existence of the nonconventional G3BP-binding motif was previously highlighted by the study of the Eastern equine encephalitis virus (EEEV) and of the Western equine encephalitis virus (WEEV), both grouped as encephalitic New World alphaviruses, interacting with G3BPs despite the absence of any FGxG sequence in nsP3-HVD (Kim et al., 2016; Frolov et al., 2017; Nowee et al., 2021). Such feature could also be under-evaluated in OW alphaviruses. Indeed, Meshram et al. (Meshram et al., 2018; Dominguez et al., 2021) recently reported that the 16-amino-acid domain upstream the well-defined FGDF tandem repeat in CHIKV nsP3, which contains an FGAP sequence, behaves as an additional G3BP-binding sequence (Meshram et al., 2018; Dominguez et al., 2021). Contrasting with MAYV, its contribution in G3BPs binding might, however, be accessory in this model due to the presence of the FGxG tandem sequence.

Our *in silico* simulations corroborate the potential contribution of the MAYV FGAP sequence in binding the G3BP NTF2-like domain. According to these predictions, the missing FGDF motif is similarly replaced by the FGAP motif, and the analysis of interactions formed between G3BP and nsP3 residues showed the implications of the same G3BP key residues (Lys-123 and Arg-32). However, comparing the SFV FGxG and MAYV FGAP interaction with G3BP revealed a reverse orientation. Moreover, the unique “F” present in the MAYV sequence was found to behave as the “F” residue at position 4 in the SFV FGxG motif. Interestingly, the Glu-457 residue upstream this motif was found to compensate for the absence of the Asp residue from the FGDF consensus motif, contributing in interactions with the basic residues in the N-terminus of G3BPs (Panas et al., 2015). Altogether, our predictions strongly suggest that the FG sequence in the full motif is essential for G3BP binding and represents the most important recognition signal with the assistance of the surrounding negatively charged amino acids. Based on these differences, the FGAP sequence in MAYV therefore likely represents an evolutionary distinct G3BP-binding motif taking benefit of a more flexible motif (including FG and other negatively charged residues), allowing to fulfill the biological function of the canonical FGDF motif. This motif may therefore assist the single FGDF motif for G3BP interaction and assembly of high-order G3BP/nsP3 polycomplexes that prevent SG Formation and contribute to the assembly and function of Old World alphavirus replication complexes (Scholte et al., 2015; Kim et al., 2016; Remenyi et al., 2018; Götte et al., 2020). Interestingly, deletion of the FGAP motif impacted more MAYV infectivity than observed for the FGDF deletion. This result could be reminiscent of the previously reported hierarchical binding mode of the duplicated FGxG motifs to G3BPs in which the N-terminal prevails over the C-terminal FGxG-binding sequence for viral infectivity (Schulte et al., 2016).

Finally, an unexpected observation from this study refers to unusual subcellular localization of the 2Δ nsP3 mutant that was frequently detected in the nucleus of transfected cells. OW alphavirus nsP3 are well described as cytoplasmic proteins. Here, we detected the wild-type MAYV nsP3 as dispersed cytosolic aggregates sometimes showing a perinuclear localization. By contrast, deletion of the FGAP and FGDF motifs, resulting in abolition of G3BP binding, frequently redirected nsP3 to the nucleus. Recently, Nowee et al. (2021) reported that nsP3s encoded by BEBV, GETV, BFV, SINV, WHAV, and SESV, despite cytoplasmic in wild-type cells, are relocalized to the nucleus upon G3BPs KO. Our study of the 2Δ nsP3 mutant extends this observation to MAYV and suggests that in this model, G3BP-binding capacity could be critical for nsP3 cytosolic targeting. Interestingly, G3BPs naturally function as a transport factor for RNA between the cytoplasm and the nucleus and bind the nucleoporin p62 (Fribourg et al., 2001).

The exact role of G3BPs in nsP3 appropriate localization, therefore, deserves attention.

## Material and methods

### Cells

SW982 cells were purchased from the CLS Cell Lines Service GmbH cell repository service. HaCaT cells were kindly provided by Pr. Laurent Meunier (Cellular Pharmacology, Montpellier). Hap1 cells are a gift of Thijn Brumelkamp (Oncode Institute, Netherlands). Other cell lines were obtained from ATCC (VA 20110, USA). Adherent cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fischer Scientific) supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 10% fetal calf serum (FCS, Lonza) and grown at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Lymphocytes and macrophages were cultured in RPMI in place of DMEM.

### Viruses and infections

The MAYV-luc derived from the TRVL 4675 strain and CHIKV-nanoLuc reporter viruses were previously reported (Matkovic et al., 2018; Chuong et al., 2019). Viral stocks were produced by transfection of the infectious clones in HEK293T cells using jetPEI (Polyplus Transfection). Forty-eight hours after transfection, the supernatant was collected, filtered through a 0.45-µm membrane, and titered using a TCID<sub>50</sub> assay. For infections, the cells (70%–80% confluence) were infected with MAYV-luc diluted to achieve the desired MOI. After 24 h in culture, the cells were lysed with Passive Lysis Buffer (Promega). Replication was monitored using the Genofax C luciferase assay kit (Yelen Analytics). Luminescence was measured directly from the cell lysate using a Spark 10M fluorometer (Tecan). Values were normalized according to protein content in the sample determined using the BCA Assay (Pierce).

### Growth curves

Cells grown in 96-well dishes to ~90% confluence were infected at an MOI of 0.01. Supernatants were collected at 6, 9, 24, and 32 h postinfection. Virus titers were determined on Vero cells using a TCID<sub>50</sub> assay determined from the Spearman–Kärber method. Values were converted in FFU/mL assuming that 1 PFU/ml = 0.56 TCID<sub>50</sub>.

### RT-qPCR quantification of viral genomes

For RT-qPCR, viral supernatants were ultracentrifuged at 95,000 rpm for 10 min using a TLA 100.2 rotor (Beckman Coulter) and lysed with the Luna<sup>®</sup> Cell Ready lysis module (New England Biolabs). The amplification reaction was run on a LightCycler<sup>®</sup> 480 thermocycler (Roche Diagnostics) using the Luna<sup>®</sup> Universal One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs), and MAYV\_For: 5'-TTGTGGCCGAGAGTTCAGG and MAYV\_Rev: 5'-AGCATCACTTTTCGCACC primers. Serial dilutions of the MAYV-luc plasmid were used for the standard range. Each qPCR was performed in triplicate, and the means and standard deviations were calculated.

### Plasmids

The nsP3 sequence was amplified by PCR from the MAYV-luc infectious clone (Chuong et al., 2019) using the primers Fw: 5'-ctgagccgctcccgttacactgtaa and Rev: 5'-gggccctcaggatgagtactgatggtctcc and cloned into the pEGFP-C1 plasmid. Mutants were generated using the QuickChange mutagenesis kit (Agilent) and the following primers: AGDA 5'-atagtaaatcacagcaggagacgcatctgctcggagtg and 5'-cactcgaagcagatgctctcctgctgtgattcactat; ΔFGAP 5'-gaccctcgacgtagagaccgaagaggatag and 5'-actatcctctcgtctctactcgcagcgtc; ΔFGDF 5'-ggatagtgaaatcacatctgcttcggagtgagg and 5'-cccactccgaagcagatggtattcactatcc, or a combination of primers. Plasmids were transfected using jetPEI reagent (Polyplus Transfection). Infectious clones were constructed as follows. A PCR fragment amplified from the MAYV-luc infectious clone using the following primers 5'-tgctaagaattcgcatcaccggcacagatgac and 5'-tgctaagaattcgcatcaccggcacagatgac was introduced into the pcDNA3.1 plasmid and mutated as described above. The *EcoNI-BspI* fragment was subcloned into the parental infectious clone. Plasmids were sequenced to confirm the presence of mutations.

### siRNA and transfections

siRNA targeting G3BP1 or G3BP2 were purchased from Sigma-Aldrich. Nontargeting control siRNA were from Dharmacon. Transfection of 75 nM siRNA was achieved using INTERFERin (Polyplus Transfection). At 48 h post-transfection, an aliquot of the cells was harvested to determine the silencing efficiency by immunoblotting. The remaining cells were plated and infected with MAYV-luc.

## Immunofluorescence microscopy and image analysis

Cells grown on glass coverslips were washed with PBS and then fixed with 4% formalin (Sigma Aldrich) for 1 h at room temperature. For intracellular labeling, the cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS and blocked with 0.2% bovine serum albumin and 0.05% Tween 20 in PBS before incubation with primary antibodies for 1 h at room temperature. Antibodies used were anti-G3BP1 (#SC365338, Santa Cruz Biotechnologies), anti-G3BP2 (#16276-1-AP, Proteintech), and anti-luciferase (MAB10026, R&D Systems). The J2 monoclonal antibody (Scicons) was used to detect dsRNA. Secondary reagents (anti-mouse and anti-rabbit antibodies conjugated with Alexa488, Alexa594, or Alexa647) were added for 1 h at room temperature, and nuclei were stained with DAPI (Sigma-Aldrich). After final washes, coverslips were mounted with ProLong Gold Antifade mounting media (Thermo Fisher Scientific). Images were acquired by confocal laser scanning microscopy using a Leica SP5-SMD scanning confocal microscope equipped with a 63×, 1.4 numerical aperture Leica Achromat oil lens at the Montpellier Resources Imaging platform. Image analysis was performed utilizing the ImageJ software and the JACoP plugin. 3D reconstruction was performed by the Imaris software. The ratio of nuclear to cytoplasmic fluorescence was calculated for individual cells using ImageJ. All images are individual cross-sections except when specified in the text.

## Immunoblotting and immunoprecipitation

Cells were lysed on ice in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, and protease inhibitors (Complete; Roche) and clarified by centrifugation at 10,000 × g for 30 min. Fifty micrograms of total protein was kept as an input, and 400 μg cell lysate was incubated with GFP-Trap Magnetic Agarose (ChromoTek) for 2 h at 4°C. The bead-immune complexes were separated, washed three times with lysis buffer, and resuspended in Laemmli buffer. Immunoprecipitates and whole-cell lysates were separated by SDS-PAGE and then transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Hybond, Amersham). Membranes were blocked against nonspecific binding by using 0.5% casein and 0.1% Tween 20 in PBS and probed with appropriate primary antibodies against G3BP-1 (#SC365338, Santa Cruz Biotechnologies), G3BP-2 (#16276-1-AP, Proteintech), anti-GFP (Santa Cruz Biotechnologies), anti-actin (A3854, Sigma-Aldrich), and nsP3 rabbit polyclonal serum (kindly provided by Andres Merits, University of Tartu, Estonia). After extensive washings, the membranes were probed with HRP-conjugated

secondary antibodies. Chemiluminescence was detected with Luminata Forte (Merck) using a ChemiDoc (Bio-Rad). Densitometry was performed using the Fiji software (ImageJ).

## Sequence alignment

The following are the viruses' corresponding GenBank accession numbers: Sindbis virus (NC\_001547.1); Ross River (NC\_001544.1); Barmah Forest virus (NC\_001786.1); Whataroa virus (NC\_016961.1), Middelburg virus ZRU080/14 isolate (MT015693.1), Bebaru virus (NC\_016962.1), Getah virus GERV-V1 isolate (KY399029.1), CHIKV LR-OPY1 strain (EU224268.1), O'nyong'nyong virus, (NC\_001512.1), Semliki Forest virus (NC\_003215.1), Una virus (NC\_043403), and Mayaro virus TRVL4675 strain (MK070492.1).

## *In silico* modeling of nsP3:G3BP interactions

A MAYV nsP3 3D-model was built by homology using the NMR structure of the MAYV macrodomain (residues 1–159; PDB accession 5IQ5), and the C-domain was predicted *ab initio* using the Robetta server (Song et al., 2013). For all complex predictions, the crystal structure of the G3BP dimer (PDB accession 5FW5) was used after the removal of nsP3-SFV peptides. All docking simulations were performed using the ClusPro 2.0 server (Kozakov et al., 2017) using Piper as the fast Fourier transform (FTT)-based rigid docking program allowing a large positional sampling of nsP3. This step provides 10<sup>9</sup> positions of nsP3 (70,000 rotations translated in x, y, z directions relative to G3BP) from which a thousand of representative rotation/translation combinations with low interaction energy were selected from ranking based on the scoring function (linear combinations of several energy terms that include attractive and repulsive van der Waals contributions describing shape complementarity and one more term representing the electrostatic part of the binding energy). ClusPro is attempting to find the most populated lowest energy solutions after clustering these solutions and ranking by cluster size. Analysis of interactions between G3BP and nsP3 of the best-ranked complex population (cluster with the largest number of members and exhibiting the lowest interaction energy) was carried out with the PyMOL Molecular Graphics System (v1.8, Schrödinger, LLC).

## Statistical analysis

All of the analyses (unpaired Student's t-test) were performed using GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software Inc.). \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material. Further inquiries can be directed to the corresponding authors.

## Author contributions

AN, EB, OA-R-P, WB, PE, and LC performed the experiments. LB supervised the overall project. LC and LB wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Acknowledgments

We thank Camille Clop for technical assistance in transfection experiments, and the Montpellier Resource Imaging platform (<http://www.mri.cnrs.fr/en/>) for confocal imaging facility. We are grateful to James Wegger-Lucarelli (Department of Biomedical Sciences and Pathobiology, Virginia Tech, MD USA) for providing us with the MAYV-luc reporter virus and to Andres Merits (Institute of Technology,

University of Tartu, Estonia) for sharing the CHIKV-nanoLuc virus. We are indebted to Lise Chauveau for helpful discussions and critical reading of the manuscript. O.A.P. is a fellow of the French Ministry of Education, Research, and Innovation. W.B. was granted by Infectiopole Sud Foundation. The funders had no role in study design, data collection, and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

## Conflict of interests

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## References

- Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Rodriguez, Y., Pacheco, Y., Anaya, J.-M., and Ramirez-Santana, C. (2018). Mayaro: an emerging viral threat? *Emerg. Microbes Infect.* 7. doi: 10.1038/s41426-018-0163-5
- Agback, P., Dominguez, F., Pustovalova, Y., Lukash, T., Shiliaev, N., Orekhov, V. Y., et al. (2019). Structural characterization and biological function of bivalent binding of CD2AP to intrinsically disordered domain of chikungunya virus nsP3 protein. *Virology* 537, 130–142. doi: 10.1016/j.virol.2019.08.022
- Bernard, E., Hamel, R., Neyret, A., Ekchariyawat, P., Moles, J. P., Simmons, G., et al. (2014). Human keratinocytes restrict chikungunya virus replication at a post-fusion step. *Virology* 476C, 1–10. doi: 10.1016/j.virol.2014.11.013
- Carette, J. E., Raaben, M., Wong, A. C., Herbert, A. S., Obernosterer, G., Mulherkar, N., et al. (2011). Ebola Virus entry requires the cholesterol transporter niemann-pick C1. *Nature* 477, 340–343. doi: 10.1038/nature10348
- Chandler, L. J., Tesh, R. B., Russell, K. L., Powers, A. M., Watts, D., Da Rosa, A. T., et al. (2006). Genetic relationship among mayara and una viruses suggest distinct patterns of transmission. *Am. J. Trop. Med. Hygiene* 75, 461–469. doi: 10.4269/ajtmh.2006.75.461
- Chuong, C., Bates, T. A., and Weger-Lucarelli, J. (2019). Infectious cDNA clones of two strains of mayaro virus for studies on viral pathogenesis and vaccine development. *Virology* 535, 227–231. doi: 10.1016/j.virol.2019.07.013
- Clarkson, W. D., Kent, H. M., and Stewart, M. (1996). Separate binding sites on nuclear transport factor 2 (NTF2) for GDP-ran and the phenylalanine-rich repeat regions of nucleoporins p62 and Nsp1p. *J. Mol. Biol.* 263, 517–524. doi: 10.1006/jmbi.1996.0594
- Cristea, I. M., Carroll, J. W., Rout, M. P., Rice, C. M., Chait, B. T., and MacDonald, M. (2006). Tracking and elucidating alphavirus-host protein interactions. *R. J. Biol. Chem.* 281, 30269–30278. doi: 10.1074/jbc.M603980200
- Cristea, I. M., Rozjabeck, H., Molloy, K. R., Karki, S., White, L. L., Rice, C. M., et al. (2010). Host factors associated with the sindbis virus RNA-dependent RNA polymerase: Role for G3BP1 and G3BP2 in virus replication. *J. Virol.* 84, 6720–6732. doi: 10.1128/JVI.01983-09
- Dominguez, F., Shiliaev, N., Lukash, T., Agback, P., Palchevska, O., Gould, J. R., et al. (2021). NAP1L1 and NAP1L4 binding to hypervariable domain of chikungunya virus nsP3 protein is bivalent and requires phosphorylation. *J. Virol.* 95, e0083621. doi: 10.1128/JVI.00836-21
- Fischer, J. W., Busa, V. F., Shao, Y., and Leung, A. K. L. (2020). Structure-mediated RNA decay by UPF1 and G3BP1. *Mol. Cell* 78, 70–84.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2020.01.021
- Fribourg, S., Braun, I. C., Izaurralde, E., and Conti, E. (2001). Structural basis for the recognition of a nucleoporin FG repeat by the NTF2-like domain of the TAP/p15 mRNA nuclear export factor. *Mol. Cell* 8, 645–656. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00348-3
- Frolov, I., Kim, D. Y., Akhrymuk, M., Mobley, J. A., and Frolova, E. (2017). Hypervariable domain of Eastern equine encephalitis virus nsP3 redundantly utilizes multiple cellular proteins for replication complex assembly. *I. J. Virol.* 91. doi: 10.1128/JVI.00371-17
- Fros, J. J., Domeradzka, N. E., Baggen, J., Geertsema, C., Flipse, J., Vlak, J. M., et al. (2012). Chikungunya virus nsP3 blocks stress granule assembly by recruitment of G3BP into cytoplasmic foci. *J. Virol.* 86, 10873–10879. doi: 10.1128/JVI.01506-12JVI.01506-12
- Gorchakov, R., Garmashova, N., Frolova, E., and Frolov, I. (2008). Different types of nsP3-containing protein complexes in sindbis virus-infected cells. *J. Virol.* 82, 10088–10101. doi: 10.1128/JVI.01011-08
- Gotte, B., Liu, L., and McInerney, G. M. (2018). The enigmatic alphavirus non-structural protein 3 (nsP3) revealing its secrets at last. *Viruses* 10. doi: 10.3390/v10030105
- Götte, B., Panas, M. D., Hellström, K., Liu, L., Samreen, B., Larsson, O., et al. (2019). Separate domains of G3BP promote efficient clustering of alphavirus replication complexes and recruitment of the translation initiation machinery. *PLoS Pathog.* 15, e1007842. doi: 10.1371/journal.ppat.1007842
- Götte, B., Utt, A., Fragkoudis, R., Merits, A., and McInerney, G. M. (2020). Sensitivity of alphaviruses to G3BP deletion correlates with efficiency of replicase polyprotein processing. *J. Virol.* (2020) 94(7):e01681-19. doi: 10.1128/JVI.01681-19
- Hassing, R.-J., Leparac-Goffart, I., Blank, S. N., Thevarayan, S., Tolou, H., Doornum, G., et al. (2010). Imported mayaro virus infection in the Netherlands. *J. Infection* 61, 343–345. doi: 10.1016/j.jinf.2010.06.009

- Iadevaia, V., Burke, J. M., Eke, L., Moller-Levet, C., Parker, R., and Locker, N. (2022). Novel stress granule-like structures are induced via a paracrine mechanism during viral infection. *J. Cell Sci.* 135, jcs259194. doi: 10.1242/jcs.259194
- Kedersha, N., Panas, M. D., Achorn, C. A., Lyons, S., Tisdale, S., Hickman, T., et al. (2016). G3BP-Caprin1-USP10 complexes mediate stress granule condensation and associate with 40S subunits. *J. Cell Biol.* 212, 845–860. doi: 10.1083/jcb.201508028
- Kennedy, D., French, J., Guitard, E., Ru, K., Tocque, B., and Mattick, J. (2002). Characterization of G3BPs: Tissue specific expression, chromosomal localisation and rasGAP120 binding studies. *J. Cell Biochem.* 84, 173–187. doi: 10.1002/jcb.1277
- Kim, D. Y., Reynaud, J. M., Rasaloukaya, A., Akhrymuk, I., Mobley, J. A., Frolov, I., et al. (2016). New world and old world alphaviruses have evolved to exploit different components of stress granules, FXR and G3BP proteins, for assembly of viral replication complexes. *PLoS Pathog.* 12, e1005810. doi: 10.1371/journal.ppat.1005810
- Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., et al. (2017). The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nat. Protoc.* 12, 255–278. doi: 10.1038/nprot.2016.169
- Krapp, S. (2017). The stress granule component G3BP is a novel interaction partner for the nuclear shuttle proteins of the nanovirus pea necrotic yellow dwarf virus and geminivirus abutilon mosaic virus. *Virus Res.* 9. doi: 10.1016/j.virusres.2016.09.021
- Kril, V., Aïqui-Reboul-Paviet, O., Briant, L., and Amara, A. (2021). New insights into chikungunya virus infection and pathogenesis. *Annu. Rev. Virol.* 8, 327–347. doi: 10.1146/annurev-virology-091919-102021
- Kristensen, O. (2015). Crystal structure of the G3BP2 NTF2-like domain in complex with a canonical FGDF motif peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467, 53–57. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.123
- Lavergne, A., Thoisy, B., Lacoste, V., Pascalis, H., Pouliquen, J.-F., Mercier, V., et al. (2006). Mayaro virus: Complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. *Virus Res.* 117, 283–290. doi: 10.1016/j.virusres.2005.11.006
- Law, I. M. J., Razooky, B. S., Li, M. M. H., You, S., Jurado, A., Rice, C. M., et al. (2019). ZAP's stress granule localization is correlated with its antiviral activity and induced by virus replication. *PLoS Pathog.* 15, e1007798. doi: 10.1371/journal.ppat.1007798
- Liu, Z.-S., Cai, H., Xue, W., Wang, M., Xia, T., Li, W.-J., et al. (2019). G3BP1 promotes DNA binding and activation of cGAS. *Nat. Immunol.* 20, 18–28. doi: 10.1038/s41590-018-0262-4
- Lukash, T., Agback, T., Dominguez, F., Shiliaev, N., Meshram, C., Frolova, E. I., et al. (2020). Structural and functional characterization of host FHL1 protein interaction with hypervariable domain of chikungunya virus nsP3 protein. *J. Virol.* 95. doi: 10.1128/JVI.01672-20
- Martin, S., Bellora, N., Gonzalez-Vallinas, J., Irimia, M., Chebli, K., de Toledo, M., et al. (2016). Preferential binding of a stable G3BP ribonucleoprotein complex to intron-retaining transcripts in mouse brain and modulation of their expression in the cerebellum. *J. Neurochem.* 139, 349–368. doi: 10.1111/jnc.13768
- Matkovic, R., Bernard, E., Fontanel, V., Eldin, P., Chazal, N., Hassan Hersi, D., et al. (2018). The host DHX9 DExH box helicase is recruited to chikungunya virus replication complexes for optimal genomic RNA translation. *J. Virol.* 93:e01764-18. doi: 10.1128/JVI.01764-18
- Meertens, L., Hafirassou, M. L., Couderc, T., Bonnet-Madin, L., Kril, V., Kümmerer, B. M., et al. (2019). FHL1 is a major host factor for chikungunya virus infection. *Nature* 574, 259–263. doi: 10.1038/s41586-019-1578-4
- Meshram, C. D., Agback, P., Shiliaev, N., Urakova, N., Mobley, J. A., Agback, T., et al. (2018). Multiple host factors interact with hypervariable domain of chikungunya virus nsP3 and determine viral replication in cell-specific mode. *J. Virol.* 92 (16). doi: 10.1128/JVI.00838-18
- Mutso, M., Morro, A. M., Smedberg, C., Kasvandik, S., Aquilimeba, M., Teppor, M., et al. (2018). Mutation of CD2AP and SH3KBP1 binding motif in alphavirus nsP3 hypervariable domain results in attenuated virus. *Virus* 10. doi: 10.3390/v10050226
- Neuvonen, M., Kazlauskas, A., Martikainen, M., Hinkkanen, A., Ahola, T., and Saksela, K. (2011). SH3 domain-mediated recruitment of host cell amphiphysins by alphavirus nsP3 promotes viral RNA replication. *PLoS Pathog.* 7, e1002383. doi: 10.1371/journal.ppat.1002383
- Nowee, G., Bakker, J. W., Geertsema, C., Ros, V. I. D., Göertz, G. P., Fros, J. J., et al. (2021). A tale of 20 alphaviruses; inter-species diversity and conserved interactions between viral non-structural protein 3 and stress granule proteins. *Front. Cell Dev. Biol.* 9. doi: 10.3389/fcell.2021.625711
- Onomoto, K., Jogi, M., Yoo, J. S., Narita, R., Morimoto, S., Takemura, A., et al. (2012). Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity. *PLoS One* 7, e43031. doi: 10.1371/journal.pone.0043031
- Panas, M. D., Ahola, T., and McInerney, G. M. (2014). The c-terminal repeat domains of nsP3 from the old world alphaviruses bind directly to G3BP. *J. Virol.* 88, 5888–5893. doi: 10.1128/JVI.00439-14
- Panas, M. D., Schulte, T., Thaa, B., Sandalova, T., Kedersha, N., Achour, A., et al. (2015). Viral and cellular proteins containing FGDF motifs bind G3BP to block stress granule formation. *PLoS Pathog.* 11, e1004659. doi: 10.1371/journal.ppat.1004659
- Panas, M. D., Varjak, M., Lulla, A., Eng, K. E., Merits, A., Karlsson Hedestam, G. B., et al. (2012). Sequestration of G3BP coupled with efficient translation inhibits stress granules in semliki forest virus infection. *Mol. Biol. Cell* 23, 4701–4712. doi: 10.1091/mbc.E12-08-0619mbc.E12-08-0619
- Parker, F., Maurier, F., Delumeau, I., Duchesne, M., Faucher, D., Debussche, L., et al. (1996). A ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein. *Mol. Cell Biol.* 16, 2561–2569. doi: 10.1128/MCB.16.6.2561
- Pazman, C., Mayes, C. A., Fanto, M., Haynes, S. R., and Mlodzik, M. (2000). Rasputin, the drosophila homologue of the RasGAP SH3 binding protein, functions in ras- and rho-mediated signaling. *Development* 127, 1715–1725. doi: 10.1242/dev.127.8.1715
- Protter, D. S. W., and Parker, R. (2016). Principles and properties of stress granules. *Trends Cell Biol.* 26, 668–679. doi: 10.1016/j.tcb.2016.05.004
- Receveur, M. C., Grandadam, M., Pistone, T., and Malvy, D. (2010). Infection with mayaro virus in a French traveller returning from the Amazon region, Brazil, januar. *Eurosurveillance* 15, 19563. doi: 10.2807/ese.15.18.19563-en
- Remenyi, R., Gao, Y., Hughes, R. E., Curd, A., Zothner, C., Peckham, M., et al. (2018). Persistent replication of a chikungunya virus replicon in human cells is associated with presence of stable cytoplasmic granules containing nonstructural protein 3. *J. Virol.* 92. doi: 10.1128/JVI.00477-18
- Scholte, F. E., Tas, A., Albuiescu, I. C., Zusiainaite, E., Merits, A., Snijder, E. J., et al. (2015). Stress granule components G3BP1 and G3BP2 play a proviral role early in chikungunya virus replication. *J. Virol.* 89, 4457–4469. doi: 10.1128/JVI.03612-14
- Schulte, T., Liu, L., Panas, M. D., Thaa, B., Dickson, N., Gotte, B., et al. (2016). Combined structural, biochemical and cellular evidence demonstrates that both FGDF motifs in alphavirus nsP3 are required for efficient replication. *Open Biol.* 6. doi: 10.1098/rsob.160078
- Solignat, M., Gay, B., Higgs, S., Briant, L., and Devaux, C. (2009). Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. *Virology* 393, 183–197. doi: 10.1016/j.virol.2009.07.024
- Song, Y., DiMaio, F., Wang, R. Y.-R., Kim, D., Miles, C., Brunette, T., et al. (2013). High-resolution comparative modeling with RosettaCM. *Structure* 21, 1735–1742. doi: 10.1016/j.str.2013.08.005
- Strauss, E. G., Levinson, R., Rice, C. M., Dalrymple, J., and Strauss, J. H. (1988). Nonstructural proteins nsP3 and nsP4 of Ross river and O'Nyong-nyong viruses: sequence and comparison with those of other alphaviruses. *Virology* 164, 265–274. doi: 10.1016/0042-6822(88)90644-7
- Tourriere, H., Chebli, K., Zekri, L., Courselaud, B., Blanchard, J. M., Bertrand, E., et al. (2003). The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J. Cell Biol.* 160, 823–831. doi: 10.1083/jcb.200212128
- Tsika, A. C., Melekis, E., Tsatsouli, S.-A., Papageorgiou, N., Maté, M. J., Canard, B., et al. (2019). Deciphering the nucleotide and RNA binding selectivity of the mayaro virus macro domain. *J. Mol. Biol.* 431, 2283–2297. doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.013
- Vognsen, T., and Kristensen, O. (2012). Crystal structure of the rasputin NTF2-like domain from drosophila melanogaster. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420, 188–192. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.140
- Yang, W., Ru, Y., Ren, J., Bai, J., Wei, J., Fu, S., et al. (2019). G3BP1 inhibits RNA virus replication by positively regulating RIG-I-mediated cellular antiviral response. *Cell Death Dis.* 10, 1–15. doi: 10.1038/s41419-019-2178-9
- Zhang, Q., Sharma, N. R., Zheng, Z.-M., and Chen, M. (2019). Viral regulation of RNA granules in infected cells. *Virol. Sin.* 34, 175–191. doi: 10.1007/s12250-019-00122-3

# Résumé

**Résumé :** Le virus Chikungunya (CHIKV) est un virus émergent à fort impact sur la santé humaine vectorisé par les moustiques du genre *Aedes*. Il peut être la cause d'arthralgies invalidantes et persistantes. Le CHIKV n'est, à l'heure actuelle, la cible d'aucun vaccin ou traitement antiviral spécifique.

Le génome du CHIKV code pour quatre protéines non structurales. Parmi ces protéines, la méthyl-guanylyl-transférase virale nsP1 est responsable de l'ancrage du complexe de réplication viral dans la bicouche lipidique. Assemblée sous forme dodécamérique, nsP1 forme un pore situé au col des organelles de réplication du CHIKV assurant l'organisation et la maintenance de ces compartiments indispensables à la réplication du génome viral. Lorsqu'elle est exprimée isolément, la protéine nsP1 génère des déformations membranaires de la cellule hôte semblables à des filopodes. Ce phénotype nécessite la présence d'un domaine de palmitoylation si tué en position 417-CCC-419. Les mécanismes impliqués dans la fonction de déformation membranaire de nsP1 sont inconnus. L'objectif de cette thèse a consisté à rechercher les mécanismes cellulaires contribuant à la fonction de déformation membranaire de nsP1.

Nous avons caractérisé les filopodes formés par la protéine nsP1 isolée comme des protrusions membranaires riches en actine et hautement dynamiques. Des approches d'inactivation par siRNA et par inhibiteurs chimiques nous ont permis d'identifier la Rho-GTPase Rac1, la sérine/thréonine kinase PAK1 et la protéine nucléatrice d'actine Arp2 comme des acteurs essentiels dans la formation de ces extensions membranaires. Afin de préciser les mécanismes impliqués, nous avons analysé l'interactome de nsP1 par spectrométrie de masse. Parmi les partenaires cellulaires identifiés, nous avons démontré le rôle fonctionnel des protéines HAX1 et SCRIB, également impliquées dans la régulation de la voie Rac1-PAK-Arp2. Outre leur rôle critique dans la formation de filopodes, ces partenaires de nsP1 se sont avérés indispensables dans la cellule infectée pour la réplication du génome du CHIKV et d'*Alphavirus* proches. Ces observations mettent en lumière l'existence de mécanismes communs aux déformations membranaires induites par nsP1 et la réplication virale

**Abstract :** Chikungunya virus (CHIKV) is an emerging virus with a major impact on human health, vectored by mosquitoes of the *Aedes* genus. It can cause disabling and persistent arthralgia. CHIKV is not currently the target of any specific vaccine or antiviral treatment.

The CHIKV genome encodes four non-structural proteins. Among these proteins, the viral methyl-guanylyl-transferase nsP1 is responsible for anchoring the viral replication complex in the lipid bilayer. Assembled in dodecameric form, nsP1 forms a pore located at the neck of CHIKV replication organelles, ensuring the organization and maintenance of these compartments essential for viral genome replication. When expressed isolated, the nsP1 protein generates filopodia-like membrane deformations in the host cell. This phenotype requires the presence of a palmitoylation domain if killed at position 417-CCC-419. The mechanisms involved in the membrane remodeling function of nsP1 are unknown. The aim of this research work was to investigate the cellular mechanisms contributing to the membrane deformation function of nsP1.

We characterized the filopodia formed by the isolated nsP1 protein as highly dynamic, actin-rich membrane protrusions. Inactivation techniques using siRNA and chemical inhibitors enabled us to identify the Rho-GTPase Rac1, the serine/threonine kinase PAK1 and the actin-nucleating protein Arp2 as key players in the formation of these membrane extensions. To clarify the mechanisms involved, we analyzed the nsP1 interactome by mass spectrometry. Among the cellular partners identified, we demonstrated the functional role of the HAX1 and SCRIB proteins, also involved in regulating the Rac1-PAK-Arp2 pathway. In addition to their critical role in filopodia formation, these partners of nsP1 were shown to be indispensable in the infected cell for CHIKV and related Alphavirus genome replication. These observations highlight the existence of mechanisms common to nsP1-induced membrane deformation and viral replication.