

Armand-Frappier Santé Biotechnologie

VCP/P97 INTERAGIT AVEC NS4B DU VIRUS ZIKA ET REGULE LA STABILITE DES ORGANITES DE REPLICATION VIRALE

Par

Anaïs Anton

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
En Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Patrick Labonté
INRS- Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

Examineur externe

Anne Gagnol
Université McGill- département de
Microbiologie et Immunologie

Directeur de recherche

Laurent Chatel-Chaix
INRS- Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier du fond du cœur mon directeur de recherche Laurent Chatel-Chaix pour m'avoir accueillie dans son laboratoire pour un stage d'été dans un premier temps puis pour m'avoir permis par la suite de continuer en maîtrise. Merci pour l'encadrement, les conseils, le soutien, la patience et surtout un grand merci pour la transmission des connaissances et de la passion pour la virologie.

Je tiens aussi à remercier mes collègues et amis du laboratoire, Clément M., Wesley F., Aicha A.S., Nicolas T., Paulin V. et Claudia G. pour l'aide et les bons moments. Je remercie tout particulièrement Wesley Freppel et Clément Mazeaud pour m'avoir soutenue dès mon arrivée au laboratoire. Merci de m'avoir aidé pour mes expériences, d'avoir répondu à mes questions débiles et de m'avoir fait autant rire.

Je remercie également tous les amis rencontrés qui ont fait de ces années à l'institut une belle aventure. Un grand merci à Rita G. pour être la meilleure des collocs. Merci à mes 3 chères amies Léna A., Sarah B. et Sarra L. pour le soutien dans les périodes difficiles et surtout les merveilleux moments passés ensemble. Et comme on l'a si bien étudié pendant nos maîtrises : « peu importe la question posée, la réponse c'est toujours chocolat ! »

Finalement je remercie mes parents Simone et Guy Anton pour tout l'amour, le support et les encouragements que vous m'avez donnés tout au long de mes études.

Merci à tous !

RÉSUMÉ

Les infections par le virus Zika (VZIK) peuvent causer des complications neurologiques comme les microcéphalies congénitales et le syndrome de Guillain-Barré. Afin d'établir un environnement favorable à sa réplication, le VZIK remodèle les endomembranes cellulaires pour former des organites de réplication virale comme les convolutions de membranes (CM). Nous avons identifié l'ATPase cellulaire VCP comme partenaire d'interaction de NS4B du VZIK. Des approches pharmacologiques et par interférence d'ARN montrent que VCP est nécessaire à sa réplication. Nous avons montré que NS3 et NS4B interagissaient entre-elles. Lors de l'infection, VCP est relocalisée dans des ultrastructures contenant NS4B et NS3 mais son inhibition n'a pas d'impact sur leur interaction. L'inhibition de VCP réduit la stabilité de NS3 sans altérer l'expression d'autres protéines virales et entraîne une diminution de l'abondance et de la taille des CM, une inhibition de l'élongation mitochondriale et une apoptose accrue dans les cellules infectées. Nous avons donc identifié VCP comme un facteur cellulaire requis pour la réplication du VZIK et plus précisément pour le maintien des organites de réplication virale. Nos données soutiennent le modèle disant que les CM régulent la réplication en impactant les fonctions mitochondriales et les signaux de mort induits par le VZIK afin de créer un environnement cytoplasmique favorable à sa réplication.

Mots-clés : Virus Zika, NS4B, valosin-containing protein, organite de réplication virale , mort cellulaire induite par infection virale

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) infections can cause neurological complications such as congenital microcephaly and Guillain-Barré syndrome. In order to generate an intracellular environment favorable to viral replication, ZIKV induces endomembrane remodeling and the morphogenesis of replication factories such as convoluted membranes (CM). In this study we identified the cellular ATPase VCP as an interaction partner of ZIKV-NS4B. Pharmacological and RNA interference approaches show that VCP is necessary for its replication. We have shown that NS3 and NS4B interact with each other. During infection, VCP is relocated to ultrastructures containing NS4B and NS3 but its inhibition has no impact on their interaction. Inhibition of VCP reduces the stability of NS3 without altering the expression of other viral proteins and leads to a decrease in the abundance and size of CM, an inhibition of mitochondrial elongation and increased apoptosis in infected cells. We therefore identified VCP as a cellular factor required for ZIKV replication and more specifically for the maintenance of viral replication organelles. Our data support the model saying that CM regulate replication by impacting mitochondrial functions and death signals induced by ZIKV in order to create a cytoplasmic environment favorable to viral replication.

Keywords : Zika virus, NS4B, valosin-containing protein, viral replication factories, virus-induced cell death

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VIII
1 INTRODUCTION.....	1
1.1 LE VIRUS ZIKA	1
1.1.1 <i>Classification</i>	1
1.1.2 <i>Épidémies et expansion globale</i>	1
1.2 TRANSMISSION DU VZIK	4
1.2.1 <i>Transmission vectorielle</i>	4
1.2.2 <i>Transmission non-vectorielle</i>	5
1.3 PRESENTATIONS CLINIQUES ET TROPISME.....	6
1.3.1 <i>Symptômes et tropisme « classique »</i>	6
1.3.2 <i>Syndrome de Guillain-Barré et neurotropisme chez l'adulte</i>	7
1.3.3 <i>Microcéphalie et neurotropisme chez le fœtus</i>	8
1.3.4 <i>Facilitation de l'infection par des anticorps</i>	9
1.3.5 <i>Perturbation des barrières biologiques</i>	10
1.4 CYCLE DE REPLICATION VIRALE	11
1.5 ORGANITES DE REPLICATION VIRALE.....	16
1.5.1 <i>Paquets vésiculaires</i>	19
1.5.2 <i>Sac de virus</i>	20
1.5.3 <i>Convolutions de membrane</i>	20
1.6 TRAITEMENTS.....	22
1.6.1 <i>Développement de vaccins</i>	22
1.6.2 <i>Développement de thérapies antivirales</i>	23
1.7 MANIPULATION DE LA MORT CELLULAIRE PAR LES <i>FLAVIVIRUS</i>	24
1.7.1 <i>Induction de la mort cellulaire</i>	24
1.7.2 <i>Répression de la mort cellulaire</i>	26
1.8 NS4B.....	28
1.8.1 <i>Topologie et interactions</i>	28
1.8.2 <i>NS4B et organites de réplication virale</i>	29
1.8.1 <i>NS4B : immunité et élongation mitochondriale</i>	30
1.8.2 <i>NS4B et neuropathogenèse</i>	31
1.9 VCP	32
1.9.1 <i>Fonctions cellulaires de VCP</i>	32

1.9.2	<i>VCP dans le système nerveux</i>	34
1.9.3	<i>VCP dans les infections virales</i>	35
2	HYPOTHESES ET OBJECTIFS	36
3	ARTICLE	37
3.1	MISE EN CONTEXTE	38
3.2	ATTESTATION CONTRIBUTIONS DES AUTEURS	38
3.3	LETTRE SOUMISSION.....	39
3.4	ABSTRACT	40
3.5	IMPORTANCE	41
3.6	INTRODUCTION.....	42
3.7	RESULTS	45
3.8	DISCUSSION	51
3.9	MATERIALS AND METHODS.....	55
3.10	ACKNOWLEDGEMENTS	62
3.11	FIGURE LEGENDS.....	63
3.12	FIGURES	67
3.13	REFERENCES.....	77
4	DISCUSSION	82
5	CONCLUSION	94
6	REFERENCES	96

LISTE DES FIGURES

Introduction

FIGURE 1-1 EMERGENCE ET PROPAGATION DU VIRUS ZIKA	2
FIGURE 1-2 MICROCEPHALIE : CIRCONFERENCE DE LA TETE DES NOUVEAU-NES	3
FIGURE 1-3 CYCLE DE REPLICATION DES <i>FLAVIVIRUS</i>	12
FIGURE 1-4 MATURATION DES PARTICULES VIRALES DES <i>FLAVIVIRUS</i>	13
FIGURE 1-5 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ARNV ET DE LA TOPOLOGIE MEMBRANAIRE DES PROTEINES VIRALES MATURES DES <i>FLAVIVIRUS</i>	15
FIGURE 1-6 REARRANGEMENTS MEMBRANAIRES INDUITS PAR DIFFERENTS MEMBRES DES <i>FLAVIVIRUS</i>	17
FIGURE 1-7 ORGANITES DE REPLICATION VIRALE DU VDEN	18
FIGURE 1-8 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA TOPOLOGIE MEMBRANAIRE DE NS4B DU VDEN.....	29
FIGURE 1-9 STRUCTURE DE L'HEXAMERE DE VCP.	32

Article

FIGURE 3-1 ZIKV NS4B INTERACTS WITH VCP.	67
FIGURE 3-2 VCP REGULATES ZIKV REPLICATION	68
FIGURE 3-3 ZIKV NS4B INDUCES THE REDISTRIBUTION OF VCP INTO LARGE CYTOPLASMIC STRUCTURES	69
FIGURE 3-4 VCP AND NS3 ASSOCIATE WITH ZIKV-INDUCED CONVOLUTED MEMBRANES.....	70
FIGURE 3-5 THE INHIBITION OF VCP ATPASE ACTIVITY ALTERS ZIKV REPLICATION FACTORIE.....	71
FIGURE 3-6 ZIKV NS4B INTERACTS WITH NS3.....	72
FIGURE 3-7 ZIKV NS3 AND NS4B INTERACT IN THE ABSENCE OF OTHER VIRAL PROTEINS.	73
FIGURE 3-8 VCP ATPASE INHIBITION SPECIFICALLY DECREASE ZIKV NS3 EXPRESSION IN INFECTED CELLS	74
FIGURE 3-9 VCP ATPASE INHIBITION DAMPENS ZIKV-DEPENDENT MITOCHONDRIAL ELONGATION.....	75
FIGURE 3-10 VCP ATPASE INHIBITION INCREASES ZIKV-INDUCED APOPTOSIS	76

Discussion

FIGURE 4-1 MECANISMES DE COURBURE ET MODIFICATIONS DES MEMBRANES	84
FIGURE 4-2 ASSOCIATION DE NS4B AVEC LES CM.....	87
FIGURE 4-3 INTERACTION NS4B/NS3 : MUTANTS NS4B	88
FIGURE 4-4 QUANTIFICATION RATIO NS3/NS4B	88

Conclusion

FIGURE 5-1 MODELES RECAPITULATIFS	94
---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ATP : Adénosine triphosphate
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADE : Antibody-dependant enhancement ou amélioration dépendante des anticorps
ARN: Acide ribonucléique
ARN db: ARN double brin
ARN sb+ : ARN simple brin de polarité positive
ARN sf : ARN sous-génomique flaviviral
ARN v: ARN viral
cGAS: cyclic GMP-AMP synthase
CM : Convolution de membrane
CMV : Cytomégalovirus
CNP : Cellule neurale progénitrice
CSNh : Cellule souche neurale humaine
DAPI : 4'6-diamidino-2-phenylindole
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium (Milieu minimum essentiel de Eagle)
ERAD : Mécanisme de dégradation associé au reticulum endoplasmique
HA : Hémagglutinine
Huh : Human Hepatocarcinoma cell line (Lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain)
IBMPFD/ALS: Inclusion body myopathy with early-onset Paget disease and frontotemporal dementia/ Amyotrophic Lateral Sclerosis= Protéinopathie multisystémique tardive.
IFN: Interféron
IgG: Immunoglobuline-G
IgM : Immunoglobuline-M
MAD : Dégradation associée aux mitochondries
MAMs : Membranes associées aux mitochondries
NTPase: Nucléotide triphosphatase
PBS: Phosphate-Buffered Saline (Tampon Phosphate Salin)
PCR : Polymérase Chain Réaction (Réaction en chaîne par polymérase)
PEI : Polyéthylèneimine
PRR : Senseurs cellulaires qui reconnaissent des motifs moléculaires associés à des pathogènes
PV : Paquets vésiculaires
RE : Reticulum endoplasmique
Rluc : *Renilla luciferase*

RTPase : ARN-triphosphatase
SDS : Sodium dodecyl sulfate (Dodécylsulfate de Sodium)
SGB : Syndrome de Guillain-Barré
SNC : Système nerveux centrale
SV : Sac de virus
T7 pol : T7 polymérase (Polymérase T7)
TORCH: *Toxoplasma gondii*, Other, Rubéole, CMV, HSV
UPR: Unfolding protein response
VCP: Valosin-containing protein
VDEN : Virus de la dengue
VFJ : Virus de la fièvre jaune
VHS : Virus Herpes Simplex
VMET : Virus de la méningo-encéphalite à tiques
VNO : Virus du Nil occidental
VZIK : Virus Zika
WT : Wild-Type (Souche sauvage)

1 INTRODUCTION

1.1 Le virus Zika

1.1.1 Classification

Le virus Zika (VZIK) est un virus à ARN de polarité positive (ARNsb+) appartenant au genre des *Flavivirus* dans la famille des *Flaviviridae*. Le genre des *Flavivirus* compte plus de 70 espèces dont la majorité est transmise par des arthropodes : 50% par des moustiques, 28% par des tiques et le reste est transmis entre rongeurs ou entre chauves-souris sans vecteur arthropodes connus (Mukhopadhyay et al., 2005).

Les mammifères et les oiseaux sont les principaux hôtes des *Flavivirus* (Simmonds et al., 2017). Plus de 50% des *Flavivirus* connus ont été associés à des maladies humaines, notamment de nombreux agents pathogènes importants, tels que le virus de la fièvre jaune (VFJ), le virus de la dengue (VDEN), le virus de l'encéphalite japonaise (VEJ), le virus du Nil occidental (VNO), le virus de la méningo-encéphalite à tiques (VMET) et le virus Zika (VZIK). De plus, plusieurs *Flavivirus* infectent des animaux domestiques et provoquent des maladies importantes sur le plan économique (Simmonds et al., 2017).

Le virus Zika est génétiquement très proche des autres *Flavivirus* pathogènes et tout particulièrement proche du virus de la dengue. Ce dernier est responsable du taux de maladie et de mortalité le plus élevé parmi les membres du genre *Flavivirus*. Il est estimé qu'environ 390 millions des 3,9 milliards de personnes vivant dans les zones endémiques contractent la maladie chaque année, ce qui en fait l'infection à arbovirus la plus répandue (Bhatt et al., 2013). Parmi les gens infectés, des centaines de milliers de cas graves surviennent, dont environ 20 000 décès par année (WHO, 2012). Le terme « arbovirus » regroupe les virus ayant pour vecteur des arthropodes.

1.1.2 Épidémies et expansion globale

Le virus Zika est considéré comme un virus ré-émergent. En effet, bien qu'il ait été découvert il y a plus de 70 ans, ce n'est que récemment qu'il a causé des épidémies majeures.

C'est en 1947 que le virus a été découvert pour la première fois par une équipe de scientifique au cours d'une sortie de surveillance pour le virus de la fièvre jaune dans la forêt Zika en Ouganda. Il a été isolé du sérum d'un macaque rhésus. Cet isolat est nommé MR-766 est considéré comme la « souche historique » du virus Zika et est souvent utilisé comme

représentant de la lignée Africaine (Dick et al., 1952; Song et al., 2017). Pendant les 50 années suivant la découverte du virus, seulement une douzaine de cas de maladies bénignes associées au VZIK chez l'homme a été documentée dans des pays d'Afrique et d'Asie (Song et al., 2017).

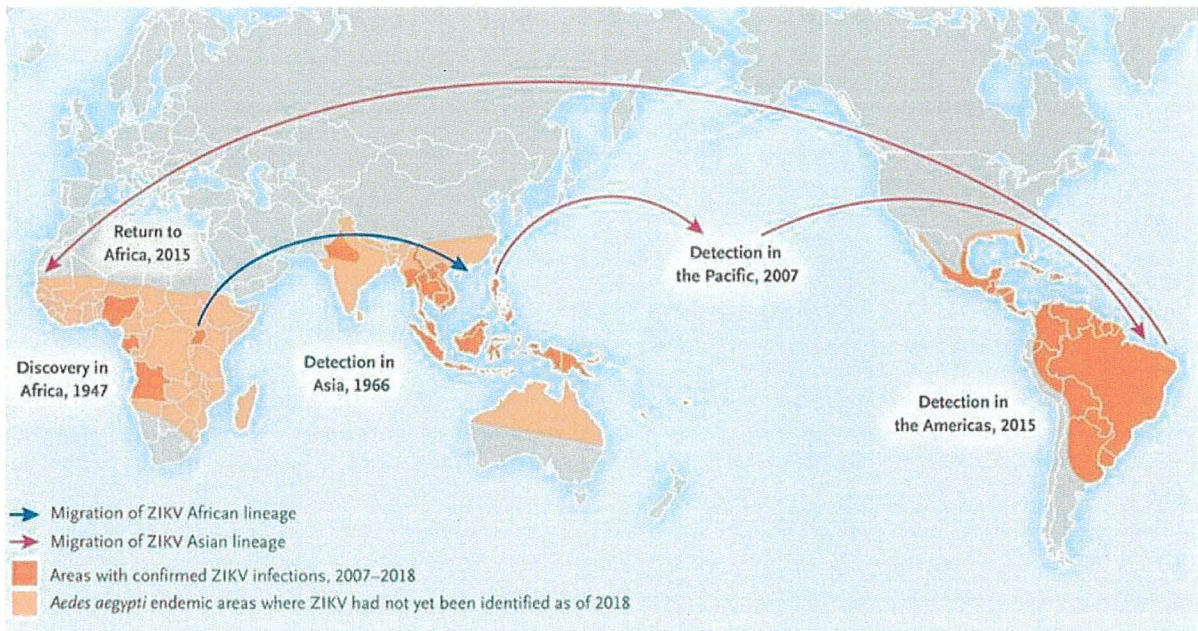


Figure 1-1 Emergence et propagation du virus Zika

Carte des régions où des cas confirmés d'infections par le VZIK se sont produits de 2007 à 2018 (orange foncé) et des zones où *Aedes aegypti* (moustique vecteur) est endémique mais où le VZIK n'a pas encore été identifié (orange clair) en 2018. La migration de la lignée Africaine est représentée par une flèche bleu et celle de la lignée asiatique par des flèches violettes (modifié de Musso et al., 2019).

En 2007, le VZIK a provoqué la première grande épidémie sur l'île de Yap, dans les États fédérés de Micronésie, dans le nord-ouest de l'océan Pacifique. Cette maladie, qui paraissait relativement bénigne, était caractérisée par des fièvres, des éruptions cutanées, des arthralgies et des conjonctivites (Duffy et al., 2009).

Entre le début et le milieu des années 2010, une poignée de cas sporadiques d'infection par le VZIK ont également été signalés dans des pays de l'Asie du Sud-Est, tels que le Cambodge, la Malaisie, l'Indonésie et les Philippines (Song et al., 2017).

En 2013 et 2014, une épidémie majeure du VZIK s'est produite en Polynésie française, un territoire français d'outre-mer situé au milieu de l'océan Pacifique sud. Au cours de cette épidémie, environ 11% de la population totale aurait eu recours à un traitement médical pour des

infections présumées par le VZIK. Bien qu'une grande majorité des cas cliniques observés lors de cette épidémie soient similaires à ceux de l'épidémie de Yap de 2007, certains d'entre eux montraient des complications neurologiques sévères. C'est lors de cette épidémie que le syndrome de Guillain-barré a été suspecté être associé à l'infection par le VZIK (Musso et al., 2014).

C'est en 2015 que les premières transmissions locales du virus Zika ont été détectées dans les Amériques. En effet, vers la fin de l'année 2015, le virus s'est étendu dans tout le territoire brésilien avec entre 440 000 et 1 500 000 cas estimés. C'est au même moment qu'une augmentation de cas de microcéphalie chez les nouveau-nés est survenue. Plus de 4000 cas ont été rapportés en février 2016 (Song et al., 2017; Victora et al., 2016).

La microcéphalie est une condition clinique où la taille de la tête est significativement plus petite que la norme pour l'âge et le sexe de la personne. La taille occipito-frontale de la tête est inférieure à -2 écart-type dans les cas de microcéphalies classiques et est inférieure à -3 écart-type dans les cas de microcéphalies sévères (voir Figure 1-2). Deux types de microcéphalies sont reconnues : la microcéphalie primaire ou congénitale et la microcéphalie secondaire ou postnatale. La première se produit lorsque le cerveau ne parvient pas à atteindre une taille appropriée pendant la grossesse à environ 32 semaines de la période de gestation, et est causée par une diminution progressive de la production de neurones. L'autre est liée à une taille normale du cerveau à la naissance, mais qui ne parvient pas à croître par la suite en raison de la perte de connexions dendritiques (Woods, 2004). Le VZIK est principalement responsable de microcéphalie primaire mais certains cas de microcéphalie secondaire ont également été suspectés (Mello et al., 2019).

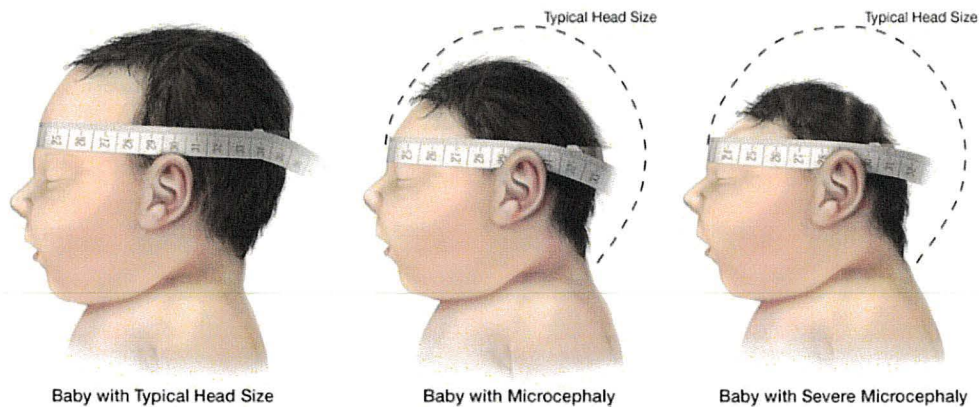


Figure 1-2 Microcéphalie : circonférence de la tête des nouveau-nés (CDC, 2019)

Depuis son apparition au Brésil, le VZIK s'est propagé à un rythme alarmant dans la majeure partie de l'Amérique centrale, de l'Amérique du Sud et des Caraïbes. De nombreuses études statistiques, y compris une étude rétrospective sur l'épidémie en Polynésie Française ont rapidement confirmé l'association entre la microcéphalie et le VZIK (Cauchemez et al., 2016). C'est pour cela qu'en 2016, l'Organisation mondiale de la Santé a mis en place un « programme de santé publique d'urgence de portée internationale » de février à novembre 2016 (WHO, 2016).

Aujourd'hui, le VZIK est considéré comme un virus endémique dans les Amériques mais il y a eu un nombre croissant de cas de VZIK importés liés à des voyages dans des pays non-endémiques. Il a même été estimé que la population à risque d'infection par le VZIK s'élève à plus de deux milliards de personnes (Messina et al., 2016). Les souches ainsi que les isolats du VZIK ont évolué très rapidement. Les souches peuvent être regroupées en 2 lignées génétiques majeures : la lignée africaine et la lignée asiatique. Toutes les souches responsables des épidémies dans les Pacifiques puis dans les Amériques proviennent d'un ancêtre commun de la lignée asiatique (Figure 1-1).

1.2 Transmission du VZIK

Le VZIK est transmis aux humains principalement par piqûre de moustiques, mais d'autres modes de transmission ont également été observés.

1.2.1 Transmission vectorielle

Le virus Zika fait partie des Arbovirus (virus transmis par les arthropodes) et est transmis par des moustiques du genre *Aedes*. Il existe 2 cycles de transmission : le cycle sylvatique impliqué dans le maintien du VZIK entre des primates non-humains et les moustiques ; et un cycle urbain, impliqué dans la transmission du VZIK entre les hommes et les moustiques. Il est possible que ces deux cycles se croisent et que le virus soit transmis par des moustiques de primates non-humains à des humains lorsqu'ils se trouvent en proche proximité (Song et al., 2017).

Dans un cycle urbain, la transmission du VZIK se fait principalement par *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. Parmi ces deux espèces, *Aedes aegypti* est considéré comme le vecteur principal responsable des épidémies récentes. Bien que *Aedes albopictus* soit considéré comme le vecteur secondaire, il possède une grande capacité invasive et une large répartition géographique dans les régions tropicales et tempérées. Avec le réchauffement climatique, cette espèce pourrait devenir un important vecteur de transmission urbain à travers le monde puisqu'elle colonise les régions plus au nord, normalement plus froides.

Aujourd'hui, des populations d'*Aedes albopictus* ont été observé en Ontario au Canada, au Sud-ouest de l'Allemagne, sur la majorité du territoire Français et même au Sud de l'Angleterre (Giordano et al., 2019; Medlock et al., 2017; Pluskota et al., 2016). Cette espèce est d'ailleurs responsable de la transmission locale d'autres arbovirus responsable de nouvelles épidémies dans le Sud de l'Europe, comme le virus de la dengue et le virus du Chikungunya (VCHIK) (Martinet et al., 2019). Le 9 octobre 2019, les autorités françaises ont signalé pour la première fois en Europe, un cas d'infection locale par le VZIK dans le département du Var en France (WHO, 2019).

1.2.2 Transmission non-vectorielle

Contrairement à la majorité des *Flavivirus*, le VZIK peut être transmis directement d'humain à humain sans l'implication d'un vecteur arthropode. En effet, des cas de transmission sexuelles et périnatales ont été observées. Cette capacité pourrait notamment être due à sa très haute stabilité dans les fluides corporels ainsi qu'à son large tropisme tissulaire et cellulaire (Miner and Diamond, 2017) (section 1.3).

La présence d'une grande charge virale dans le sperme et les sécrétions vaginales de patients infectés par le VZIK a suggéré une possible transmission sexuelle de ce dernier (Atkinson et al., 2016). Depuis, de nombreux cas de transmission sexuelle du VZIK ont été confirmés (Hills et al., 2016). Des études chez les animaux ont montré que les muqueuses rectales et vaginales sont sensibles à l'infection et les testicules servent de réservoir pour le virus (Tang et al., 2016b). La transmission de l'homme à la femme se produit plus fréquemment qu'une transmission de la femme à l'homme ou de l'homme à l'homme (Musso et al., 2015a). Le VZIK est également détecté dans les urines et la salive ce qui pourrait aussi faciliter la transmission (Gourinat et al.; Musso et al., 2015b).

Le VZIK peut aussi être transmis de la mère à son fœtus pendant la grossesse, particulièrement durant le premier trimestre de gestation (Tabata et al., 2018). De l'ARN viral (ARNv) est retrouvé dans le liquide amniotique, l'urine et le sérum des mères dont les fœtus montraient des défauts de formation du cerveau mais également dans les cerveaux, les placentas et les sérums des nouveau-nés atteints de microcéphalie ou avortés (Brasil et al., 2016).

De plus, la présence d'ARNv et de particules virales dans le lait maternel suggère un risque potentiel de transmission de la mère à l'enfant via l'allaitement, bien qu'à ce jour aucun cas n'a été rapporté (Dupont-Rouzeyrol et al., 2016; Mann et al., 2018). Tout comme d'autres arbovirus, le VZIK présente un risque de transmission par transfusion sanguine notamment en raison d'une

virémie asymptomatique et d'une incidence élevée de cas dans la population générale pendant les épidémies (Beau et al., 2019).

1.3 Présentations cliniques et tropisme

L'infection par le VZIK peut produire une grande variété de symptômes cliniques chez l'humain. Bien que l'infection soit majoritairement asymptomatique, le virus peut causer des complications neurologiques graves tel que le syndrome de Guillain-Barré ou encore les microcéphalies congénitales.

La multitude de symptômes possibles induits par le VZIK est due à sa capacité d'infecter un grand nombre de types cellulaires différents. De plus, il infecte également un grand nombre de cellules chez les moustiques. En effet, le moustique femelle contracte le VZIK au cours d'un repas sanguin à partir d'une personne infectée. Le virus infecte ensuite les cellules de l'intestin du moustique, s'y réplique et se propage à d'autres tissus. C'est lorsque le virus se retrouve dans les cellules des glandes salivaires du moustique et qu'il pique un individu que le virus se transmet chez l'humain (Franz et al., 2015).

1.3.1 Symptômes et tropisme « classique »

Lorsque des symptômes surviennent, dans 20 à 25% des infections, ils apparaissent environ 4 à 10 jours après l'inoculation du virus. Les symptômes courants ne sont pas spécifiques et ressemblent à ceux d'un syndrome pseudo-grippal, comprenant de la fièvre passagère de faible intensité, une éruption cutanée, une arthrite ou une arthralgie et une conjonctivite non purulente. Il peut aussi y avoir, à une fréquence moindre, des douleurs rétro-orbitales, des maux de tête, des myalgies, des œdèmes et des vomissements. Les symptômes apparaissent généralement avec la virémie et disparaissent spontanément en une semaine, mais les arthralgies peuvent persister jusqu'à un mois (Song et al., 2017). Ces symptômes sont partagés avec ceux d'autres infections par des arbovirus qui se retrouvent généralement dans les mêmes zones géographiques, ce qui rend le diagnostic difficile.

Les premières cellules humaines infectées par le virus ainsi que les cibles principales de l'infection sont les fibroblastes du derme, les kératinocytes épidermiques, les macrophages des tissus et les cellules dendritiques immatures (Hamel et al., 2015). Les cellules dendritiques et les macrophages transportent les virus dans les ganglions lymphatiques dans lesquels ils sont amplifiés et se diffusent ensuite dans le sang, les tissus périphériques et les organes viscéraux

et génitaux (Tang et al., 2016b). Le VZIK peut infecter les tissus oculaires, notamment la cornée, la rétine neurosensorielle et le nerf optique (Miner et al., 2016).

Les cellules des appareils reproducteurs mâles et femelles sont également permissives. Le VZIK se retrouve dans les cellules de Sertoli, les cellules de Leydig, les spermatogonies, les spermatozoïdes, les cellules de l'épithélium vaginal et les fibroblastes utérins (Govero et al., 2016; Tang et al., 2016b)

1.3.2 Syndrome de Guillain-Barré et neurotropisme chez l'adulte

En outre, l'infection par le VZIK peut entraîner l'apparition du syndrome de Guillain-Barré (SGB). Cette maladie auto-immune peut entraîner différents symptômes tel que des picotements, une faiblesse musculaire, une paralysie et parfois un décès.

Le SGB est généralement considéré comme une neuropathie post-exposition à médiation immunitaire. Il se développe généralement jusqu'à 4 semaines après une infection ou tout autre stimulus, conduisant à une réponse immunitaire accrue et à un mimétisme moléculaire entre un agent incitativ et des antigènes nerveux. Les cibles sont donc les nerfs et principalement leur gaine de myéline (Nascimento and da Silva, 2017).

Cette complication neuromusculaire a déjà été associée à des infections par d'autres arbovirus, comme le VDEN et le VCHIK (Agarwal et al., 2017; Simon et al., 2016). L'association temporelle et géographique du VZIK avec le SGB a été initialement observée lors de l'épidémie de 2013-2014 en Polynésie Française puis a été confirmée lors de l'expansion dans les Amériques (Muñoz et al., 2017; Musso et al., 2014; Song et al., 2017). Une grande majorité des patients atteints du SGB présentait des Immunoglobulines M (IgM) spécifiques au VZIK dans leur sérum et dans leur liquide céphalo-rachidien (Cao-Lormeau et al., 2016). Bien que davantage d'études soient nécessaires, il est fort probable que l'immunopathologie soit médiée par les lymphocytes B ou T en raison du mimétisme de l'antigène viral ou des dommages directs de l'infection virale envers les cellules du système nerveux périphérique. En effet, il a été montré qu'il existe plusieurs peptides similaires entre la polyprotéine du VZIK et des protéines humaines liées à la myéline, à la (dé) myélinisation et / ou aux neuropathies axonales (Lucchese and Kanduc, 2016).

Des études, chez les souris, montrent que le VZIK peut infecter les cellules neurales progénitrices (CNP) présentes dans les niches des cellules souches chez l'adulte (niche de la zone sous-ventriculaire du cerveau antérieur et niche de la zone sous-granulaire de l'hippocampe).

L'infection entraîne une augmentation de la mort de ces cellules ainsi qu'une diminution de leur prolifération (Li et al., 2016a).

Le VZIK peut également infecter les neurones matures du cerveau adulte. Les astrocytes et les cellules productrices de myéline comme les oligodendrocytes dans le système nerveux central (SNC) ou les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique sont également des cibles potentielles du VZIK chez l'adulte. L'infection de ces dernières peut entraîner des défauts de synthèse de la myéline et une prédisposition aux complications neurologiques centrales et périphériques telles que le SGB (Shaily and Upadhya, 2019).

1.3.3 Microcéphalie et neurotropisme chez le fœtus

La caractéristique la plus alarmante de l'infection par le VZIK est sa capacité de provoquer ce qu'on appelle aujourd'hui le syndrome congénital du virus Zika (Congenital Zika Syndrome ou CZS).

Lors de la grossesse, principalement durant le premier trimestre, le VZIK est capable de passer la barrière placentaire et d'infecter les cellules du cerveau du fœtus. Le VZIK passe de la mère au fœtus en infectant les cellules du placenta comme les cellules de Hofbauer (macrophages placentaires), les trophoblastes et les cellules endothéliales (Tabata et al., 2018).

Les phénotypes cliniques du CZS les plus alarmants sont la mort fœtale et la microcéphalie. Des calcifications cérébrales, des pertes auditives, des anomalies oculaires et de l'arthrogrypose (contractures articulaires) ont aussi été observées. Les cas de microcéphalie sévère sont associés à un retard mental et des troubles d'apprentissages, des anomalies comportementales, une faiblesse musculaire et une altération du tonus musculaire, indiquant la nécessité d'un soutien à long terme (Moura da Silva et al., 2016). De plus, une étude récente a montré que des enfants de moins de 18 mois ayant été exposés au VZIK *in utero* mais ne montrant pas de CZS, montrent tout de même des défauts neurodéveloppementaux. Ceci suggère que ces défauts peuvent se manifester avec l'âge et qu'une surveillance neurodéveloppementale à long terme de tous les nouveau-nés exposés au VZIK devrait être effectuée (Mulkey et al., 2020).

La transmission verticale ainsi que l'implication du VZIK dans les syndromes congénitaux font de lui un nouveau membre des pathogènes TORCH. L'acronyme TORCH regroupe les agents pathogènes responsables d'infections congénitales : *Toxoplasma gondii*, autres (incluant *Treponema pallidum* responsable de la syphilis, le virus de la varicelle ou encore le VZIK), le virus de la rubéole, le cytomegalovirus (CMV), et les virus Herpes Simplex (VHS) (Li et al., 2016b).

Une fois passé chez le fœtus via l'infection des cellules du placenta, le VZIK infecte principalement les CNP et les astrocytes fœtaux, deux types cellulaires essentiels au bon développement du SNC (Huang et al., 2018; Li et al., 2016a). Celles-ci sont hautement permissives au virus.

L'infection des CNP entraîne une altération de leur différenciation, de leur prolifération en plus d'augmenter leur mort par apoptose (Li et al., 2016a; Tang et al., 2016a). Plusieurs voies de signalisations importantes à ces mécanismes sont perturbées par le VZIK tel que la voie Akt-mTOR, essentielle à la différenciation des CNP ou encore la voie p53, impliquée dans la régulation du renouvellement et de la différenciation des CNP (Ghouzzi et al., 2016; Liang et al., 2016).

Les cellules gliales et leurs précurseurs sont aussi susceptibles à l'infection par le VZIK. Par exemple, les astrocytes fœtaux humains semblent être les premières cellules du SNC à être infectées par le VZIK, ce sont aussi les cellules les plus abondantes du tissu cérébral (Hamel et al., 2017). Ces cellules sont indispensables au maintien de la barrière hémato-encéphalique, la myélinisation, la réparation et l'inflammation du SNC, le développement et la migration des neurones, le support essentiel des axones en croissance et la modulation des neurotransmetteurs (Khakh and Sofroniew, 2015). Il semblerait que l'infection des cellules gliales et de leurs progéniteurs provoque leur activation, ce qui entraîne notamment une astrogliose. Ce mécanisme entraîne la destruction des neurones avoisinants (Li et al., 2018). Il semblerait que la même chose se produit lors de l'infection des astrocytes chez l'adulte (Smith et al., 2017).

1.3.4 Facilitation de l'infection par des anticorps

Bien qu'il ait été démontré que les anticorps sont importants pour la protection à long terme contre les infections par les *Flavivirus*, ils peuvent également faciliter l'infection par le phénomène de l'ADE (amélioration dépendante des anticorps : « antibody-dependent enhancement ») (Durbin, 2016).

Dans les zones endémiques du VZIK, les infections par d'autres *Flavivirus* comme par exemple les différentes souches du VDEN sont courantes et la population possède donc des anticorps contre ces virus. Ces anticorps sont souvent non-neutralisants et ont une réactivité croisée, c'est-à-dire qu'ils peuvent reconnaître plusieurs virus différents à cause de leur ressemblance antigénique. Ainsi, ils peuvent former des complexes VZIK/anticorps qui sont efficacement endocytés par les cellules qui possèdent des récepteurs Fcγ (monocytes, macrophages et

cellules dendritiques) ce qui conduit généralement à une phagocytose, entraînant une augmentation du nombre de cellules infectées (Taylor et al., 2015).

Certaines études supposent que les CZS et le SGB sont favorisés par le phénomène d'ADE. Par exemple, l'ADE entraîne une augmentation de la quantité de virus et donc une réponse immunitaire plus forte caractérisée par des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires pouvant favoriser le SGB. Le fait que la majorité des anticorps monoclonaux anti-VDEN reconnaît également le VZIK et que la majorité des patients atteints de SGB avait des preuves d'une infection antérieure au VDEN supportent cette hypothèse (Cao-Lormeau et al., 2016; Paul et al., 2016). Il est également suggéré que les anticorps maternels contre le VDEN peuvent contribuer à l'invasion placentaire du VZIK par transcytose médiée par le récepteur Fc néonatal. Ce récepteur contrôle le transport des IgG de la mère vers le fœtus. Une étude montre que des anticorps anti-VDEN renforcent l'infection de cellules du placenta par le VZIK *in vitro*, et ce via le récepteur Fc néonatal (Zimmerman et al., 2018). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

1.3.5 Perturbation des barrières biologiques

Les complications inquiétantes liées à l'infection par le VZIK sont dues à sa capacité de traverser les barrières biologiques tel que la barrière hémato-encéphalique, la barrière placentaire ou encore la barrière hémato-testiculaire (Alimonti et al., 2018; Siemann et al., 2017; Tabata et al., 2018). Le VZIK passe ces barrières notamment en infectant directement les cellules endothéliales (Mladinich et al., 2017; Tabata et al., 2018). Ces cellules forment une couche empêchant le passage des agents pathogènes et déclenchent des réponses inflammatoires et de coagulation lors de la reconnaissance de l'antigène (Khaiboullina et al., 2019).

Il a été montré *in vivo* et *in vitro* que l'infection des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique induit leur activation inflammatoire ce qui pourrait altérer leur fonction en perturbant les jonctions adhérentes. Ceci entraîne la perméabilisation de la barrière et permet l'entrée du VZIK dans le SNC (Leda et al., 2019).

En plus de l'infection des cellules endothéliales, le passage à travers le placenta est aussi facilité par l'infection même des trophoblastes et des cellules immunitaires comme les macrophages placentaires (Quicke et al., 2016; Tabata et al., 2018). Le passage du VZIK par le récepteur Fc néonatal mentionné plus tôt pourrait aussi être un mécanisme utilisé mais aucune preuve expérimentale ne supporte cette hypothèse.

La barrière hémato-testiculaire est composée des cellules de Sertoli qui protègent les cellules germinales en développement contre les attaques systémiques par les cellules immunitaires adaptatives tout en fournissant simultanément un soutien nutritionnel et structurel (Cheng and Mruk, 2012). L'infection directe des cellules de Sertoli par le VZIK compromet l'intégrité de cette barrière permettant l'évasion par le virus dans le système reproducteur mâle (Siemann et al., 2017).

Des études ont montré que deux protéines virales NS1 et NS2A seraient importantes pour ces mécanismes. En effet, NS1 du VZIK perturbe les glycosaminoglycanes et provoque la perméabilité du placenta humain en développement (Puerta-Guardo et al., 2020). Il faut savoir que NS1 des autres *Flavivirus* est responsable de la perméabilisation vasculaire en entraînant des dysfonctions endothéliales (Puerta-Guardo et al., 2019). NS2A du VZIK induit une dégradation des protéines des jonctions adhérentes des CNP ce qui entraîne des problèmes de formation de ces jonctions dans les cellules gliales radiales *in vivo* (Yoon et al., 2017).

1.4 Cycle de réplication virale

Semblable aux autres *Flavivirus*, le VZIK est composé d'une nucléocapside entourée d'une bicouche lipidique et mesure environ 40 à 50 nm de diamètre. La nucléocapside est composée d'une copie du génome viral (ARNv) recouvert de la protéine de capsid (C). La bicouche lipidique qui entoure la nucléocapside est dérivée de la cellule hôte et contient deux protéines virales : la protéine de membrane (M, un produit de clivage de prM) et la protéine d'enveloppe (E). La forme infectieuse du virion possède 180 copies des protéines E et M intégrées dans la membrane virale. Trois dimères de protéines E se trouvent parallèlement les uns aux autres et le virion possède 30 radeaux, soit 90 dimères (Sirohi et al., 2016).

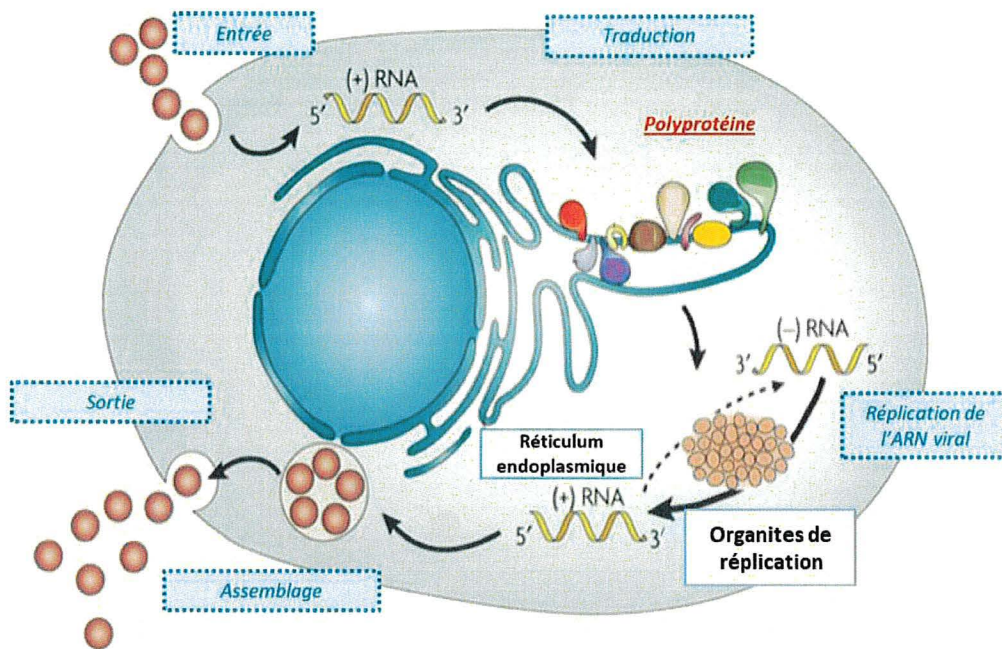


Figure 1-3 Cycle de réplication des *Flavivirus*

Le virus entre par endocytose dans la cellule puis relâche son génome dans le cytosol. L'ARNv est ensuite traduit en une unique polyprotéine directement au niveau du réticulum endoplasmique (RE). La polyprotéine va ensuite permettre l'expression des 10 protéines virales qui vont entraîner la formation des organites de réplication virale. C'est au sein de ces structures que l'ARNv est répliqué puis encapsidé. Le virion passe ensuite par la voie de sécrétion cellulaire pour sa maturation et sa sortie hors de la cellule (Modifié de Moradpour et al., 2007).

L'entrée dans la cellule hôte commence par l'attachement non spécifique entre le virion et les glycosaminoglycanes (GAG). Par la suite, la glycoprotéine d'enveloppe (E) interagit avec des récepteurs à la surface de la cellule cible permettant l'internalisation par endocytose clathrine-dépendante (Perera-Lecoin et al., 2013). Il existe plusieurs facteurs d'entrée et / ou d'adhésion identifiés dont DC-SIGN, AXL et Tyro3 (Hamel et al., 2015). Après internalisation, les endosomes précoces contenant les particules virales se transforment en endosomes tardifs accompagnés par l'acidification du pH. L'acidification induit des changements conformationnels des protéines E qui passent d'une formation de 90 dimères à 60 trimères ce qui permet la fusion entre la membrane du virion et celle de l'endosome libérant ainsi l'ARNv dans le cytoplasme (Shaily and Upadhy, 2019; Sirohi and Kuhn, 2017) (Figure 1-4).

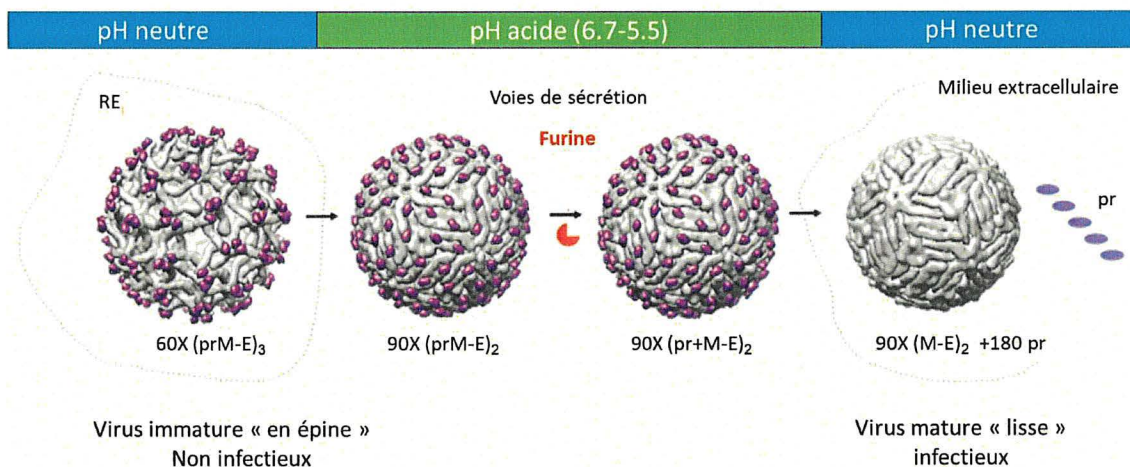


Figure 1-4 Maturation des particules virales des *Flavivirus*

Les changements conformationnels dans les glycoprotéines de surface virale sont dépendants du pH et du clivage protéolytique de prM par la Furine. Ils permettent la conversion du virus non infectieux, immature, « en épine » avec les protéines E en conformation à 60 trimères, en virus infectieux, mature, « lisse » avec les protéines E en conformation à 90 dimères (Sirohi and Kuhn, 2017).

Le génome viral est sous forme d'un unique brin d'ARN de polarité positive de 10 807 nucléotides. Il comprend un seul cadre de lecture ouvert de 10 272 nucléotides flanqué de régions non traduites hautement structurées en 5'et 3' (Yun et al., 2016). Ces régions sont extrêmement importantes notamment pour la cyclisation de l'ARNv, une étape essentielle pour la génération de l'antigénome (Villordo et al., 2015). Le cadre de lecture ouvert code pour une grande polyprotéine transmembranaire de 3 423 acides aminés qui est traduite directement au niveau du réticulum endoplasmique (RE) après le relâchement de l'ARNv dans le cytosol. La traduction est initiée par la présence d'une coiffe à l'extrémité 5' du génome (« Cap » sur Figure 1-5) (Mazeaud et al., 2018; Song et al., 2017).

La polyprotéine est insérée dans la membrane du RE puis clivée par des protéases virales et cellulaires pour produire 10 protéines individuelles matures (Figure 1-5). Parmi celles-ci, 3 sont des protéines structurales (C, prM et E) qui sont impliquées dans l'assemblage des virus. Les 7 autres sont des protéines non-structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) et participent à la réplication de l'ARNv. Elles sont toutes indispensables à la synthèse des ARNv et seuls NS3 et NS5 possèdent des activités enzymatiques (Bollati et al., 2010).

La protéine NS3 est une protéine multifonctionnelle qui contient deux domaines : un domaine protéase à l'extrémité N-terminale et un domaine C-terminal contenant les activités nucléotide-

triphosphatase (NTPase), ARN-triphosphatase (RTPase) ainsi que de l'activité d'ARN hélicase. La RTPase fait partie des enzymes responsables de la synthèse de la coiffe en clivant la liaison β , γ -triphosphate à l'extrémité 5' de l'ARN. La NTPase permet d'hydrolyser les nucléotides pour fournir de l'énergie nécessaire à l'activité ARN-hélicase responsable du déroulement de l'ARN double brin (ARNdb) en perturbant les liaisons hydrogènes qui maintiennent les deux brins ensemble. Ainsi, lorsque NS3 est associée à son cofacteur NS2B (complexe appelé NS2B3), elle agit comme la protéase à sérine virale. Elle permet la génération des protéines matures individuelles à partir de la polyprotéine en clivant les motifs exposés du côté cytoplasmique du RE tandis que des protéases cellulaires clivent les liaisons situées dans la lumière du RE comme une signal peptidase (Neufeldt et al., 2018; Phoo et al., 2016) (Figure 1-5).

La protéine NS5 est responsable de la synthèse et de l'amplification du génome avec, en C-terminal, un domaine codant pour une polymérase à ARN dépendante de l'ARN. La polymérase génère un brin négatif complémentaire, qui est utilisé comme matrice pour générer plusieurs copies d'ARN génomique. NS5 est aussi en partie responsable de la formation de la coiffe grâce à ces domaines méthyltransférase (MTase) et guanylyltransférase (GTase) en N-terminal (Neufeldt et al., 2018; Zhang et al., 2017a).

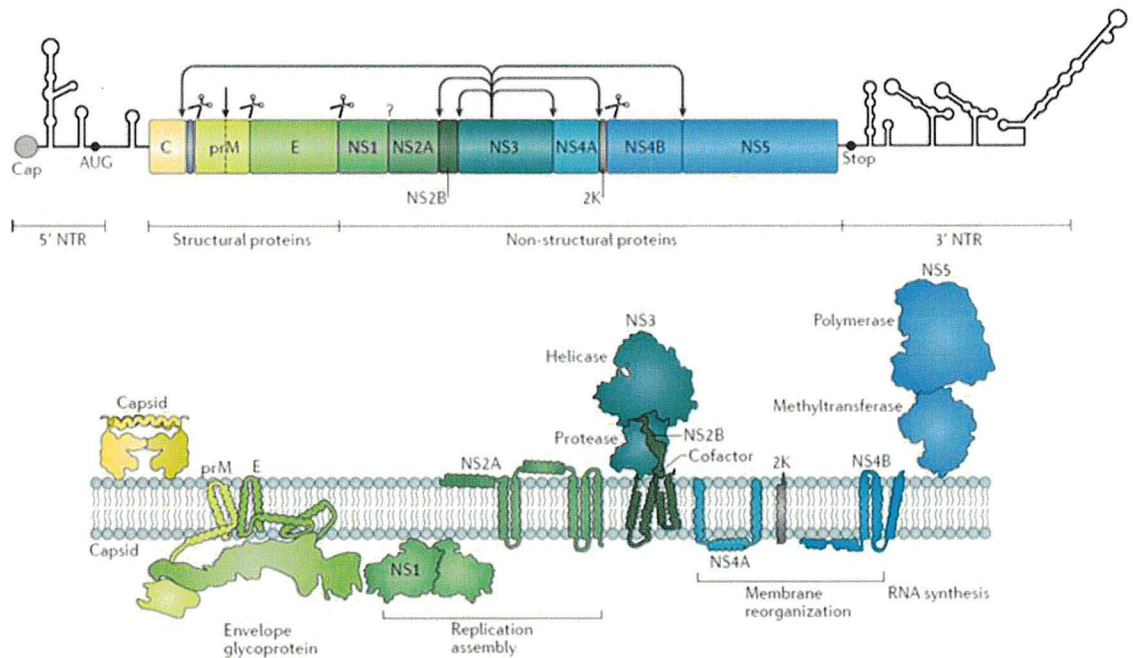


Figure 1-5 Représentation schématique de l'ARNv et de la topologie membranaire des protéines virales matures des *Flavivirus*.

La première figure représente l'ARNv des *Flavivirus*. Le cadre de lecture est représenté en couleur. Les ciseaux représentent les sites de clivages de la polyprotéine par les peptidases cellulaires et les flèches par la protéase virale NS2B3. La petite flèche au niveau de prM représente le site de clivage par la furine dans l'appareil de Golgi. La deuxième figure représente la topologie membranaire des protéines dans la membrane de RE après maturation de la polyprotéine (Neufeldt et al., 2018).

Les ARNv nouvellement synthétisés ont plusieurs destins. Ils peuvent se faire traduire en polyprotéine et ainsi produire davantage de protéines virales. Ils peuvent également être utilisés comme des brins matrices pour un nouveau cycle de réplication par NS5. Finalement ils peuvent servir de génomes lors de leur incorporation dans les nouveaux virions au moment de l'assemblage (Mazeaud et al., 2018).

L'assemblage des virions est également initié à la membrane de RE lorsque l'ARNv nouvellement synthétisé s'associe aux protéines de Capside (C) et bourgeonne au niveau des membranes du RE, riches en protéine E et prM, pour former des virions immatures (forme où l'on retrouve 60 trimères de protéine E et où le virion montre une surface en « épine ») (Figure 1-4). Ces derniers passent ensuite par les voies de sécrétions cellulaires ou ils subissent leur maturation avant leur sortie dans le milieu extracellulaire. La maturation se fait au niveau du réseau trans-golgien où la protéine prM est clivée par une furine cellulaire (Figure 1-5 et Figure 1-5). Après le clivage, le peptide pr reste étroitement lié à la protéine E empêchant cette dernière de fusionner avec les

membranes du Golgi (pH acide). Le peptide se dissocie lorsque le virion est libéré dans le milieu extracellulaire de pH neutre, c'est à ce moment-là que le virion devient mature et infectieux par le réarrangement des protéines E en 90 dimères (Sirohi and Kuhn, 2017) (Figure 1-4).

1.5 Organites de réplication virale

Une caractéristique partagée parmi les virus et tout particulièrement les virus possédant un génome à ARNs^{b+} est l'induction de compartiments membranaires spécialisés formant des structures ressemblant à des organites définis comme « organites de réplication virale » (OR) appelés aussi « usines de réplication virale ». Chez les *Flavivirus*, ces structures sont dérivées des membranes du RE. Bien qu'elles comportent quelques différences, leur architecture et propriétés semblent conservées (Figure 1-6).

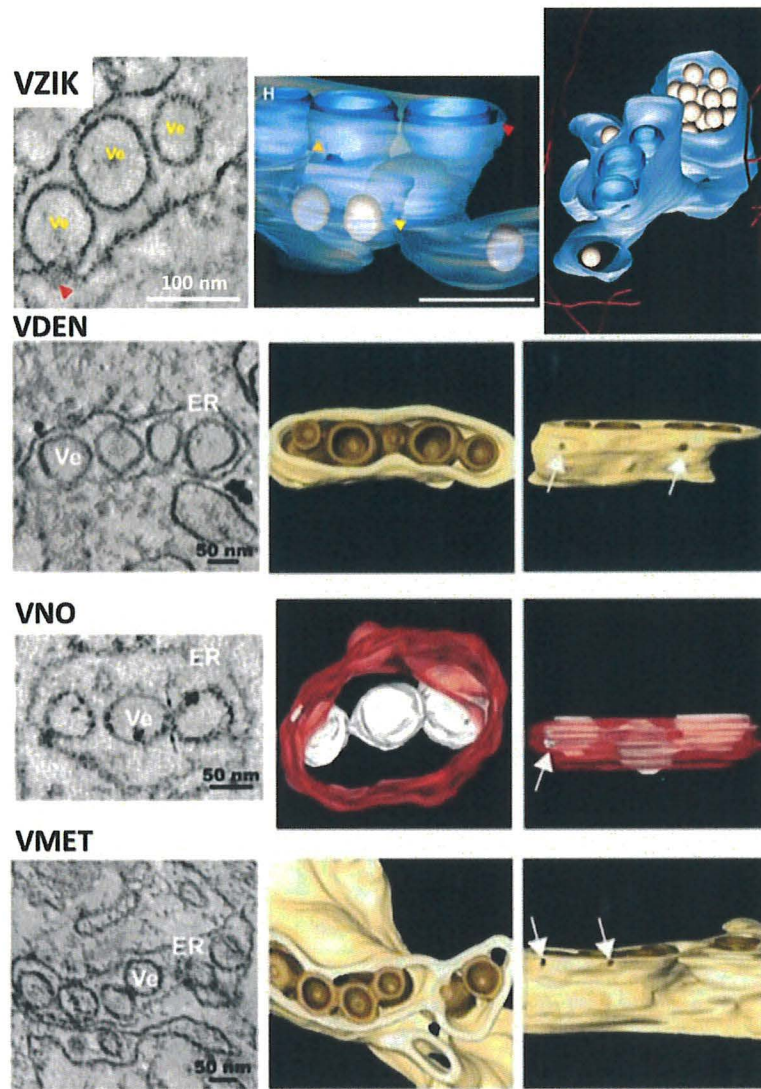


Figure 1-6 Réarrangements membranaires induits par différents membres des *Flavivirus*

Images de microscopie électronique à transmission (à gauche) et reconstitutions 3D par tomographie électronique (à droite) des OR induit par le virus Zika, le virus de la Dengue, le virus du Nil occidental et le virus de la méningo-encéphalite à tiques. Les vésicules de réplication (Ve) correspondent à des invaginations de membranes du RE qui restent connectées au cytosol via des pores (mis en évidence avec des flèches), formant des paquets vésiculaires (PV). Pour le virus Zika, le RE est représenté en bleu, les OR en bleu foncé et les particules virales en doré. Pour les virus de la Dengue et de la méningo-encéphalite à tiques, le RE est représenté en jaune et les OR en marron. Pour le virus du Nil occidental le RE est en rouge et les OR en blanc. Les flèches montrent des pores. Ve : vésicule. ER : réticulum endoplasmique. (Cortese et al., 2017 ; Gillespie et al., 2010 ; Miorin et al., 2013 ; Romero-Brey and Bartenschlager, 2014 ; Welsch et al., 2009)

Les OR des *Flavivirus* sont composés des paquets vésiculaires (PV), des convolutions de membrane (CM) et des sacs de virus (SV) qui sont morphologiquement différents mais peuvent être trouvés dans le même réseau de RE (Figure 1-7). Peu d'informations concernant les OR du VZIK ne sont connues mais ces 3 structures ont été observées lors de l'infection par ce dernier et leurs architectures ressemblent très fortement à celle des OR induit par le VDEN (Cortese et al., 2017). Ainsi, la plupart des connaissances que nous avons sur les OR proviennent majoritairement du VDEN et devront donc être confirmées chez le VZIK.

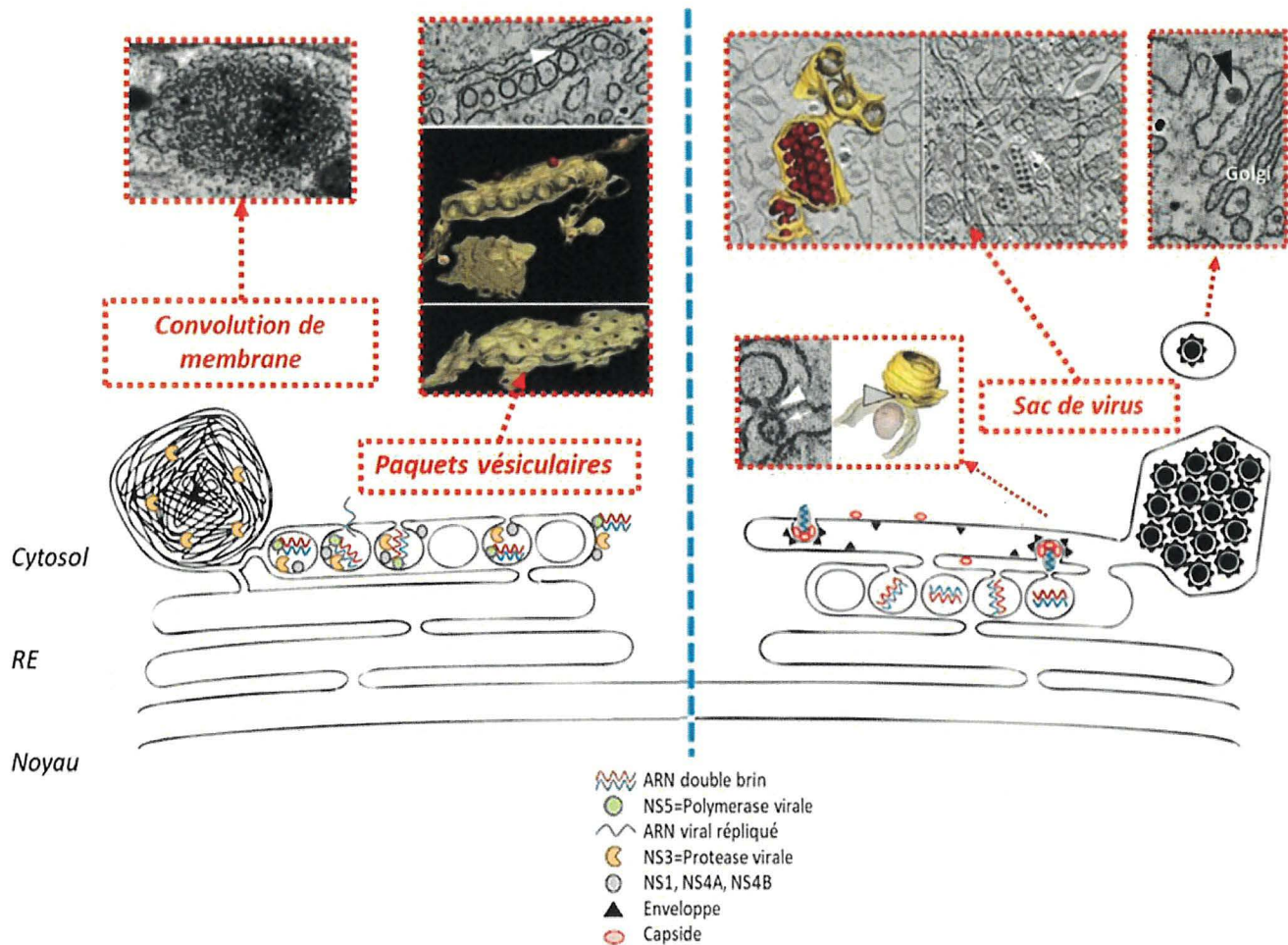


Figure 1-7 Organites de réplication virale du VDEN

Représentation schématique des paquets vésiculaires (PV), des convolutions de membranes (CM) et des sacs de virus (SV) dérivés du RE induits par le VDEN. On observe les structures impliquées dans les étapes de réplication à gauche et celles impliquées dans les étapes d'assemblage et de sortie à droite. Des images de microscopie électronique à transmission et des reconstructions 3D à partir de tomographie électronique correspondantes (pour les PV et les SV) sont également présentées. Trois populations de virions sont observées (à droite) : des virus en bourgeonnement à côté des pores des PV (les structures denses détectées correspondent vraisemblablement à l'ARN); les virus s'accumulant dans la lumière du même réseau de RE que les PV et les virus dans les vésicules associées au Golgi. Les flèches indiquent des pores. (Chatel-Chaix and Bartenschlager, 2014; Welsch et al., 2009).

1.5.1 Paquets vésiculaires

Les paquets vésiculaires sont des vésicules sphériques alignées induites par invagination du RE. Cette morphologie est conservée entre les cellules de mammifères et les cellules de moustiques suggérant que leur biogenèse repose sur des mécanismes conservés au cours de l'évolution (Junjhon et al., 2014; Welsch et al., 2009).

Dans les cellules de mammifères, leur diamètre est d'environ 90 nm et ils sont chacun connectés au cytosol par un pore d'environ 10 nm permettant probablement des échanges de métabolites. Contrairement au VNO et au VMET, le VZIK et le VDEN ne semblent pas avoir de pores reliant les PV entre eux (Figure 1-6). Ces structures sont suspectées d'être le site de réplication du génome viral. En effet, chez le VDEN, les PV contiennent de l'ARNdb qui est l'intermédiaire de la réplication du génome. Ils contiennent aussi des protéines virales non-structurales indispensables à la réplication telles que NS1, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5 (Gillespie et al., 2010; Welsch et al., 2009) (Figure 1-7).

Plusieurs hypothèses existent concernant le rôle des PV, et une combinaison de ces hypothèses est également possible. Les PV pourraient être des structures mises en place par ces virus pour permettre un environnement favorable à la synthèse de l'ARNv. D'une part, ils pourraient jouer un rôle dans la protection de l'ARNv contre la dégradation par des nucléases ou des senseurs cellulaires cytosoliques qui reconnaissent l'ARN, permettant ainsi d'atténuer l'activation des voies de l'immunité innée antivirale. D'autre part, les PV pourraient permettre la concentration de métabolites, de facteurs cellulaires et de facteurs viraux nécessaires à une synthèse efficace des ARNv. Finalement, bien que cela reste à valider expérimentalement, ces structures pourraient aussi permettre une coordination spatio-temporelle des différentes étapes du cycle de réplication virale. L'observation fréquente de bourgeonnements de virus, proches des PV, alignés avec les pores et composés d'une structure dense aux électrons (correspondant sûrement à l'ARNv) supporte cette hypothèse (Figure 1-7). En effet, ceci suggère que les génomes répliqués seraient libérés des PV par le pore pour être utilisés directement pour l'assemblage de la nucléocapside et l'empaquetage dans les virions. Cette relation spatiale étroite entre les sites de réplication et d'assemblage pourrait contribuer à la sélectivité de l'encapsidation de l'ARNv. Ainsi, les PV pourrait servir de compartimentalisation des différentes étapes telles que la réplication de l'ARN et son l'encapsidation (Chatel-Chaix and Bartenschlager, 2014; Paul and Bartenschlager, 2013; Welsch et al., 2009).

1.5.2 Sac de virus

Les sacs de virus sont des citernes relâchées du RE à proximité des PV où l'on observe une accumulation de particules virales rangées de façon ordonnée (Figure 1-7). Chacune d'entre elles est composée d'un noyau central dense aux électrons et d'une surface en épine ressemblant aux protéines E, suggérant fortement que les particules sont des virions enveloppés sous forme immature (dû au pH neutre du lumen du RE) (Figure 1-4). Les SV sont suspectés d'être des sites de stockage pour les virions nouvellement assemblés avant leur sortie de la cellule (Sirohi and Kuhn, 2017; Welsch et al., 2009). Les SV ainsi que les PV ont été observés dans des CNP infectées par le VZIK (Cortese et al., 2017).

1.5.3 Convolutions de membrane

Les CM sont de grandes structures denses formées par l'accumulation de membranes de RE lisses. Elles sont souvent retrouvées en continuité avec les PV, formant un seul réseau endomembranaire (Welsch et al., 2009). Dans le cas du VDEN, elles ne contiennent pas d'ARNdb mais sont enrichies en protéines non-structurale comme NS2B, NS3, NS4A et NS4B (Chatel-Chaix et al., 2016; Junjhon et al., 2014; Miller et al., 2007; Welsch et al., 2009) (Figure 1-7). Leurs fonctions spécifiques ne sont toujours pas connues. Fait intéressant, les CM ne sont pas observées dans les cellules de moustiques infectées par le VDEN alors que les PV et les SV le sont (Junjhon et al., 2014). Ceci suggère un rôle spécifique dans les cellules de mammifères.

Il existe plusieurs hypothèses concernant les fonctions des CM, basées sur des observations faites lors de l'infection par le VDEN. L'enrichissement de la protéase virale (NS3 et son co-facteur NS2B) dans les CM laisse suggérer un rôle de cette structure dans la maturation de la polyprotéine (Welsch et al., 2009). Cependant ceci reste à confirmer expérimentalement.

Les CM pourraient aussi servir de lieu de stockage de protéines et de lipides nécessaires pour la réplication et l'assemblage. La présence de NS2B3 ainsi que la proximité des CM et des PV supportent cette hypothèse. De même, les CM semblent avoir une composition en lipides particulière, avec la présence notamment d'une grande quantité de cholestérol (Mackenzie et al., 2007). Il faut noter que plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse du cholestérol ne sont pas exprimées dans les cellules d'insectes qui sont incapables de produire du cholestérol par elles-mêmes. Ceci pourrait expliquer l'absence de CM du VDEN dans les cellules de moustiques (Junjhon et al., 2014). De plus, la protéine NS3 du VDEN recrute la synthase d'acide gras (FASN) présumément dans les OR pour stimuler la biosynthèse des lipides nécessaires à la réplication (Heaton et al., 2010).

Les CM pourraient jouer un rôle dans l'atténuation de processus cellulaires non favorables à la réplication virale comme des voies de l'immunité innée. En effet, les CM se trouvent à proximité des mitochondries allongées induites lors de l'infection par le VDEN et le VZIK (Chatel-Chaix et al., 2016 et WF et LCC, données non publiées). Le modèle déduit lors de l'étude chez le VDEN suggère que la formation des CM perturbe les membranes issues du RE associées aux mitochondries (MAMs) (Chatel-Chaix et al., 2016). Les MAMs sont une interface importante pour la signalisation de l'immunité innée car elles servent de plateforme pour la signalisation dépendante de MAVS. Lors d'une infection par un virus à ARN, le senseur RIG-I reconnaît l'ARNv et va se lier à MAVs au niveau des MAMs pour enclencher une réponse à l'interféron (IFN) et ainsi diminuer la réplication virale (Horner et al., 2011). Les CM sont suspectés être en partie issues des MAMs. Cette structure permettrait donc d'atténuer leurs fonctions antivirales et faciliterait la réplication (Chatel-Chaix et al., 2016). Il se pourrait également que les CM modulent d'autres fonctions associées aux MAMs importantes pour le virus tel que l'autophagie, la synthèse et transport des lipides, les fonctions mitochondriales, la régulation de l'homéostasie calcique ou encore l'apoptose (Patergnani et al., 2015).

Une autre hypothèse est que les CM seraient des structures induites pour séquestrer des senseurs cellulaires qui reconnaissent des motifs moléculaires associés à des pathogènes (PRR) ou des protéines impliquées dans les voies de signalisation de l'immunité. Par exemple, la protéine STING se retrouve dans les CM lors de l'infection par le VDEN (Sun et al., 2009 et Chatel-Chaix et Bartenschlager non-publié) et est clivée par la protéase NS2B3, aussi enrichie dans les CM (Yu et al., 2012). STING est un adaptateur de signalisation de voie de l'immunité qui est associé aux MAMs et interagit avec RIG-I et cGAS (Ishikawa and Barber, 2008; Ishikawa et al., 2009). cGAS est d'ailleurs aussi un PRR ciblé à la dégradation par NS2B3. En effet, le senseur est dirigé vers la dégradation lysosomale par NS2B3 pour empêcher la détection d'ADN mitochondrial et ainsi inhiber l'activation des voies de signalisation immunitaire associées (Aguirre et al., 2017).

Finalement d'autres processus cellulaires perturbant la réplication du virus pourraient être modulés par les CM lors de l'infection, tels que les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire ou encore d'induction de la mort cellulaire.

Alors que la morphologie et l'architecture des organites de réplication virale des *Flavivirus* sont relativement bien définies, les mécanismes moléculaires régissant leur biogenèse sont très peu connus. Étant donné que ces structures sont indispensables à la réplication du VZIK, il est

indispensable de mieux comprendre leurs rôles ainsi que les déterminants responsables de leurs mises en place et de leur stabilité.

1.6 Traitements

Plusieurs caractéristiques du VZIK font de lui un danger de santé publique. Premièrement, son émergence récente fait qu'une grande partie de la population dans les zones où le virus n'est pas endémique ne possède pas d'immunité ciblée contre le virus. De plus, un grand nombre de personnes est susceptible d'être infecté notamment à cause de la large distribution des moustiques *Aedes* ainsi qu'aux modes de transmission indépendants du vecteur. Finalement les risques de complications neurologiques à long terme induites par l'infection font qu'il est urgent de développer des thérapies antivirales efficaces pour aider à contrôler les épidémies du VZIK à l'avenir.

À l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement ou vaccin spécifique approuvé contre le VZIK. Les principales stratégies de lutte contre l'infection sont ciblées sur la lutte antivectorielle et la prévention de la transmission du VZIK. Les traitements administrés sont généralement limités au soulagement des symptômes (Loe et al., 2019). Cependant beaucoup de recherches sont faites pour trouver un vaccin ou des thérapies antivirales.

1.6.1 Développement de vaccins

En mars 2016, l'OMS a signalé 18 programmes de vaccination contre le VZIK, et ce nombre a probablement augmenté depuis. Une grande variété de formules sont à l'étude ; parmi celles testées figurent des vaccins à virus vivants atténués, des vaccins inactivés, des vaccins à virus entiers, des vaccins à sous-unités, des vaccins à ADN, à ARNm, à vecteurs viraux et à base de peptides (Poland et al., 2019).

Le vaccin candidat le plus avancé est le VRC-ZKADNA090-00-VP, un vaccin à base d'ADN plasmidique codant pour les protéines prM et E de la souche de Polynésie Française (H/PF/2013). Il est actuellement en essai clinique de phase 2 chez des adultes âgés de 18 à 35 ans (Gaudinski et al., 2018; Poland et al., 2019).

Cependant le développement d'un vaccin est confronté à plusieurs contraintes : l'absence d'une corrélation de protection établie (chez les enfants, les adultes et le fœtus), l'imprévisibilité actuelle des épidémies, le grand nombre d'infections subcliniques, la variabilité marquée des manifestations cliniques au cours des symptômes de la maladie, la nécessité de tester plusieurs

populations vulnérables, le phénomène d'ADE comprenant les effets incertains d'une immunité antérieure au VZIK ou à d'autres *Flavivirus* (comme le VDEN) et le manque de modèles animaux qui reproduisent les caractéristiques importantes de la maladie chez l'homme (Poland et al., 2019).

Le manque de compréhension du phénomène d'ADE est une des grandes inquiétudes concernant le développement d'un vaccin contre le VZIK. En effet, dans une étude de suivi des essais cliniques de phase III du vaccin vivant atténué tétravalent contre le VDEN Dengvaxia (CYD-TDV), il a été observé que trois ans après son administration, le risque d'hospitalisation pour une infection par le VDEN chez les enfants de moins de neuf ans était augmenté. L'ADE serait responsable de cela (section 1.3.4). Des observations montrent que des anticorps anti-VDEN non-neutralisants préexistants sont des facteurs de risque importants de développement de maladies sévères liées au VDEN. Lors de ces mêmes essais cliniques, des cas de mort infantile dans les Philippines ont été associés à la séronégativité des individus (Aguiar et al., 2017; Capeding et al., 2014; Halstead, 2018). Ainsi, la co-circulation et la proximité antigénique entre les *Flavivirus* en plus du danger de l'administration du vaccin chez les individus séronégatifs rendent l'approche vaccinale risquée. Ceci pourrait compliquer le développement d'un vaccin contre le VZIK et c'est pour cela que d'autres alternatives de traitements doivent être étudiées.

1.6.2 Développement de thérapies antivirales

Outre les vaccins, les thérapies antivirales peuvent aussi être des moyens efficaces pour prévenir ou soigner les infections par le VZIK. Au cours des dernières années, diverses stratégies ont été mises en œuvre pour identifier des composés susceptibles de cibler des protéines virales ou des protéines de l'hôte. Parmi celles-ci le criblage des médicaments et des composés d'essai clinique approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis pour le traitement d'autres maladies (Barrows et al., 2016).

De nombreux composés inhibant la réplication virale du VZIK *in vitro* ont été identifiés (Barrows et al., 2016). Parmi ceux-ci certains ciblent des protéines virales comme NS5. En effet, la polymérase virale est une cible intéressante car elle est indispensable à la réplication et elle peut être inhibée de plusieurs manières. Le sofosbuvir par exemple, est un analogue de nucléotide et est d'ailleurs approuvé pour le traitement contre le VHC, un autre *Flaviviridae* (Asselah, 2014; Sacramento et al., 2017). Les composés se liant au site actif du domaine polymérase de NS5 tels que l'émétine et le TPB, semblent également être prometteurs (Pattnaik et al., 2018; Yang et al., 2018). Des inhibiteurs de la protéase NS2B3 tels que le NSC157058 ont aussi été découverts

(Shiryaev et al., 2017). D'autres composés peuvent affecter les étapes du cycle de réplication dépendantes du pH tels que saliphénylhalamide et l'obatoclax (Kuivanen et al., 2017). Cependant, bien que plusieurs de ces composés soient prometteurs, aucun n'a atteint le stade d'essai clinique dans le contexte d'infection par le VZIK.

Une autre cible prometteuse pour des thérapies anti-VZIK est la protéine NS4B. En effet, une étude a découvert des inhibiteurs efficaces contre le VDEN où la protéine NS4B, protéine très conservée parmi les membres des *Flavivirus*, était la cible. La molécule la plus prometteuses était un composé de spiropyrazolopyridone qui inhibe fortement le VDEN-2 et le VDEN-3 *in vitro* et *in vivo* (Wang et al., 2015).

Le ciblage de facteurs de l'hôte indispensable à la réplication des virus peut également être prometteur. En plus, des thérapies antivirales à large spectre pourraient être développées avec cette méthode. Cependant les mécanismes de relation hôte-virus doivent être étudiés en profondeur.

1.7 Manipulation de la mort cellulaire par les *Flavivirus*

Lorsqu'une cellule est infectée par un virus, l'infection peut entraîner des changements dans plusieurs voies cellulaires incluant celles de la survie cellulaire, de la mort cellulaire et du métabolisme. Les voies de mort peuvent être manipulées par la cellule pour éliminer le pathogène ou par le pathogène lui-même pour favoriser sa réplication. Il existe plusieurs types de mort cellulaire, certaines sont associées avec de l'inflammation comme la nécrose et la pyroptose et d'autres évitent l'inflammation comme l'apoptose (Lee and Shin, 2019).

Les *Flavivirus* sont des virus lytiques et sont donc capables d'induire la mort cellulaire mais aussi de la retarder, ce qui favoriserait leur réplication.

1.7.1 Induction de la mort cellulaire

De nombreuses études ont montré que l'infection par les *Flavivirus* peut induire la mort de la cellule infectée. Plusieurs types de mort ont été observés comme la nécrose, la pyroptose ou l'apoptose (de Sousa et al., 2019).

Pour le VZIK, des études *in vitro* et *in vivo* ont même montré un lien entre la microcéphalie et la mort cellulaire. De plus, les cellules peuvent mourir en réponse à l'infection directement ou par la réponse neuroinflammatoire. De la mort par apoptose, par nécrose, par nécroptose, par pyroptose, par paraptose et l'augmentation de l'autophagie sont observés dans les cellules

neuronales et gliales entraînant une atrophie cérébrale (Daniels et al., 2019; He et al., 2018; Li et al., 2018; Liang et al., 2016; Souza et al., 2016). Plusieurs voies de signalisation menant notamment à l'apoptose sont perturbées par le VZIK dans les CNP. Parmi celles-ci la voie Akt-mTOR ou encore la voie p53 (Ghouzzi et al., 2016; Liang et al., 2016).

L'apoptose, aussi connue comme mort cellulaire programmée de type 1 est un type de défense cellulaire conservée qui permet d'éliminer les cellules endommagées, infectées ou en trop dans l'organisme. Il existe deux voies : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque qui agissent conjointement. Dans la voie extrinsèque, les cytokines, les facteurs de croissance et les ligands de mort induisent l'activation des récepteurs de mort responsables de l'initiation de la cascade intrinsèque qui est médiée par les protéines de la famille des BCL-2. Il en existe des pro-apoptotiques qui activent les facteurs BAX et BAK, présents sur la membrane externe de la mitochondrie, ou des anti-apoptotiques qui les inhibent. Une fois activées, BAX et BAK perméabilisent la membrane de la mitochondrie permettant ainsi le relâchement des facteurs comme le cytochrome c qui provoquent l'activation de cystéines protéases, aussi appelées caspases. Celles-ci induisent la destruction cellulaire sans induire d'inflammation (Ojha et al., 2018; Okamoto et al., 2017).

L'apoptose classique ne cause pas de dommages majeurs et reste invisible au système immunitaire. Cependant, dans les cas de microcéphalies, l'apoptose induit la mort incontrôlée des neurones et des cellules gliales entraînant une production intense de caspase 3 clivée. L'expression de cette dernière a été corrélée avec la production de cytokines qui sont directement ou indirectement associées au phénomène de mort cellulaire apoptotique suggérant que la réponse immunitaire pourrait être associée au phénomène apoptotique observé dans la microcéphalie induite par le VZIK (de Sousa et al., 2019; Souza et al., 2016). En effet, de l'apoptose est même retrouvée dans les cellules adjacentes aux CNP infectées, sans qu'il n'y ait d'évidences d'infections. Il est donc probable que des facteurs cytotoxiques soient sécrétés par les cellules infectées. De plus, des cellules comme les astrocytes, les microglies et les lymphocytes pourraient également relâcher des cytokines pro-inflammatoires qui participent au dommage des neurones non-infectés (Ojha et al., 2018).

En plus de la mort cellulaire caspase-dépendante, de la mort cellulaire caspase-indépendante comme la paraptose a été observée dans des cellules épithéliales, des fibroblastes et des astrocytes infectés par le VZIK *in vitro*. Cette mort se présente par l'accumulation de vacuoles dans le cytoplasme menant à l'implosion de la cellule. Ces vacuoles sont dérivées du RE et sont dépendantes de la voie de signalisation PI3K / Akt (Monel et al., 2017).

Les cas de microcéphalies induites par le VZIK présentent une réponse neuroinflammatoire intense dans le SNC qui entraîne le développement d'un mécanisme de mort cellulaire extrêmement nocif pour les neurones et les cellules gliales : la pyroptose (He et al., 2018). Ce mécanisme diffère de l'apoptose et de la nécrose car il dépend de l'activation de l'inflammasome, un complexe multiprotéique caractérisé par l'activation de NLRP3 et AIM2, des récepteurs qui reconnaissent le VZIK et induisent l'activation de la caspase 1 et la maturation de l'IL-1 β . Ceci va ultimement générer des pores à la membrane plasmique entraînant la lyse cellulaire (He et al., 2018).

Un autre mécanisme utilisé par les *Flavivirus* pour induire la mort cellulaire est la production d'ARN sous-génomique (ARN sous-génomique flaviviral ou ARNsf). Ce sont des ARN non-codants dérivés de la partie 3'UTR de l'ARNv. Ils participent à la réplication efficace des virus, à leurs effets cytopathiques incluant l'induction de la mort cellulaire et à leur pathogénicité sans que l'on ne sache exactement pourquoi (Pijlman et al., 2008).

1.7.2 Répression de la mort cellulaire

Bien que dans la plupart des cas, l'infection par les *Flavivirus* finit par induire la mort cellulaire, ils sont capables, aux étapes précoces de leur infection, d'interférer avec ces mécanismes ce qui va laisser plus de temps à leur réplication. En effet, ils modulent des voies de l'immunités innées, l'UPR (Unfolded protein response) ou encore l'autophagie ce qui retarde l'induction de l'apoptose (Wu et al., 2017; Yu et al., 2006). Plus spécifiquement, les protéines non-structurales telles que NS1, NS3 ou NS4B semblent essentielles à l'inhibition de l'interféron et ceci retarde l'induction de l'apoptose chez le VZIK (Wu et al., 2017).

Les *Flavivirus* utilisent la machinerie cellulaire pour la production de leurs protéines et ceci entraîne un stress du Réticulum endoplasmique. Ce stress induit une voie de signalisation appelée l'UPR qui a pour but de réduire la charge de protéines incorrectement repliées en induisant une expansion de la membrane du RE, en diminuant l'afflux de protéines dans le RE et en induisant la transcription de facteurs clés pour le repliement des protéines comme les chaperonnes. L'UPR peut se faire via l'activation de 3 molécules : IRE1 α , PERK et ATF6. Elle peut induire l'activation par autophosphorylation de IRE1 α pour permettre l'épissage de l'ARNm de XBP1, la phosphorylation de PERK qui va phosphoryler eIF2 α pour inhiber l'initiation de la traduction des protéines et induire l'expression d'ATF4 et la translocation de ATF6 vers le Golgi pour être activé par clivage (Bertolotti et al., 2000; Shen et al., 2002; Yoshida et al., 2001). XBP1, ATF4 et ATF6 sont des facteurs de transcription entraînant la réponse. Si le stress du RE n'est

pas sous contrôle, une dégradation autophagique du RE et même l'apoptose peuvent être induits (Fribley et al., 2009). Pour contrer ceci, les *Flavivirus* induisent l'UPR de plusieurs façons. Par exemple, le VEJ, le VNO et le VDEN peuvent activer IRE1, PERK et ATF6 (Bhattacharyya et al., 2014; Huang et al., 2016; Medigeshi et al., 2007; Peña and Harris, 2011; Thepparit et al., 2013). Chez le VDEN par exemple NS2B3 participerait à l'épissage de XBP1 (Yu et al., 2006).

Les *Flavivirus* sont aussi capables d'induire l'autophagie et ceci semble retarder l'induction de l'apoptose (Hamel et al., 2015; Liang et al., 2016; Peng et al., 2018). L'autophagie est un processus catabolique médié par les lysosomes dans lequel les composants intracellulaires indésirables sont dégradés pour recycler les nutriments pour la régénération d'organites et d'énergie (Perera et al., 2017). Dans certaines conditions, l'autophagie peut permettre de retarder la mort cellulaire notamment en augmentant les signaux de survie ou en réprimant les signaux de mort. Par exemple, il a été démontré que la caspase-8 clivée (active) peut être sélectivement dégradée par autophagie (Hou et al., 2010).

L'induction de l'autophagie par les *Flavivirus* semble se faire via la protéine NS4A. L'unique expression de cette dernière semble suffisante pour induire une autophagie dépendante de la voie de signalisation PI3K dans les cellules épithéliales, les protégeant contre la mort cellulaire (McLean et al., 2011). Cependant les mécanismes exacts manipulés par les *Flavivirus* pour retarder l'apoptose ne sont pas encore connus.

Une étude récente a montré que le VZIK retarde l'apoptose induite par la voie intrinsèque et par la voie extrinsèque. De plus, cette étude montre une augmentation de la quantité des protéines Bcl-2 anti-apoptotiques ce qui pourrait expliquer le retard de l'apoptose. Ces protéines permettent l'inhibition des facteurs pro-apoptotiques qui permettent la perméabilisation de la membrane mitochondriale par BAX et BAK (Turpin et al., 2019).

De plus, l'élongation des mitochondries abordée plus tôt (section 1.5.3) induite par le VDEN et le VZIK permet d'inhiber l'IFN (mécanisme pouvant mener à l'apoptose) en plus d'être une configuration connue pour retarder l'activation de BAX induite par la fragmentation mitochondriale (Chatel-Chaix et al., 2016; Youle and Karbowski, 2005). Cependant aucun lien entre l'élongation induite par ces virus et le retardement de l'apoptose n'est clairement connu. Considérant l'action des CM mentionnée plus tôt sur les mitochondries et sur le RE lui-même, deux organelles importantes dans les mécanismes d'induction de l'apoptose, il est possible que ces structures soient induites pour tamponner ce phénomène.

1.8 NS4B

La protéine non-structurale 4B (NS4B) est une protéine très conservée parmi les *Flavivirus*. Elle présente un intérêt particulier car bien que l'on ne lui connaisse aucune activité enzymatique et que son rôle dans la réplication virale reste inconnu, elle est indispensable pour la réplication du VDEN (Chatel-Chaix et al., 2016 ; Zou et al., 2014). Le rôle critique de NS4B dans la réplication du VDEN est aussi illustré par le fait qu'elle soit reconnue comme cible thérapeutique par divers composés dont certains sont actuellement en études précliniques sans que l'on sache leur mécanisme d'action (Wang et al., 2015).

1.8.1 Topologie et interactions

NS4B est une petite protéine intégralement membranaire et très hydrophobe. Chez le VDEN, la forme mature de NS4B est générée par une réaction de clivage complexe. En effet, la forme immature de NS4B est attachée à NS4A sous une forme appelée NS4A-2K-NS4B. En effet, la partie carboxy-terminale de la protéine NS4A, juste avant NS4B, contient une séquence signal qui sert à la translocation de NS4B du côté luminal du RE. En raison de sa taille (2 kDa), ce peptide signal est appelé le fragment 2K. La première étape de clivage par la protéase virale NS2B3 permet de relâcher NS4A pour donner NS4B sous forme pseudo-mature, 2K-NS4B. La séquence 2K est ensuite clivée par une signalase de l'hôte présente dans la lumière du RE (Lin et al., 1993) (Figure 1-5).

La fonction indispensable de NS4B dans la réplication virale pourrait se faire via ses interactions avec d'autres protéines virales ou cellulaires. En effet, NS4B se dimérise, interagit avec NS1, NS2B, NS3 et NS4A et ces interactions semblent importantes pour la réplication virale (Chatel-Chaix et al., 2015; Płaszczycza et al., 2019; Zou et al., 2014, 2015).

NS4B du VDEN s'intègre dans la membrane du RE, avec trois domaines transmembranaires (TMD3, 4 et 5) et deux domaines associés à la membrane (pTMD1 et pTMD2) (Figure 1-8) (Miller et al., 2006). Entre les domaines TMD3 et TMD4 se trouve une région ultra conservée appelée «boucle cytosolique». Cette région est la seule portion de la protéine présente dans le cytosol et semble importante pour les interactions, notamment avec NS3. Certains résidus de la boucle comme Q134, G140 ou M140 sont critiques pour l'interaction NS4B/NS3. En effet, des substitutions en Alanine de ces résidus abolissent l'interaction ainsi que la réplication virale, mettant en lumière l'importance de cette interaction (Chatel-Chaix et al., 2015). Le précurseur NS4A-2K-NS4B ou la maturation de ce dernier (mentionnée plus haut) semblent importants pour la liaison de NS4B avec NS3 (Chatel-Chaix et al., 2015).

L'importance du précurseur NS4A-2K-NS4B dans les interactions protéiques est aussi illustrée par le fait que NS1 interagit avec ce dernier mais n'interagit ni avec NS4A ni NS4B matures. Cette interaction est indispensable à la réplication du VDEN et le clivage retardé de ce dernier jouerait donc un rôle important (Płaszczyc et al., 2019).

L'importance de NS4B, ses interactants ainsi que les déterminants essentiels aux interactions ont été étudiés principalement chez le VDEN. Cependant, la proximité génétique entre le VDEN est le VZIK pourrait suggérer des mécanismes conservés.

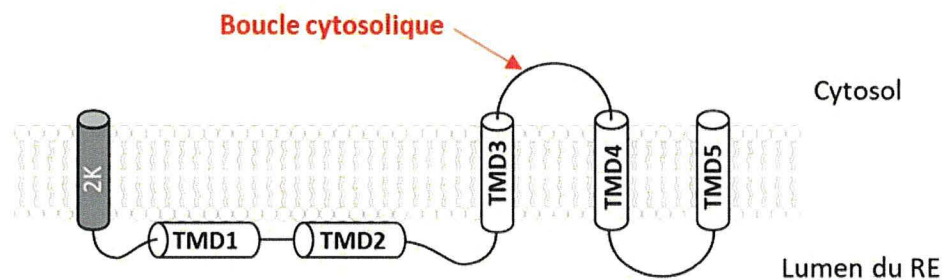


Figure 1-8 Représentation schématique de la topologie membranaire de NS4B du VDEN (Modifié de Chatel-Chaix et al., 2015 ; Miller et al., 2006)

1.8.2 NS4B et organites de réplication virale

Un autre aspect intéressant de NS4B est son importance pour les organites de réplication virale. En effet, dans le cas du VDEN et du VNO, les preuves disponibles plaident pour un rôle important des deux protéines non structurales NS4A et NS4B dans la formation des OR. Leur topologie ainsi que leurs interactions protéiques seraient impliquées dans le phénomène de réarrangement des membranes. Ce sont des protéines intégralement membranaires qui contiennent des hélices centrales supposées se trouver dans le même plan au niveau côté luminal du RE. Cette disposition augmente localement la surface de la membrane, favorisant ainsi la courbure négative et induisant des vésicules invaginées (Miller et al., 2006, 2007; Roosendaal et al., 2006).

Il faut savoir que chez le VDEN l'expression individuelle de NS4A dépourvue du fragment 2K entraîne une altération des membranes ressemblant aux CM induites par le virus. Cependant les structures induites sont tout de même différentes de celles produites lors de l'infection et NS4A ne semble pas suffisante pour induire la formation des PV. Ceci suggère donc que d'autres facteurs viraux sont nécessaires. De plus, l'expression de NS4A pleine longueur n'induit pas d'altérations membranaires comparables, montrant que l'élimination protéolytique du peptide 2K

et supposément de la maturation de la forme immature NS4A-2K-NS4B semblent être importantes pour l'induction des altérations membranaires (Miller et al., 2007).

Ainsi, le réarrangement membranaire implique probablement une coopération entre plusieurs facteurs viraux ou cellulaires. Ce processus est probablement soutenu par l'oligomérisation de NS4A, l'oligomérisation de NS4B et leur interaction entre-elles (Stern et al., 2013; Zou et al., 2014, 2015).

1.8.1 NS4B : immunité et élongation mitochondriale

Outre son importance dans les interactions protéine/protéine, NS4B est impliquée dans l'évasion de la réponse immunitaire de la cellule hôte.

En effet, NS4B du VDEN interfère dans la signalisation de l'immunité innée en inhibant l'induction de l'interféron de type I via différentes voies de signalisation. La première est la voie JAK/STAT : NS4B inhibe la phosphorylation activatrice de STAT1 empêchant sa translocation nucléaire nécessaire pour l'induction des gènes de réponse à l'interféron (Muñoz-Jordán et al., 2005). La seconde voie est la voie RIG-I/MDA5/MAVS/TBK1/IKK ϵ /IRF3 : NS4B inhibe la phosphorylation de IRF3 et de TBK1 et ainsi inhibe l'induction de l'IFN- β (Dalrymple et al., 2015). Chez le VZIK, NS4B bloque aussi la production d'IFN et le mécanisme de ciblage de TBK1 semble conservé (Wu et al., 2017).

NS4B est la protéine responsable de l'élongation mitochondriale induite par le VDEN mentionnée plus haut (section 1.5.3 et section 1.7.2). En effet, l'expression de NS4B seule induit l'élongation en inhibant la phosphorylation activatrice au résidu S616 de DRP1 ce qui empêche sa translocation aux mitochondries. DRP1 est un facteur de fission mitochondriale. Plusieurs études ont montré que l'élongation des mitochondries chez le VDEN favorise la réplication virale alors que la fission des mitochondries diminue la réplication virale (Barbier et al., 2017; Chatel-Chaix et al., 2016). Une des conséquences de ce processus est l'altération de l'immunité innée. En effet les mitochondries allongées sont proches des CM; ceci perturbe les MAMs affectant l'induction de l'interféron RIG-I-dépendante (Chatel-Chaix et al., 2016). En plus de cela, l'élongation des mitochondries induite par le virus pourrait aussi permettre d'améliorer la respiration mitochondriale et d'augmenter la production d'énergie pour faciliter la réplication (Barbier et al., 2017). L'élongation mitochondriale a aussi été observée dans les cellules infectées par le VZIK mais pas chez le VHC ni chez le VNO suggérant que ce phénotype est spécifique aux VDEN et VZIK (Chatel-Chaix et al., 2016).

1.8.2 NS4B et neuropathogénèse

Certaines études suggèrent que NS4B est fortement impliquée dans la neuropathogénèse induite par le VZIK (voir section 1.3) (Liang et al., 2016; Scaturro et al., 2018).

Il a récemment été observé que NS4B du VZIK est responsable, avec NS4A, de l'altération de la neurogenèse dans les cellules souches *in vitro*. Ces résultats ont été démontrés grâce à l'utilisation de neurosphères. Une neurosphère est un système de culture composé d'amas flottants de CSNh. L'expression de NS4A seule ou de NS4B seules dans des cellules CSNh fœtales suffit à la perturbation la formation de neurosphère, qui apparaissent plus petites, alors que les autres protéines virales ne montrent pas ce phénotype. Cette même étude montre que l'expression de ces 2 protéines virales perturbe la différenciation en neurone et en astrocyte en inhibant la voie Akt-mTOR. De plus, elles induisent une augmentation de l'autophagie ce qui est un bénéfice pour la réplication virale (Liang et al., 2016).

D'autres études montrent de fortes évidences pour l'implication de NS4A dans la neuropathogénèse du VZIK. Elle interagit avec la voie de signalisation ANKL2, voie très fortement impliquée dans les microcéphalies humaines (Link et al., 2019; Shah et al., 2018). De plus, NS4A aurait aussi pu jouer un rôle dans l'évolution moléculaire de la lignée asiatique. Elle pourrait donc être responsable de la pandémie provoquée par cette lignée en plus de l'apparition des cas de microcéphalie (Lin et al., 2018).

L'étude de Liang et al. a montré que l'expression de NS4A et de NS4B ensembles montre une altération de la neurogenèse encore plus accentuée que lorsque les 2 protéines sont exprimées séparément. Ceci suggère une importance de ce duo et une probable potentialisation du mécanisme par la présence de ces deux protéines (Liang et al., 2016).

De plus, une étude protéomique orthogonale a identifié plusieurs protéines liées à des maladies neurologiques ou des problèmes de développement neurologique interagissant avec NS4B. Parmi celles-ci, plusieurs sont associées à l'ensemble du spectre de la pathogénèse associée au VZIK comme les troubles neurodégénératifs, la dégénérescence rétinienne, les défauts de différenciation neuronale et la dysfonction axonale (Scaturro et al., 2018).

C'est pour toutes ces raisons que la protéine NS4B est d'un intérêt particulier et qu'il est très important de mieux comprendre son rôle dans la réplication des *Flavivirus* en général et plus particulièrement dans le cadre de l'infection par le VZIK. Étant donné que son implication dans la réplication virale se fait probablement via son interaction avec d'autres protéines, Chatel-Chaix et al. ont réalisé une analyse par spectrométrie de masse pour déterminer les interactants de

NS4B chez le VDEN. Plusieurs protéines cellulaires sont ressorties de cette étude, et parmi celles-ci, la protéine VCP/p97 a attiré notre attention (Chatel-Chaix et al., 2016).

1.9 VCP

1.9.1 Fonctions cellulaires de VCP

VCP pour Valosin-containing protein ou p97 (Cdc48 chez la levure) est une protéine très conservée chez les eucaryotes. Elle régit un grand nombre de processus cellulaires allant de la dégradation des protéines et des organites endommagés, aux événements de signalisation clés et à la régulation de la chromatine (Van den Boom and Meyer, 2018).

VCP/p97 est une protéine appartenant à la famille des ATPase associée à diverses activités cellulaires (AAA+ ATPase). La famille des AAA+ ATPase utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour remodeler structurellement des molécules cibles. Cette protéine s'oligomérisise pour former des hexamères. Chaque sous-unité de VCP contient un domaine régulateur en N-terminal et deux domaines ATPase, D1 et D2 (Figure 1-9). Ces derniers permettent à VCP de séparer les protéines cibles de complexes protéiques ou de membranes d'organites cellulaires et de leurs imposer des changements de conformation pour faciliter leur dégradation par le protéasome (Long et al., 1998; Van den Boom and Meyer, 2018).

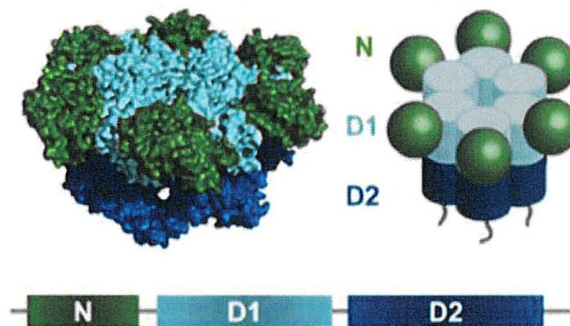


Figure 1-9 Structure de l'hexamère de VCP.

Chaque sous-unité comprend un domaine N globulaire (vert) et les deux domaines ATPase D1 (cyan) et D2 (bleu) (Van den Boom and Meyer, 2018).

VCP est impliquée dans plusieurs processus de dégradation des protéines ubiquitinées par l'intermédiaire du protéasome comme la dégradation associée au RE (ERAD), la dégradation associée aux mitochondries (MAD) et la dégradation associée à la chromatine (CAD). VCP est

considérée comme une chaperonne et une ségrégase (Buchberger, 2010; Huryn et al., 2019; Stolz et al., 2011).

Les protéines cibles incorrectement repliées sont généralement marquées pour la dégradation par l'ajout de la protéine ubiquitine par une cascade d'évènement impliquant les enzymes E1 (activation), E2 (conjugaison) et E3 (ligation). Des chaînes d'ubiquitines sont générées sur les protéines à dégrader puis reconnues et traitées par VCP et ses adaptateurs comme Ufd1-Npl4 conférant sa spécificité vis-à-vis des substrats (Bebeacua et al., 2012; Ye et al., 2017).

VCP peut aussi être impliquée dans la dégradation de protéines indépendamment de la dégradation par le protéasome par son implication dans l'autophagie et le système lysosomal (Ritz et al., 2011). Plusieurs rapports indiquent que VCP et ses cofacteurs sont impliqués dans le tri des cargos ubiquitinés le long de la voie endolysosomale (Tresse et al., 2010; Van den Boom and Meyer, 2018). C'est aussi pour cela que VCP est impliquée dans l'homéostasie des organites même par macroautophagie sélective des organites endommagés tels que les mitochondries (mitophagie) et les lysosomes (lysophagie) (Papadopoulos et al., 2017; Tanaka et al., 2010). Par exemple, VCP extrait les mitofusines ubiquitinées qui sont présentes à la membrane externe de la mitochondrie pour leurs dégradations. Ceci entraîne la fragmentation des mitochondries pour faciliter leur intégration par les autophagosomes (Tanaka et al., 2010).

L'implication de VCP dans divers processus cellulaires est coordonnée par une multitude de cofacteurs qui régulent son activité et qui peuvent diriger la spécificité de VCP vis-à-vis de ses substrats. Une trentaine de cofacteurs de VCP ont été identifiés et ils contiennent tous des domaines ou motifs d'interaction spécifiques qui se lient pour la plupart au niveau de son domaine N-terminal. Certains de ces cofacteurs servent d'adaptateurs d'ubiquitine comme Ufd1-Npl4 ou permettent le recrutement de VCP (Bebeacua et al., 2012; Meyer and Weihl, 2014; Rumpf and Jentsch, 2006).

VCP est aussi impliquée dans des processus permettant le maintien de la stabilité du génome. L'implication de VCP dans la CAD s'est révélée être essentielle et évolutivement conservée. L'inactivation de l'activité ségrégase de VCP conduit à l'accumulation de substrats ubiquitinés sur la chromatine, conduisant par conséquent à un stress de la chromatine induit par des protéines. Ce phénomène affecte directement plusieurs processus métaboliques de l'ADN, y compris la réplication, les réponses aux dommages, la mitose et la transcription, conduisant à un stress génotoxique et à l'instabilité du génome (Vaz et al., 2013).

1.9.2 VCP dans le système nerveux

Considérant son rôle essentiel pour l'homéostasie cellulaire et la stabilité du génome, VCP est impliquée dans plusieurs pathologies humaines comme des maladies neurodégénératives et des cancers.

En effet, des mutations pathologiques familiales dans VCP sont associées à des maladies du système nerveux central et du système nerveux périphérique. Ces mutations sont responsables d'une protéinopathie multisystémique tardive aussi appelée IBMPFD/ALS (Inclusion body myopathy with early-onset Paget disease and frontotemporal dementia/ Amyotrophic Lateral Sclerosis). Elle se manifeste chez les patients par une démence frontotemporale, une sclérose latérale amyotrophique classique, une myopathie à corps d'inclusion et de maladie osseuse de Paget. Il faut noter qu'un patient avec une mutation pathologique dans VCP peut avoir n'importe quelles combinaisons de ces phénotypes, y compris tous les phénotypes ou uniquement un de ces phénotypes. Cependant, comme de plus en plus de patients sont identifiés avec des mutations dans VCP, le spectre phénotypique continue de s'étendre (Haubenberger et al., 2005; Meyer and Wehl, 2014; Watts et al., 2004).

La majorité des mutations pathogéniques se retrouve dans la région à l'interface entre les domaines N et D1, suggérant que la communication entre ces deux régions est importante pour la pathogenèse (Figure 1-9). Les mutations ne modifient pas la fonction de la protéine et n'altèrent pas les structures des sous-unités mais entraînent dans la majorité des cas une augmentation de son activité ATPase. Parmi celles-ci, la mutation R155H est la plus fréquemment identifiée chez les patients, tandis que la mutation A232E est associée à la manifestation clinique la plus sévère (Gonzalez et al., 2014; Meyer and Wehl, 2014; Viassolo et al., 2008). Dans certains cas, c'est la liaison de VCP avec certains de ses co-facteurs qui est perturbée (Fernández-Sáiz and Buchberger, 2010). Les mutations affectent principalement les organes qui ont un niveau élevé de dépense énergétique, comme le cerveau et les muscles (Van den Boom and Meyer, 2018).

De nombreux mécanismes pourraient être impliqués dans la pathogenèse associée aux mutations : une dégradation inadéquate des protéines et l'accumulation d'agrégats associés, une perturbation dans l'autophagie, des défauts de morphologie des lysosomes, une formation aberrante d'autophagosomes ou encore des défauts dans la fonction mitochondriale (Gonzalez et al., 2014; Guo et al., 2016; Meyer and Wehl, 2014; Tresse et al., 2010).

Des données suggèrent que des traitements avec certain inhibiteurs de la fonction ATPase de VCP peuvent sauver les défauts associés à ces mutants à la fois dans les fibroblastes des

patients *in vivo* et dans les modèles d'insectes (Zhang et al., 2017b). Il existe plusieurs inhibiteurs découverts dont les mécanismes d'actions ainsi que les sites de liaison peuvent varier. Parmi les inhibiteurs les plus puissants figurent des inhibiteurs compétitifs de l'ATP (ML240 et CB-5083) et des inhibiteurs allostériques non-compétitif de l'ATP (NMS-873 et UPCDC-30245) (Banerjee et al., 2016; Chou et al., 2013; Magnaghi et al., 2013; Zhou et al., 2015).

VCP semble important dans le développement du système nerveux. En effet, l'inhibition de VCP chez les larves de drosophile et chez les larves de poisson-zèbre entraîne une perturbation dans le développement neuronal et induit une neurodégénération (Kustermann et al., 2018; Rumpf et al., 2011). De plus, l'absence totale de VCP chez les embryons de poisson-zèbre est létale. Des défauts dans la croissance neuronale, de l'accumulation de protéines polyubiquitinées, de la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi que beaucoup d'apoptose dans le système nerveux central cause la mort des embryons (Imamura et al., 2012). Conformément à cela, les souris VCP-knockout ne sont pas viables et montrent une létalité embryonnaire précoce (Müller et al., 2007).

En plus de son implication dans des maladies du système nerveux central et périphérique, VCP a aussi été impliquée dans plusieurs sortes de cancers comme les cancers du sein, colorectal, pulmonaire, de la prostate et du pancréas. On y retrouve une régulation à la hausse de VCP. Les mécanismes exacts impliqués ne sont pas encore connus. En 2015, un des inhibiteurs de la fonction ATPase de VCP, CB-5083, est entré dans des essais cliniques de phase I pour les myélomes multiples et les tumeurs solides avancées. Cependant, le développement clinique a été interrompu en raison d'une perte de vision chez les patients, probablement en raison d'une inhibition hors-cible de la phosphodiesterase-6 (Huryn et al., 2019; Le Moigne et al., 2017).

1.9.3 VCP dans les infections virales

Plus récemment, des études ont montré un rôle essentiel de VCP dans la réplication de plusieurs virus. La plupart des virus identifiés sont des virus à ARNs^b appartenant à des familles différentes. En effet VCP est nécessaire à la réplication de virus de la famille des *Coronaviridae* (virus de la bronchite infectieuse), de la famille des *Togaviridae* (virus Sindbis et VCHIK) de la famille des *Bunyaviridae* (Virus de la vallée du Rift), de la famille des *Picornaviridae* (virus de la Polio) et des *Flaviviridae* (VHC et VNO) (Arita et al., 2012; Brahms et al., 2017; Carissimo et al., 2019; Panda et al., 2013; Phongphaew et al., 2017; Yi and Yuan, 2017). Le rôle exact de VCP dans ces infections n'est pas exactement connu mais dans tous ces cas, l'inhibition pharmacologique de VCP entraîne une diminution de la réplication des virus.

2 HYPOTHESES ET OBJECTIFS

L'infection par le VZIK constitue une inquiétude de santé publique majeure car elle peut mener à des complications neurologiques graves telles que les microcéphalies et aucun vaccin ni thérapie antivirale n'est à ce jour disponible. Pour remédier à cela, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes moléculaires liés à l'infection. Une protéine très intéressante est la protéine NS4B qui, chez le VDEN, est indispensable à la réplication en plus d'être la cible de composés thérapeutiques prometteurs sans que l'on ne connaisse son rôle exact. Une étude d'interaction protéomique a montré que NS4B du VDEN interagit avec la protéine cellulaire VCP/p97.

Considérant la proximité génétique entre le VDEN et le VZIK, nous avons émis la première hypothèse stipulant que ces deux protéines interagissent également lors de l'infection par le VZIK.

Par la suite, considérant l'importance de VCP dans l'infection d'autres virus, y compris des *Flavivirus* comme le VNO, nous avons émis la seconde hypothèse stipulant que VCP est une protéine importante pour la réplication du VZIK. Le fait que VCP soit importante pour le système nerveux central et le système nerveux périphérique, qui sont deux cibles du VZIK, supporte notre hypothèse. De plus, l'importance de VCP au niveau du développement neuronal pourrait même suggérer une implication de cette protéine dans les microcéphalies congénitales induites par le VZIK.

Dans un premier temps nous avons voulu déterminer si l'interaction NS4B/VCP a lieu dans un contexte d'infection par le VZIK. Par la suite, nous avons voulu déterminer le degré d'implication de VCP dans l'infection en comparant les niveaux d'infection dans les cellules où VCP était inhibée ou lorsque son expression était diminuée.

Considérant le rôle de VCP dans l'homéostasie des protéines du RE et des mitochondries, deux organelles au centre de la réplication des *Flavivirus*, nous avons voulu étudier son rôle potentiel dans la biogenèse des OR et sur la morphodynamique mitochondriale.

Par ailleurs, dans un objectif de caractérisation des CM et de NS4B chez le VZIK, nous avons voulu confirmer la localisation ainsi que l'interaction entre NS3 et NS4B, comme c'est le cas pour chez le VDEN.

Pour finir, nous avons évalué un rôle potentiel des CM, VCP-dépendant, dans le contrôle de la mort cellulaire induite par le VZIK.

3 ARTICLE

VALOSIN-CONTAINING PROTEIN REGULATES THE MORPHOGENESIS OF ZIKA VIRUS REPLICATION ORGANELLES THROUGH ASSOCIATION WITH NON-STRUCTURAL PROTEIN 4B

Running title: The role of cellular VCP during Zika virus life cycle

Anaïs Anton^{1*}, Clément Mazeaud^{1*}, Wesley Freppel^{1*}, Claudia Gilbert¹, Nicolas Tremblay¹, Aïssatou Aïcha Sow¹, Ian Gaël Rodrigue-Gervais¹ and Laurent Chatel-Chaix^{1,2,3#}

¹ Institut national de la recherche scientifique, Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, Québec, Canada.

² Center of Excellence in Orphan Diseases Research-Fondation Courtois (CERMO-FC), Québec, Canada.

³ Réseau Intersectoriel de Recherche en Santé de l'Université du Québec (RISUQ), Québec, Canada.

* These authors contributed equally

Corresponding author: Laurent Chatel-Chaix

Email : Laurent.Chatel-Chaix@iaf.inrs.ca

Titre en français : VCP RÉGULE LA MORPHOGENESE DES ORGANITES DE REPLICATION DU VIRUS ZIKA PAR ASSOCIATION AVEC LA PROTEINE NON STRUCTURELLE 4B

Manuscrit soumis à *Journal of Virology* le 19 décembre 2019.

Lettre de refus reçu le 08 janvier 2019, nouvelle soumission dans *Cellular microbiology* ou *Journal of Infectious Diseases* prévue pour fin février/début mars.

3.1 Mise en contexte

Mon projet de maitrise initial portait sur « l'étude des interactions entre les protéines NS3 et NS4B du virus Zika et de leurs rôles lors de l'infection ». J'ai donc commencé par effectuer les expériences pour confirmer l'interaction NS3/NS4B chez le VZIK (Figure 3-6 et Figure 3-7 de l'article). En parallèle, considérant l'étude de spectrométrie de masse effectuée par Laurent et son équipe dans le passé (Chatel-Chaix et al., 2016) ayant identifié VCP comme interagant de NS4B du VDEN, j'ai commencé à étudier cette interaction chez le VZIK. Les résultats étant prometteurs, nous avons voulu continuer d'étudier cette protéine. Sachant que d'autres équipes de recherches s'intéressaient également à VCP lors de l'infection par les *Flavivirus*, nous avons voulu accélérer le processus en répartissant les expériences à effectuer afin de soumettre dans les plus brefs délais. Ainsi Laurent a demandé à Clément Mazeaud et Wesley Freppel de participer aux expériences dans le but de publier rapidement et ainsi éviter la compétition.

Je me suis occupée des parties concernant les clonages moléculaires, les interactions protéines-protéines ainsi que les aspects en lien avec les OR tandis que Clément et Wesley se sont occupés de la partie « fonctionnelle » avec les expériences sur la réplication virale. Nous avons pu inclure les résultats que j'avais obtenu sur l'interaction NS3/NS4B dans le papier également. Je présente certains de mes résultats additionnels dans la discussion générale de ce mémoire.

3.2 Attestation contributions des auteurs

La majorité des travaux de cet article a été réalisée conjointement avec mes collègues Clément Mazeaud et Wesley Freppel. J'ai effectué les expériences présentées à la figure 1, figure 3, figure 5C et D, figure 6, figure 7, figure 8A. Les expériences de microscopie électronique (figure 4 et figure 5B) ont été faites conjointement avec Clément Mazeaud. J'ai participé à la rédaction du manuscrit. Clément Mazeaud a effectué les expériences des figure 2E, figure 5A, figure 8B-D. Wesley Freppel a effectué les expériences des figure 2A-D, figure 9. Les expériences de la figure 10 ont été réalisés par Claudia Gilbert et Ian Gael Rodrigue Gervais. Laurent Chatel-Chaix a effectué la conception du projet et la rédaction du manuscrit.

3.3 Lettre soumission

JVI02139-19: Manuscript Received

asm@msubmit.net

Envoyé jeudi 19 décembre 2019 22:37

A : Anton, Anaïs

Dear Mrs. Anton,

On December 19, 2019, we received the manuscript "VALOSIN-CONTAINING PROTEIN REGULATES THE MORPHOGENESIS OF ZIKA VIRUS REPLICATION ORGANELLES THROUGH ASSOCIATION WITH NON-STRUCTURAL PROTEIN 4B" by Anaïs Anton, Clément Mazeaud, Wesley Freppel, Claudia Gilbert, Nicolas Tremblay, Aïssatou Aïcha Sow, Ian Gaël Rodrigue-Gervais, and Laurent Chatel-Chaix. The submission form indicates that this paper should be processed as a(n) Full-Length Text intended for publication in the section Virus-Cell Interactions.

The manuscript has been assigned the control number JVI02139-19. Take note of this number, and refer to it in any correspondence with the Journals Department or with the editor.

You can check the status of this manuscript by clicking on the link below and selecting Check Status:

<https://jvi.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A2GO5BaNc3A1EKkj1F6A9ftdpyma5j3J1CBb9cIwZZ46OZ>

Conflicts of Interest: All authors must disclose any commercial affiliations as well as consultancies, stock or equity interests, and patent-licensing arrangements that could be considered to pose a conflict of interest regarding the submitted manuscript. All funding sources for the project, institutional and corporate, and any potentially conflicting interests, such as relationships that might detract from an author's objectivity in presentation of study results, must be acknowledged, both in the Acknowledgments section and on this form. The corresponding author must review this policy with all coauthors.

The author submitting the manuscript must state in the submission form whether or not any of the authors has a conflict of interest. Here is how Prof. Chatel-Chaix responded:

Conflict of Interest: No conflict of interest.

If you have a conflict of interest that is not disclosed here, please notify the journal staff immediately at jnachman@asmusa.org

To find contact information for the editor handling your manuscript, go to the following URL:

http://www.asm.org/components/com_php/files/editors.php

Editorial Policy: In submitting your manuscript to JVI, the author(s) guarantees that a manuscript with substantially the same content has not been submitted or published elsewhere and that all of the authors are aware of and agree to the submission.

By publishing in the journal, the authors agree that any DNAs, viruses, microbial strains, mutant animal strains, cell lines, antibodies, and similar materials newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion, at reasonable cost, and in limited quantities to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

Similarly, the authors agree to make available computer programs, originating in the authors' laboratory, that are the only means of confirming the conclusions reported in the article but that are not available commercially. The program(s) and suitable documentation regarding its (their) use may be provided by any of the following means: (i) as a program transmitted via the Internet, (ii) as an Internet server-based tool, or (iii) as a compiled or assembled form on a suitable medium (e.g., magnetic or optical). It is expected that the material will be provided in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community

3.4 ABSTRACT

With no available therapies, infections with Zika virus (ZIKV) constitute a major public health concern as they can lead to congenital microcephaly. In order to generate an intracellular environment favorable to viral replication, ZIKV induces endomembrane remodeling and the morphogenesis of replication factories via enigmatic mechanisms.

In this study, we identified the AAA⁺-type ATPase valosin-containing protein (VCP) as a cellular interaction partner of ZIKV non-structural protein 4B (NS4B). Importantly, the expression knockdown of VCP as well as its pharmacological inhibition with NMS-873 impaired ZIKV replication. VCP is relocalized to ultrastructures containing both NS4B and NS3 in infected cells. Short treatment with NMS-873 drastically decreased the stability of NS3 without impairing the expression of other ZIKV proteins or NS3/NS4B interaction. Importantly, this correlated with a decrease in the abundance and size of ZIKV-induced convoluted membranes, a sub-structure of ZIKV replication factories which contain NS3 and VCP. Furthermore, NMS-873 treatment inhibited ZIKV-induced mitochondria elongation previously reported to be physically and functionally linked to convoluted membranes in case of the closely related dengue virus. Finally, VCP inhibition resulted in enhanced apoptosis of ZIKV-infected cells strongly suggesting that convoluted membranes limit virus-induced cytopathic effects.

Altogether, this study identifies VCP as a host factor required for ZIKV life cycle and more precisely, for the maintenance of viral replication organelles. Our data further support a model in which convoluted membranes regulate ZIKV life cycle by impacting on mitochondrial functions and ZIKV-induced death signals in order to create a cytoplasmic environment favorable to viral replication.

3.5 IMPORTANCE

With no available therapies, infections with Zika virus (ZIKV) constitute a major public health concern worldwide, especially considering the severe brain development defects associated with congenital transmission to the fetus. In this study, we identified the ATPase valosin-containing protein (VCP) as a cellular partner of ZIKV nonstructural (NS) 4B protein relocalized to viral replication organelles. Importantly, we show that VCP activity is required for ZIKV replication and the stability of NS3, another NS4B partner. VCP inhibition altered ZIKV-induced mitochondria elongation as well as the abundance and size of a VCP- and NS3-containing sub-structure of ZIKV replication factories. Finally, VCP inhibition resulted in an enhanced apoptosis of ZIKV-infected cells strongly suggesting that VCP-containing replication organelles limit virus-induced cytopathic effects. Altogether, our data support a model in which VCP hijacking by ZIKV replication organelles regulates mitochondrial functions and virus-induced death signals in order to create a cytoplasmic environment favorable to viral replication.

3.6 INTRODUCTION

Following the recent outbreak of Zika virus (ZIKV) in the Americas, the World Health Organization issued a global health emergency in 2016 and considers that this pathogen is now endemic (1, 2). As of January 2018, 100 million infection cases have been estimated in the Americas (3). While ZIKV is mainly transmitted through the bite of *Aedes* species mosquitos, this pathogen brought a lot of concerns notably because of its extremely rapid spread within the Americas and of so-far-unsuspected modes-of-transmission. In addition to clinical features usually associated with other related viruses, unique symptoms were reported for ZIKV. Notably worrisome, infection of pregnant women with ZIKV can lead to congenital transmission and eventually to fetal brain development defects including (but not restricted to) neonate microcephaly, leaving surviving children with severe life-long disabilities. Following infection of pregnant women with ZIKV, this pathogen can cross the placental barrier and reach the developing brain to infect neural progenitor cells. This causes their death by apoptosis and the deregulation of their differentiation program via unknown mechanisms, resulting in severe defects in brain development (4-9). ZIKV infection is generally not lethal in humans but this pathogen also reaches adult brain and can cause peripheral nervous system disorders such as the Guillain-Barré syndrome. Late onset appearance of ZIKV-induced neurological disorders has never been reported in adults but should not be excluded given the relatively short history of the ZIKV contemporary pandemic. Unfortunately, neither antiviral therapies nor vaccines against this emerging neurotropic virus are currently available. Hence, to fight this spreading viral threat both therapeutically and prophylactically, there is an urgent need to develop antiviral strategies. Through repurposing screening campaigns, much research efforts are being deployed to identify “ready-to-use” highly potent ZIKV inhibitors that are already approved by the US Food and Drug Administration (10-13). Unfortunately, developing antivirals remains challenging partly because our knowledge of ZIKV biology and neuropathogenesis is very limited and mostly relies on the transposition of the state-of-the-art of related viruses. As a result, viral and host determinants governing the ZIKV life cycle and the severity of fetal brain defects remain poorly understood.

ZIKV belongs to the *Flavivirus* genus within the *Flaviviridae* family and is closely related to dengue virus (DENV). Following entry into a target cell, the genomic viral RNA is translated into one single polyprotein which is further processed into 10 mature proteins by host and viral proteases. The nonstructural proteins (NS) 1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B and 5 are all essential to RNA replication (14). The structural proteins Capsid (C), prM and Envelope (E) assemble together with the RNA genome to form new virus particles. ZIKV, like other flaviviruses, induces massive

rearrangements of the endoplasmic reticulum (ER) generically called “viral replication factories” (vRF)(15). vRFs include three sub-types of ultrastructures. Vesicle packets formed through invaginations of the ER, are believed to host the viral RNA synthesis process. Virus bags are dilated ER-derived cisternae and contain assembled viruses that accumulate in regular arrays. Lastly, ZIKV induces convoluted membranes (CM) which look like tight accumulations of smooth ER. CM precise function remains elusive and has been so far underestimated while it most probably involves the hijacking of specific cellular factors (15, 16). More generally, the host and viral determinants regulating the morphogenesis and/or stability of ZIKV vRF are mostly unknown.

Flaviviral NS4B is of particular interest since this transmembrane protein is strictly required for RNA replication via yet unknown mechanisms (17-19). It is highly enriched in DENV CMs and has been hypothesized to regulate vRF morphogenesis (20-22). NS4B's critical role is further illustrated by the fact that it is the target of several antivirals under preclinical development (23-26). Interestingly, in the case of DENV, NS4B-containing CMs make contacts with mitochondria whose morphology is elongated upon infection or NS4B expression (20, 27). These changes in mitochondrial morphodynamics impacted on the morphogenesis of DENV CMs as well as on the efficiency of early innate immune signalling. Importantly, similar mitochondrial elongation was also observed in ZIKV-infected cells and favored viral replication. More recently, ZIKV NS4B was shown to inhibit neurogenesis in NPCs (28). This suggests that NS4B-enriched CMs might contribute to neuropathogenesis in the infected brain and hence, represent an attractive drug target. A mass spectrometry-based interactomic approach has recently showed that DENV NS4B associates with the host AAA+ ATPase valosin-containing protein (VCP or p97) in infected cells (20). However, this interaction was never validated and its potential relevance during the infection not further investigated. Since DENV and ZIKV NS4B are genetically close, ZIKV NS4B might also interact with VCP. VCP is an ubiquitous, abundant and multifunctional protein which is involved in maintaining protein homeostasis (proteostasis) by retro-translocating ER or mitochondrial proteins to the cytosol, unfolding proteins for degradation and disassembling protein aggregates (29-31). VCP has also important functions in autophagy-associated mitochondrial morphology and oxidative respiration (32-36), two features modulated by DENV and/or ZIKV (20, 27). VCP contains a N-terminus regulatory domain and two ATPase domains (D1 and D2) which mediate hexamerization to form the ring-shaped active enzyme (29-31). Interestingly, several missense mutations of VCP in patients are associated with important disorders of both central and peripheral nervous systems. Indeed, they cause a late-onset multisystem proteinopathy, also called IBMFPD/ALS which manifests in patient as frontotemporal dementia, classical amyotrophic lateral sclerosis, inclusion body myopathy and Paget's disease of bone, alone or in combination

(29-31). Several of these mutations are associated with distinct defects in VCP function. Accordingly, treatments with VCP inhibitors can rescue the defects associated to these mutants both in patient fibroblast and *in vivo* in insect models (36). Finally, the knockdown of VCP zebrafish orthologue CDC48 impairs neuronal outgrowth and induces neurodegeneration in the larva *in vivo* (37). Considering the important roles of VCP in both peripheral and central nervous systems, two targets of ZIKV, we hypothesized here that ZIKV co-opts this host factor for the benefit of its replication.

In this study, we demonstrate that VCP interacts with ZIKV NS4B and regulates the viral replication cycle. In addition, we show that VCP is relocalized into ZIKV-induced CMs which contain NS3 and presumably NS4B. Strikingly, CM morphology and abundance are profoundly and rapidly altered upon pharmacological inhibition of VCP. We also show that ZIKV NS3 and NS4B interact similarly to DENV proteins. While VCP inhibition does not influence this interaction, it is associated with a dramatic decrease of NS3 expression accounting for the loss of NS3/NS4B-positive remodeled ER. Finally, we show that VCP inhibition results in the loss of ZIKV-induced mitochondrial elongation of mitochondria and is associated with increased ZIKV-induced apoptosis. Overall, this study identifies VCP as an important host factor during ZIKV replication which considering its implication in several neurological diseases, may contribute to ZIKV pathogenesis.

3.7 RESULTS

VCP interacts with NS4B during ZIKV life cycle

Previous quantitative interactomic analyses in infectious conditions and NS4B-expressing cells identified VCP as a DENV NS4B interaction partner (20, 38). Considering that ZIKV NS4B and DENV NS4B are genetically close (54% identity between ZIKV H/PF/2013 NS4B and DENV2 16681 NS4B), we hypothesized that ZIKV NS4B also interacts with VCP. To test this, Huh7.5 liver carcinoma cells were infected with ZIKV contemporary strain H/PF/2013 (isolated during the 2013 French Polynesia ZIKV outbreak). Seventy-two hours later, co-immunoprecipitation assays were performed and the resulting eluates were analyzed using western blotting. NS4B was successfully detected when endogenous VCP was purified with anti-VCP antibodies (Fig 1A). As specificity controls, no NS4B was detected in the uninfected condition (mock) or when anti-HA antibodies were used. To confirm that NS4B and VCP interact during the life cycle, we performed proximity ligation assays (PLA) which allow the detection of direct protein-protein interactions (distance < 40 nm) using confocal microscopy. We used anti-VCP and anti-NS4B antibodies for the assay and following amplification, VCP/NS4B interactions were visualized as white dots (Fig 1B). While very low abundance of positive signal was detected in the uninfected condition or when only one antibody was used in the assay, PLA signals were specifically visualized when cells were infected with ZIKV (Fig 1C) confirming that NS4B and VCP interact during the life cycle likely in a direct manner. To determine whether NS4B/VCP interaction requires other ZIKV proteins, we transiently expressed HA-tagged NS4B with its 2K signal peptide (2K-NS4B-HA) or as a NS4A-NS4B precursor (NS4A-NS4B-HA)(Fig. 1D) in Huh7.5-T7 cells (see Materials and Methods section). Overexpressed NS4B proteins were immunoprecipitated using anti-HA antibodies and resulting eluates were analyzed using western blotting (Fig. 1E). While no VCP was detected when the empty vector was transfected or untagged NS4A-NS4B protein was expressed, it specifically co-purified with 2K-NS4B-HA or NS4A-NS4B-HA demonstrating an interaction between transiently expressed proteins. Overall, these data demonstrate that NS4B and VCP associate even in the absence of other ZIKV proteins.

VCP regulates ZIKV life cycle

To test whether VCP is a host dependency factor for ZIKV replication, we decreased its expression in Huh7.5 using RNA interference (RNAi). Cells were transduced with lentiviruses whose delivered genome expressed short hairpin RNAs (shRNA) targeting VCP mRNA. We identified two shRNA (shVCP #1 and #2) which decreased VCP protein expression (Fig. 2A)

without inducing major cytotoxicity as measured by MTT assays (Fig 2B). To monitor a potential impact on viral replication, we used a previously described ZIKV reporter virus (ZV-R2A, based on the 2010 FSS13025 Cambodian strain)(39) which expresses the *Renilla reniformis* luciferase (Rluc) in frame with the polyprotein (Fig 2C). Rluc activity in infected cells is directly proportional to ZIKV polyprotein expression and hence, can be used as a surrogate marker of viral replication. Cells in which VCP expression was knocked-down or expressing a non-targeting shRNA (shNT) were infected with ZV-R2A. Two days later, Rluc assays were performed. When VCP expression was decreased with either shRNA, Rluc activity was significantly reduced by 60% (Fig 2D) indicating an impairment of ZIKV replication. To assess whether the ATPase activity of VCP was required for its regulatory role in ZIKV replication, we treated Huh7.5 cells infected with ZIKV H/PF/2013 for 24 hours with low concentration (50 nM) of NMS-873, a selective allosteric non-ATP-competitive inhibitor of VCP ATPase activity. At 48 hours post-infection, infectious viral titers were determined by plaque assays. Cell viability was not impacted at this concentration of NMS-873 (Fig. 2E) while treatments with higher doses of the drug were cytotoxic after 24 hours (CM, AA and LCC, unpublished data). VCP inhibition led to a significant decrease in ZIKV titers confirming the important role of this host factor during viral replication. As control, treatment with the flaviviral NS5 inhibitor NITD008 (40, 41) almost completely abrogated viral replication.

VCP accumulates into NS4B-positive sub-structures in ZIKV-infected cells.

We next evaluated whether ZIKV influences the cellular distribution of VCP during the infection using confocal microscopy. In uninfected cells, VCP showed a diffuse distribution throughout the cell with no obvious accumulation in any specific compartment (Fig 3A). Strikingly, in ZIKV-infected cells, a fraction of VCP did redistribute into cytoplasmic NS4B-positive foci. This did not correlate with any changes in VCP expression or appearance of shorter byproducts (potentially generated by NS3 protease activity) over three days of infection as monitored by western blotting (Fig. 2F). Importantly, VCP similarly colocalized with transiently expressed HA-tagged 2K-NS4B or NS4A-NS4B (Fig. 3B) suggesting that NS4B induces VCP redistribution in infected cells through a direct interaction. It is well accepted that large ultrastructures induced by flaviviruses observed by confocal microscopy are constituted of remodeled ER that contain viral replication organelles.

In case of DENV, the large puncta visualized by fluorescence microscopy that contained both NS4B and NS3 were demonstrated to be CMs using correlative light-electron microscopy (20). To test whether VCP accumulates in ZIKV CMs, we performed immunogold labeling of VCP in mildly permeabilized ZIKV-infected cells which were subsequently processed for transmission

electron microscopy imaging. Figure 4A shows that VCP-specific gold staining could be readily detected at the surface of ZIKV CMs confirming that VCP associates with this RF substructure. As control, we also detected NS3 with CMs (Fig 4B) consistently with the reported localization of DENV NS3 (22). However, most probably because of epitope inaccessibility due to the low permeabilization conditions, very little signal for both VCP and NS3 was detected inside the CMs. Overall, our data clearly show that VCP associates with CMs in ZIKV-infected cells.

VCP ATPase activity is important for ZIKV replication factory stability.

Considering that VCP accumulates into ZIKV RFs, we have tested the hypothesis that its ATPase activity regulates the biogenesis of these NS4B-rich cytoplasmic structures using a pharmacological inhibition approach. We chose this strategy instead of several day-long VCP downregulation approach since the latter resulted in a viral replication decrease (Fig. 2). Hence, in such context, we would not be able to rule out that any vRF-related phenotype would result from a decreased input of viral proteins. To test our hypothesis, Huh7.5 cells were infected with ZIKV H/PF/2013. At 48 hours post-infection, a time point in which RF are established (15), cells were treated for 4 hours with high concentrations of NMS-873. Cells were then fixed and prepared for imaging using confocal or transmission electron microscopy. While NS4B-positive cytoplasmic puncta were expectedly observed in DMSO-treated cells, they appeared to be less abundant and smaller upon NMS-873 treatment (Fig. 5A). As control, viral dsRNA, the viral replication intermediates was still readily detected in infected cells and a relatively short treatment with NMS-873 did not drastically decrease overall polyprotein expression (as monitored by western blotting in Fig. 8C). This indicates that 4 hour-long VCP inhibition seems to specifically impact NS4B puncta stability rather than on replication. Most importantly, when analyzed at the ultrastructural level using transmission electron microscopy, the architecture of ZIKV vRFs in NMS-873-treated cells was strikingly altered (Fig. 5B). Indeed, CM size and abundance were significantly reduced in NMS-873-treated cells (Fig. 5C, D). The remaining CM exhibited a relaxed morphology with less tightly packed ER membranes as compared to the DMSO control (Fig. 5B, bottom left panel). Upon NMS-873 treatment, we also observed accumulation of small vesicles often located in the perinuclear region (Fig. 5B, bottom middle and right panels), which might originate from disrupted CMs. Finally, while we detected VPs in the infected control condition (Fig. 5B, upper right panel), we could not find any of these ultrastructures in cells treated with NMS-873. This phenotype was obvious but low preservation and occurrence of VPs in DMSO-treated cells did not allow for statistically reliable quantification. Altogether, these data show that VCP ATPase activity is important for ZIKV CM maintenance.

ZIKV NS4B interacts with NS3 during the infection.

We and others have previously shown that DENV NS4B and NS3 interact and that they colocalize within CMs in infected cells (17, 18, 20, 22, 42). Considering the genetic proximity between DENV and ZIKV NS4B proteins, we hypothesized that ZIKV NS3 and NS4B interact as well. To test this, extracts from ZIKV-infected Huh7.5 cells were subjected to immunoprecipitation using anti-NS3 antibodies. Western blot analysis of the eluates shows that NS4B successfully co-purified with NS3 (Fig. 6A) demonstrating that NS3 and NS4B associate during ZIKV infection. The signal was specific since no NS4B was detected when mouse anti-HA antibodies or extracts from uninfected cells were used for the pull-down. This observation was confirmed by the reciprocal experiment in which NS3 was co-immunoprecipitated when anti-NS4B antibodies were used for the pull-down (Fig. 6B). In line with this result, NS3/NS4B complexes were specifically detected in ZIKV H/PP/2013- or MR766-infected cells using proximity ligation assays with anti-NS4B and anti-NS3 antibodies (Fig. 6C, D). Consistently, ZIKV H/PP/2013 NS3 and NS4B colocalized within the same large cytoplasmic structures that also contained VCP (Fig. 6E) and are most likely CMs according to our immunogold staining/electron microscopy data (Fig. 4).

To evaluate whether NS3 and NS4B can interact in the absence of RNA replication or of other viral proteins, we generated a Huh7.5-T7 cell line that stably expressed ZIKV NS3 with its co-factor NS2B (Fig. 7A). Following overexpression of the NS4A-NS4B precursor, NS2B/3 protease activity in cells was evidenced by the accumulation of a NS4B mature product which migrated at the same molecular weight than overexpressed NS4B (2K-NS4B condition) as compared to the parental Huh7.5-T7 cell line (Fig. 7B). We then performed co-immunoprecipitations with anti-HA antibodies. NS3 was readily detected in eluates when HA-tagged NS4A-NS4B precursor was pulled down (Fig. 7C). This signal was specific since NS3 was undetectable when we used extracts from cells expressing untagged NS4A-NS4B or transfected with an empty plasmid. Strikingly, we could not detect in this experimental set-up an interaction with mature NS4B suggesting that NS4A-NS4B processing by NS3 is required for the interaction during infection. Altogether, these results show that, similarly to DENV, ZIKV NS4B and NS3 interact with each other during the infection.

VCP ATPase activity regulates NS3 expression but not NS4B/NS3 interaction.

Assuming that NS3 and NS4B associate most likely within CMs, which are disrupted upon VCP inhibition, we tested whether NMS-873 treatment impacts on NS3/NS4B interaction. To do so, we treated Huh7.5-T7 cells expressing NS2B/3 protease and HA-tagged NS4A-NS4B precursor, with NMS-873 during 4 hours before performing immunoprecipitations directed against HA antigen.

Figure 8A shows that NS3/NS4B interaction was maintained upon NMS-873 treatment demonstrating that VCP ATPase activity is not required for the stability of this complex. Consistent with a VCP-independent NS3/NS4B interaction, the few remaining NS4B-containing puncta in infected and drug-treated cells (see also Fig. 5) also contained NS3 (Fig. 8B). This strongly suggests that the destabilization of CMs by NMS-873 treatment is not the result of a disruption of NS3/NS4B complex.

We next investigated whether NMS-873-induced disruption of CMs correlates with any changes in the expression of viral proteins. Huh7.5 cells were infected with ZIKV H/PF/2013 and treated two days later with NMS-873. Viral protein expression was analyzed and quantified using western blotting (Fig. 8C, D). In contrast to NS4B, NS1, NS5, C and E, NS3 levels were drastically reduced upon drug treatment. Altogether, these results demonstrate that VCP ATPase activity is required for proper NS3 stability but not for its association with NS4B. This phenotype most probably accounts for the observed loss of NS4B/NS3-positive CMs upon NMS-873 treatment.

ZIKV-induced mitochondria elongation depends on VCP ATPase activity.

Both ZIKV and DENV induce the elongation of mitochondria, a phenotype that was recapitulated upon NS4B transient expression (20, 27)(WF and LCC, unpublished data). In case of DENV, elongated mitochondria make contacts with CM and regulate their biogenesis. Moreover, it was showed that mitochondrial elongation favors ZIKV and DENV replication. Considering that VCP inhibition disrupts CMs and potentially the CM/mitochondria interface, we investigated whether this correlated with a loss of ZIKV-induced modulation of mitochondrial morphodynamics as well. ZIKV-infected cells were treated with NMS-873 exactly as above and analyzed for mitochondrial morphology using antibodies directed against the mitochondrial heat shock protein GRP75 (Fig 9). As expected, when cells were treated with DMSO, ZIKV infection induced a marked elongation of mitochondria as compared to uninfected cells. When infected cells were treated with NMS-873, the NS3 puncta were reduced in number and size consistent with the results described above. More importantly, the mitochondria elongation phenotype was lost in those cells since mitochondria morphology resembled the one observed in uninfected cells. This shows that VCP is important for ZIKV modulation of mitochondria morphodynamics and strongly supports the previously proposed model of a functional CM/mitochondria interface regulating ZIKV life cycle.

VCP activity inhibits ZIKV-induced cell death by apoptosis.

ZIKV is a cytopathic virus which induces cell death at late time points of infection. On the one hand, mitochondria play a major role in apoptosis and their fragmentation has been often

proposed to potentiate this process (43-45). On the other hand, it was proposed that the communication between CMs and elongated mitochondria allows the attenuation of cellular processes potentially detrimental for optimal virus replication, such as innate immunity (17) or premature cell death. Considering that VCP inhibition resulted in CM destabilization and loss of mitochondria elongation, we hypothesized that the disruption of this CM/mitochondria axis would result in enhanced cell death. To test this, we infected cells with ZIKV and treated them with NMS-873 during 4 hours as above. Cells were then labeled for NS3, caspase 3/7 activity was detected using the CellEvent reagent and the % of cells with a ruptured plasma membrane (i.e. dead cells) was determined using LIVE/DEAD assays. All these parameters were quantified and analyzed using flow cytometry. Using this NS3 detection assay, we determined that the infection efficiency was about 70% (Fig 10A). NMS-873 treatment of uninfected cells and ZIKV infection induced only minor cell death (Fig. 10B). In stark contrast, When the gating was performed on infected cells only (i.e. NS3+ cells), NMS-873 treatment increased the % of apoptotic dead cells (caspase 3/7+; live/dead+) from 0.4% to 4.26%. This VCP-dependent increase of caspase activation and of cell death in infected cells was representative of 2 experiments (Fig. 10C, D). Overall, these results show that VCP activity is required to limit ZIKV-induced cytopathic effects, a process that most likely requires VCP-containing CMs.

3.8 DISCUSSION

In this study, we demonstrate that the AAA+ ATPase VCP/p97 is required for efficient ZIKV replication using both pharmacological inhibition and expression knockdown approaches. Interestingly, VCP was previously shown to be important for the replication of West Nile virus, another neurotropic *Flavivirus*, and the *Hepacivirus* hepatitis C virus (HCV), both belonging to the *Flaviviridae* family like ZIKV (46-48). In addition, the life cycle of positive strand RNA viruses from other families, such as infectious bronchitis virus (*Coronaviridae*), Sindbis virus (*Togaviridae*), Rift Valley fever virus (*Bunyaviridae*) and poliovirus (*Picornaviridae*) is also regulated by VCP (24, 49-51). Nevertheless, in all cases (except for poliovirus), it appears that this host factor is coopted during other viral processes than vRF biogenesis and/or stability like ZIKV (see below). VCP main function is to target specific substrates to proteasome-mediated degradation. Hence, VCP dependency of ZIKV replication is consistent with the fact that proteasome activity is required for an efficient flavivirus life cycle *in cellulo* and *in vivo* (52-55).

We further show that VCP associates with ZIKV protein NS4B in both infected and NS4B-overexpressing cells. Such interaction appears to be conserved within the *Flavivirus* genus since it was previously identified in two independent large-scale DENV NS4B interactome analyses (20, 38). Flaviviral NS4B is a crucial non-enzymatic viral replication co-factor although its precise functions during vRNA amplification remain enigmatic. We show in this study that ZIKV NS4B and NS3 interact. In the case of DENV, a comprehensive analysis of an NS4B alanine scanning and of compensatory mutations has demonstrated that the replication efficiency of the mutated vRNA perfectly correlated with the extent of NS4B/NS3 association (17). Specific residues in NS4B cytosolic loop, such as Q134, G140 and M142 constitute critical determinants of these two processes (17, 18). So, considering the high degree of conservation of these NS4B residues across multiple isolates and flavivirus species, it is most likely that the interaction between ZIKV NS4B and NS3 requires the integrity of NS4B cytosolic loop. Furthermore, it is believed that the expression and/or maturation of NS4B, as a transmembrane ER-resident protein, is important for the biogenesis of vRFs (21, 22, 56-58). This is most likely achieved through interactions between NS4B and host factors as well as NS3, NS4A and NS1 (17, 18, 59, 60). Consistently, as shown for DENV in previous reports and for ZIKV in this study, both NS4B and NS3 colocalize in large cytoplasmic structures identified as CMs (20, 22, 61). Hence, our data support the current model implicating NS4B in vRF biogenesis.

VCP accumulation with ZIKV CMs led to the hypothesis that this host factor might influence the stability of this vRF substructure. To test this, we performed short treatments with NMS-873, a

pharmacological inhibitor of VCP ATPase activity. In a 4-hour treatment set-up, no drastic effect on cell viability was observed. Moreover, no major changes in the levels of most viral proteins were observed (Fig. 8). This indicates that the observed phenotypes on vRFs were not due to defects in overall replication or polyprotein input. Very interestingly, NMS-873 treatment had a drastic impact on the morphology, size and abundance of CMs in ZIKV-infected cells as observed in TEM micrographs (Fig. 5). This suggests that VCP ATPase activity is important for the stability and/or the biogenesis of CMs. Interestingly, live cell imaging of CM in DENV-infected cells previously showed that the morphology of this vRF sub-structure is highly dynamic since their size can increase or decrease within a few hours. CM fusion and division events could also be observed (20). Interestingly, pharmacological inhibition of VCP inhibits HCV replicase activity and induces an aggregation of VCP-interacting viral protein NS5A (47). NS5A is a component of HCV vRF, namely double-membrane vesicles and is a crucial cofactor of their morphogenesis as well as of viral replication (62, 63). Although potential contributions of VCP in HCV or WNV vRF fate were never reported, it is tempting to speculate based on our results that VCP contribution to the biogenesis of vRFs overlaps with several *Flaviviridae* family members. Very strikingly, NMS-873 treatment of infected cells drastically decreased NS3 expression levels in contrast of those of all other tested ZIKV proteins (NS5, NS4B, NS1, E and C). This strongly suggests that this loss of expression in such short time is specific to ZIKV NS3 and that this is not due to an inhibition of vRNA synthesis or polyprotein stability and/or translation *per se*. Considering that VCP mainly functions in proteostasis, it is most likely that this host factor regulates NS3 stability. Interestingly, the NS4B/NS3 complex was insensitive to NMS-873 treatment when expressed alone. This demonstrates that VCP enzymatic activity: i) is not required for the stability of this complex and, ii) most probably regulates NS3 expression only in the context of ZIKV replication during which vRFs are formed. This supports a model in which NS4B hijacks VCP towards CMs in order to maintain NS3 stability.

Considering that VCP functions are generally linked to proteasome-mediated degradation, it was surprising to observe that VCP inhibition decreased the levels of NS3 in infected cells instead of stabilizing it. This suggests that VCP-mediated stabilization of NS3 might be an indirect consequence of VCP action on other substrates. VCP was shown to be important for the maturation of autophagosomes, more precisely in their targeting to lysosome in which their cargo is degraded (64-66). Several studies showed that autophagy is induced during ZIKV and other flavivirus infection (67-69). In the case of ZIKV, the combined expression of NS4B and NS4A or of the NS4A-NS4B precursor induces autophagy (28). In DENV-infected cells, the fusion between autophagosomes and lysosome is inhibited resulting in the stabilization of the cargo (70). If this

is also true for ZIKV, one might hypothesize that VCP is hijacked to CM to modulate its activity in the late steps of autophagy and prevent the degradation of viral proteins by the autophagy machinery. In addition, using a comparative proteomic analysis using VCP drugs, it was shown that the ER-shaping protein reticulon (RTN) 4 is a specific substrate of VCP (71). More recently, one study showed that RTN3.1A is an important regulator of WNV, ZIKV and DENV vRF biogenesis and/or morphology (72). Hence, it is conceivable that VCP implication in CM maintenance is linked to its activity towards host factors involved in ER membrane curvature.

The disruption of CMs upon VCP inhibition correlated with a loss of mitochondrial elongation usually induced by ZIKV. These data are in line with the model envisioning a morphological and functional interplay between CMs and mitochondria. Indeed, in the case of DENV, it was previously shown that ER-derived CMs and elongated mitochondria establish physical contacts. In addition, genetic or chemical modulations of mitochondria morphodynamics severely impact on the morphogenesis and the stability of DENV-induced ER-derived ultrastructures (20). Interestingly, several studies have shown that VCP is important for mitophagy (*i.e* autophagy of mitochondria) during which VCP is translocated to this organelle (34, 36, 73). This is generally associated with a global and massive fragmentation of mitochondria which is attributed to the VCP-mediated retrotranslocation and degradation of mitofusin protein (MFN) 1 and 2. In addition, because MFN2 is also involved in ER/mitochondria contacts through dimerization, VCP also alters the reticulo-mitochondrial interface during that process (74). While we show that VCP partly redistributes to CM in infected cells, we never noticed any recruitment to mitochondria, a hallmark of VCP action during mitophagy. Hence, VCP sequestration within CM might counteract its function in mitophagy in order to maintain mitochondria in an elongated state which was shown to be favorable to ZIKV replication (20). In addition, such hijacking might favor the biogenesis of CMs given that they might partly originate from mitochondria-associated ER membranes. More importantly, we show here that VCP inhibition stimulates ZIKV-induced cell death. This supports the model that CMs, in contact with elongated mitochondria, allow to buffer death signals induced by the infection. We propose that upon VCP inhibition, mitochondrial elongation is not maintained, hence leading to fission, a context reported to favor cell death by apoptosis (43-45). Concomitantly with innate immunity dampening (17), the control of cell death by the CM/mitochondria functional unit would provide a cellular environment and a temporal window to the virus to optimally replicate. Finally, VCP is a multifunctional protein involved in protection during stress conditions but it is accepted that its co-factors drive the specificity of its activity (29-31). Hence, it will be interesting to investigate whether ZIKV infection modifies VCP interactome, which could reprogram its activity to delay virus-induced death signals.

Given that VCP has already been shown to be involved in neuronal development and several diseases of both peripheral and central nervous system (29-31, 37), this suggests that ZIKV hijacks VCP functions to impair the differentiation of the infected neural progenitor cells and hence, fetal brain development. This raises the hypothesis that VCP might potentially represent a novel antiviral target to limit ZIKV neurovirulence. Interestingly, while most VCP inhibitors are not suitable for treatments in mammals due to low bioavailability and high clearance, the ATP-competitive inhibitor CB-5083 is effective in mice and is currently challenged in phase I clinical trials for treatment of cancer (in which VCP activity is increased)(75-77). It will be relevant in future studies to evaluate whether such VCP inhibitor alleviates ZIKV replication and congenital neuropathogenesis in murine models. If CB-5083 protects against ZIKV *in vivo*, this drug might be considered for a repurposing for anti-ZIKV therapeutic or prophylactic treatments. In the same line of idea, it would be interesting to study the impact of familial pathological mutations of VCP on the severity of ZIKV-caused symptoms. In the case of a putative correlation between these two, it would be tantalizing to speculate that genetic polymorphisms in infected fetuses may help to predict ZIKV neurovirulence as well as the appearance and the outcome of brain development defects.

3.9 MATERIALS AND METHODS

DNA cloning

To generate NS2B3 and NS4A/NS4B expression constructs, PCR was performed using as template the ZIKV molecular clone pFL-ZIKV-WT containing the sequence of the 2010 FSS13025 Cambodian strain (39). Resulting amplified DNA fragments were inserted into the *Ascl*/*Spel* cassette of pWPI lentiviral vector for the NS2B3 construct and *NcoI*/*Spel* cassette of pTM1 plasmid (20) for the NS4A/NS4B constructs. This plasmid expresses a RNA of interest under the control of the T7 RNA polymerase promoter (see below). In the absence of a cap and a poly-A tail, ZIKV protein expression is driven by an internal ribosome entry site. Primers encoding the HA tag sequence were used for PCR to insert the tag at the C terminus of NS4B (NS4B-HA) or the N terminus of NS4A. Primers sequences are available upon request.

Cells, viruses and reagents

293T, VeroE6 and hepatocarcinoma Huh7.5 cells (a kind gift from Patrick Labonté) were all cultured in DMEM (Thermo-Fisher) supplemented with 10% fetal bovine (Wisent), 1% non-essential amino acids (Thermo-Fisher) and 1% penicillin-streptomycin (Thermo-Fisher).

Huh7.5-T7 cells were generated by transduction of Huh7.5 with lentiviruses expressing T7 RNA polymerase and were cultured in the presence of 5 µg/ml blasticidin (Thermo-Fisher). This cell line allows for cytoplasmic transcription of genes under the control of the T7 promoter, hence avoiding a nuclear step which is detrimental for the expression of ZIKV proteins because of cryptic splicing sites. Thus, this mimics normal protein expression from the viral genome. Huh7.5-T7/NS2B-NS3 cells were generated as described before (17) by transduction of Huh7.5-T7 with lentiviruses expressing ZIKV FSS13025 NS2B-NS3. Transduced cells were cultured in the presence of 5 µg/mL blasticidin and 5 µg/mL puromycin.

ZIKV H/PF/2013 strain was provided by the European Virus Archive goes Global. Virus stocks were generated by amplification in Vero cells following inoculation with an MOI of 0.01. ZIKV FSS13025 Rluc-expressing reporter viruses (39, 78) were generated in VeroE6 cells following electroporation of *in vitro* transcribed RNA genomes. Briefly, following plasmid linearization, *in vitro* transcription was performed using the mMACHINE kit (Ambion) with T7 polymerase. RNAs were purified according to the manufacturer's instructions. Next, subconfluent VeroE6 cells were detached by trypsinization and collected in complete DMEM. The cells were washed once in PBS and resuspended in cytomix buffer (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.6, 25 mM HEPES pH 7.6, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂ pH 7.6

freshly supplemented with 2 mM ATP and 5 mM glutathione) at a density of 10^7 cells/mL. 10 μ g of *in vitro*-transcribed RNA were mixed with 400 μ l of the cell suspension, transferred to an electroporation cuvette (Bio-Rad; 0.4 cm gap width), and pulsed once with a Gene Pulser II system (Bio-Rad) at 975 μ F and 270 V, typically resulting in time constants between 18 and 20 ms. Immediately after pulsing, the cells were transferred to prewarmed complete DMEM and seeded in a 15 cm dish. The next day, the cell culture medium was replaced with complete DMEM. Virus-containing cell culture supernatants were harvested once a day at 4, 5, 6 and 7 postelectroporation, filtered through a 0.45 μ m syringe filter and supplemented with 10 mM HEPES (pH7.5). Virus aliquots were stored at 80°C until use. Infectious titers were determined by plaque assays.

NMS-873 was obtained from Sigma-Millipore. Mouse monoclonal anti-VCP (ab11433) was purchased from Abcam. Rabbit anti-DENV NS4B (GTX124250; cross-reactive for ZIKV), rabbit anti ZIKV NS4B (GTX133311), rabbit ZIKV NS3 (GTX133309) and mouse monoclonal anti-DENV-NS3 (GTX629477; cross-reactive for ZIKV) were obtained from Genetex. Rat polyclonal antibodies targeting DENV2 16681 NS3 which are cross-reactive with ZIKV NS3 were generated at Medimabs, Montréal, Canada). Four Wistar rats were immunized with RRGRIGRNPKNENDQY (residues 457-472) and REIPERSWNSGHEWV (residues 337-351) NS3 KLH-coupled peptides which were designed by Medimabs to maximize immunogenicity and minimize the generation of nonspecific antibodies. Immunization was performed according to the regulation of the CCAC. Rats were subjected to a first intraperitoneal injection with complete Freund's adjuvant followed by three intraperitoneal injections with incomplete Freund's adjuvant. After a final intravenous boost, rat sera were collected and pooled. Polyclonal antibodies were purified by immunogen affinity.

Lentivirus production, titration and transduction

Knock-down of VCP was achieved through transduction with lentiviruses encoding distinct shRNAs targeting VCP mRNA. For production of lentivirus stocks, sub-confluent 293T cells were transfected with packaging plasmids pCMV-Gag-Pol and pMD2-VSV-G and shRNA-encoding pLKO-puro TRCN0000004249 (shVCP #1) or TRCN0000413258 (shVCP #2)(Sigma-Millipore) using 25 kD linear polyethylenimine (Polysciences Inc.). Two days post-transfection, lentivirus-containing medium was collected and filtered. Lentiviruses were titrated by transducing HeLa cells and subsequent treatment with 1 μ g/ml puromycin. Five days later, cells were fixed and stained with 1% crystal violet/10% ethanol for 15-30 minutes. Stained cells were rinsed with water,

colonies were counted and titers calculated taking into account inoculum dilution. Transductions were performed by using a MOI of 5 for Huh7.5 cells in the presence of 4 µg/mL polybrene

Luciferase assays

Huh7.5 cells were seeded in 12-well plates (200,000 cells per well) with 4 µg/mL polybrene and with the different lentiviruses at a MOI of 5. One day later the medium was changed. 2 days post-transduction, cells were infected with reporter virus ZIKV-R2A at an approximate MOI of 0.005. 2 days post-infection (4 days post-transduction), cells were collected in 200 µL lysis buffer (0.1% Triton X-100, 25 mM glycylglycine [pH 7.8], 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA (pH 8), and 1 mM DTT). For each well, 30 µl of the lysate were each mixed with 150 µl of assay buffer (25 mM glycylglycine (pH 7.8), 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA (pH 8), 15 mM K₂PO₄ [pH 7.8]) with coelenterazine (1.43 µM final concentration)(Prolume). The luminescence was measured using a Spark® multimode microplate reader (Tecan). The assay was performed in triplicate for each condition.

Cell viability assays

Cell viability was evaluated using MTT assays. Huh7.5 were plated in 96-well plates (7,500 cells per well) with 4 µg/mL polybrene and with the different lentiviruses at MOI of 5. One day later the medium was changed and after 4 days, 20 µL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) at 5 mg/mL was added in the medium for 1 to 4 hour at 37°C. Medium was removed and 150 µL of 2% (v/v) of 0.1 M glycine in DMSO (pH 11) was added to dissolve the MTT precipitates. Absorbance at 570 nm was read with Spark® multimode microplate reader (Tecan) with the reference at 650 nm.

Plaque assays

2.10⁵ VeroE6 cells were seeded in 24-well plaques. The day after, cells were infected in duplicates with 200 µL virus samples that had been serially diluted 10¹ to 10⁶ fold in complete DMEM. Two hours post-infection, the media was removed and cells were cultured at 37°C with serum-free MEM (Life Technologies) containing 1.5% carboxymethylcellulose (Sigma-Millipore). After 5 days, cells were fixed during 2 hours in 2.5% formaldehyde. After several washes with tap water, cells were stained with 1% crystal violet/10% ethanol for 15-30 minutes. Stained cells were gently washed with tap water, plaques were counted and titers of infectious virus were calculated in PFU/mL.

Transfection

For co-immunoprecipitation assays, Huh7.5-T7 or Huh7.5-T7/ NS2B-NS3 cells were cultured in 10 cm petri dishes ($2 \cdot 10^6$ cells per petri dish) and transfected with 12 μg of DNA and 36 μl of TransIT-LT1 Transfection Reagent (Mirus, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. After 4 hours of transfection, the culture medium was changed. Cells were collected 18-20 hours post-transfection. When indicated, cells were treated with 10 μM NMS-873 or DMSO during 4 hours before collecting. For immunofluorescence studies, Huh7.5-T7 cells were cultured on glass coverslips in a 24-well petri dishes (25,000 cells per well) and transfected with 0.5 μg of pTM-based plasmid and, 1.5 μl TransIT-LT1 Transfection Reagent (Mirus, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. Cells were treated exactly as described above.

Immunofluorescence-based confocal microscopy

Infected or transfected cells were grown on glass coverslips, washed twice with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, and permeabilized with PBS-0.2% Triton X-100 for 15 min. After 1 hour of blocking with PBS containing 5% bovine serum albumin (BSA) and 10% goat serum (Thermo-Fisher), coverslips were incubated with primary antibodies for 2 hours at room temperature in the dark. The cells were washed three times in PBS and incubated with Alexa Fluor (488, 568 or 647)-conjugated secondary antibodies (Life Technologies) for 1 hour at room temperature in the dark. The coverslips were subjected to three 15-minute washes with PBS, and the nuclei were stained with 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Life Technologies). After three rapid final washes with PBS, the coverslips were mounted on slides with FluoromountG (Southern Biotechnology Associates). The cells were examined, and images were acquired using a LSM780 confocal microscope (Carl Zeiss Microimaging) at the Confocal Microscopy Core Facility of the INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie. Images were processed with the Fiji software.

Co-immunoprecipitation assays

For anti-HA immunoprecipitation, transfected cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), collected, and lysed during a 20 minutes on ice in a buffer containing 0.5% Dodecyl-B-D-maltoside, 100 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7.5), 50 mM NaF and EDTA-free protease inhibitors (Roche). The lysates were centrifuged during 15 minutes at 13,000 rpm at 4°C and supernatants were collected. Resulting cell extracts were incubated with 50 μl of a 50/50 slurry of mouse monoclonal anti-HA coupled to agarose beads (Sigma-Aldrich) for 3 hours. The resin was washed twice with lysis buffer and twice with 50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl. Immunocomplexes were collected by a first elution with PBS-5% SDS, followed by a second elution with PBS. The pooled eluates were precipitated overnight at -20°C by adding 4 volumes

of acetone. The precipitated proteins were sedimented by centrifugation for 1 h at 13000 rpm. The protein pellets were air-dried, dissolved in loading buffer, subjected to SDS PAGE and western blot analysis.

For immunoprecipitation following infection, washed cells were lysed during 20 minutes on ice in a buffer containing 50 mM Tris (pH 7.8-8), 150 mM NaCl, 0.5% NP40 and EDTA-free protease inhibitors. The lysates were centrifuged during 15 minutes at 13,000 rpm at 4°C. Cell lysates were incubated with the indicated antibodies over night at 4°C. Then, 50 µl of a 50/50 slurry of protein G-Sepharose (Sigma-Aldrich) were added in the lysate. After a 1 hour incubation at 4°C, the resin was washed 4 times with lysis buffer and the immunocomplexes were collected and precipitated as indicated above.

Proximity ligation assays

Infected cells were grown on glass coverslips, washed twice with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde/PBS, and permeabilized with PBS-0.2% Triton X-100 during 20 min. Proximity ligation assays were performed using the Duolink® PLA Kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were blocked in a humidity chamber for 1 hour at 37°C then incubated with the primary antibodies for 2 hours at room temperature. Cells were washed twice and incubated with PLUS and MINUS PLA probes in a humidity chamber for 1 hour at 37 °C. After two additional washes cells were incubated in a humidity chamber with ligation solution for 30 minutes and then with the amplification solution for 100 minutes. After the final washes the coverslips were prepared for imaging with the DAPI-containing Mounting Media and imaged with a LSM780 confocal microscope (Carl Zeiss Microimaging). Image analysis and PLA dot counting were performed with the Fiji software.

Transmission electron microscopy

Huh7.5 were grown on Lab-tech® chamber Slide™ (Thermo Fisher) and infected with ZIKV H/PF/2013 at a MOI of 20. 48 hours later, cells were treated with either 20µM NMS-873 or 0.2% DMSO. 48h post infection, samples were fixed overnight at 4°C in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.4, and washed three times with washing buffer. Samples were postfixed with 1% aqueous OsO₄ + 1.5% aqueous potassium ferrocyanide for 1 h and washed three times with washing buffer. Specimens were dehydrated in a graded ethanol-dH₂O series until 70%, then block stained with 2% uranyl acetate in 70% ethanol for 1 hr. Samples were washed twice with 70% ethanol followed by continued dehydration to 100% ethanol. The samples were infiltrated with a graded Epon-ethanol series (1:1, 3:1), embedded in 100% Epon and

polymerized in an oven at 60°C for 48 h. Ultrathin serial sections (90–100 nm thick) were prepared from the polymerized blocks with a Diatome diamond knife using a Leica Microsystems EM UC7 ultramicrotome, transferred onto 200-mesh copper grids, and stained with 4% uranyl acetate for 6 min and Reynold's lead for 5 min. TEM grids were imaged with a FEI Tecnai G2 Spirit 120 kV TEM equipped with a Gatan Ultrascan 4000 CCD Camera Model 895 (Gatan, Pleasanton, CA) located at the McGill University Facility for Electron Microscopy Research. ZIKV CM analysis was performed using the Fiji software.

Immunogold staining

Huh7.5 were grown on glass coverslips in 24 wells-plates and infected with ZIKV H/PH/2013 at a MOI of 20. Forty-eight hours later, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and permeabilized 0.05% saponin in PBS for 5 minutes at room temperature. After 2 washes with PBS, cells were blocked with TBS containing 2% bovine serum albumin and 10% goat serum for 30 minutes at room temperature. Coverslips were then incubated with mouse anti-VCP or (Abcam; ab11433) or in-house rat anti-NS3 antibodies in TBS-BSA 2% overnight at 4°C. Samples were washed 3 times in TBS and incubated overnight at 4°C with goat anti-mouse secondary antibody labeled with 10-nm gold particles (Abcam; ab27241) for the VCP samples or with the goat anti-rat secondary antibody labeled with 12-nm gold particles (Abcam; ab105301) for the NS3 samples (1:25 dilution). After 3 final washes in TBS, samples were fixed overnight at 4°C with 2.5% glutaraldehyde in 0.05 M cacodylate (pH 7.4). Within 3 days, samples were processed as described above (without the final uranyl acetate step) and visualized using a FEI Tecnai G2 Spirit Transmission Electron Microscope.

Flow cytometry assays

Huh7.5 cells were trypsinized and stained with the appropriate predetermined concentrations of CellEvent caspase-3/7 green and the amine reactive viability dye LIVE/DEAD aqua fixable stain (ThermoFisher) for 30 min in the dark at room temperature. After fixation with 2% formaldehyde and permeabilization with 0.1% Triton X100, intracellular staining for NS3 using a rat polyclonal anti-NS3 and detection with a goat anti-rat cross-adsorbed AlexaFluor 647-conjugated secondary antibody were performed. Cells were fixed again in PBS containing 1% formaldehyde and stored at 4 °C in the dark until FACS analysis (performed within 12 h). Data were acquired on a CytoFlex instrument (Beckman Coulter) equipped for the detection of nine fluorescent parameters. Data analysis was performed using FlowJo version 10.0 software. After setting of singlets, infected Huh7.5 were defined as NS3+ cells and analyzed for active caspase-3/7 expression and plasma membrane integrity.

Ethics Statement

The rats used for the generation of antibodies were entirely handled by the company Medimabs (Montréal, Canada) following the protocol #951 (entitled « Production d'anticorps monoclonaux chez les rongeurs ») approved by the « Comité Institutionnel de Protection des Animaux » (CIPA, translated as Institutional Committee for Animal protection) of the Université du Québec à Montréal (UQÀM). This animal care and use protocol strictly adhered to the guidelines and regulations of the Canadian Council on Animal Care.

Statistical analysis

All Student t-tests were unpaired and two-tailed. *: p-value<0.05; **: p-value<0.01; ***: p-value<0.001; NS: not significant.

3.10 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Alessia Ruggieri (University of Heidelberg), Dr. Mirko Cortese (University of Heidelberg), Dr. Pietro Scaturro (Technical University of Munich) and Dr. Karine Boulay (University of Montréal) for technical advice and the critical reading of the manuscript. We are grateful to Dr. Pei-Yong Shi and the World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses (WRCEVA) for providing the ZIKV reporter system, and Dr. Ralf Bartenschlager (University of Heidelberg) for the T7 polymerase-expressing lentiviral construct and pTM plasmids. We thank the European Virus Archive goes Global (EVAg) and Dr. Xavier de Lamballerie (Emergence des Pathologies Virales, Aix-Marseille University) for providing ZIKV MR766 and H/PF/2013 original stocks. We are grateful to Dr Patrick Labonté (Institut National de la Recherche Scientifique), Dr Tom Hobman (University of Alberta) and Dr Anil Kumar (University of Alberta) for generously providing Huh7.5 and Vero E6 cells. We thank Jessy Tremblay at the Centre Armand-Frappier Confocal Microscopy Facility for help and training during imaging, Jeannie Mui at the McGill University Facility Facility for Electron Microscopy Research for sample preparation and considerable assistance during imaging. We are thankful to Benoit Lacoste and Pierre-André Scott at Medimabs (Montréal, Canada) for generating rat anti-NS3 antibodies. AA is a recipient of a master's training fellowship from Fonds de la Recherche du Québec-Santé (FRQS). NT is supported by a postdoctoral scholarship and LCC is receiving a research scholar (Junior 2) salary support, both from FRQS. This research was supported by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC; RGPIN-2016-05584), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; PJT153020; ICS154142), Fonds de la Recherche du Québec-Nature et Technologies (FRQNT; 2018-NC-205593), Armand-Frappier Foundation and Institut National de la Recherche Scientifique to LCC.

3.11 FIGURE LEGENDS

Figure 1: ZIKV NS4B interacts with VCP. (A) Huh7.5 cells were infected with ZIKV H/PF/2013 (MOI= 10) or left uninfected. 72 hours post-infection, cell extracts were prepared and subjected to immunoprecipitation with mouse anti-VCP antibodies or mouse anti-HA antibodies as specificity control. Resulting eluates and cell extracts were analyzed by western blotting using the indicated antibodies. (B) Huh7.5 were infected with ZIKV H/PF/2013 (MOI=5), ZIKV MR766 (MOI=1) or left uninfected. 48 hours post-infection, cells were fixed, subjected to proximity ligation assays (PLA) using ZIKV-cross-reactive rabbit anti-DENV NS4B and mouse anti-VCP antibodies and analyzed using confocal microscopy. Infected cells were detected with rat anti-NS3 antibodies (green). (C) From two independent experiments, the amount of PLA puncta was quantified for each condition including single antibody staining controls. Mean with standard error to the mean (SEM) are also indicated as black lines. (D) Schematic representation of different transfected EMCV IRES-driven ZIKV NS4B constructs used for the immunoprecipitation. The full length polyprotein is shown as a reference. (E) Huh7.5-T7 cells were transfected with the indicated constructs. 18 hours post-transfection, cell extracts were prepared and subjected to immunoprecipitation with mouse anti-HA antibodies. Resulting eluates and cell extracts were analyzed by western blotting using the indicated antibodies.

Figure 2: VCP regulates ZIKV replication. (A) Huh7.5 cells were transduced with lentiviruses expressing a non-targeting shRNA (shNT) or shRNAs targeting VCP mRNA (shVCP #1 and shVCP #2). Transduced cells were selected with puromycin. 4 days post-transduction, VCP expression was analyzed using western blotting. (B) Huh7.5 cells were transduced with the lentiviruses of (A) (MOI=5). 4 days post-transduction, cell viability was assessed using MTT assays (C) Schematic representation of the ZIKV reporter molecular clone (FSS13025-derived strain). The Rluc gene was inserted upstream polyprotein sequence. The first amino acids of capsid were introduced at the beginning of the coding sequence to maintain the 5' RNA structural motifs that are required for replication. Between Rluc and polyprotein sequence, the FMDV 2A processing sequence was introduced to allow cleavage between these two proteins post-translationally. (D) Huh7.5 cells were transduced with lentiviruses of (A) (MOI=5). 2 days post-transduction, cells were infected with ZIKV-R2A (MOI=0.01). 2 day post-infection (4 days post-transduction), Rluc assays were performed to measure viral replication. Mean and SEM were calculated on 4 independent experiments. *** : p-value<0.001. (E) Huh7.5 cells were infected with ZIKV H/PF/2013 at a MOI of 0.1 and treated 24 hours later with 50 nM of the VCP ATPase inhibitor NMS-873. 48 hours post-infection (24 hour treatment), infectious viral titers were determined

using plaque assays. In parallel the impact of the treatment with NMS-873 on cell viability on uninfected cells was assessed using MTT assays. *** : p-value<0.001. NS: not significant. (F) Huh7.5 cells were infected with ZIKV MR766, ZIKV H/PF/2013 (MOI=1) or left uninfected. 48 and 72 hours post-infection, cell extracts were prepared and the expression of the indicated proteins was analyzed by western blotting using the indicated antibodies. Anti-DENV NS3 antibodies that are cross-reactive for ZIKV proteins were used.

Figure 3: ZIKV NS4B induces the redistribution of VCP into large cytoplasmic structures.

(A) Huh7.5 cells were infected with ZIKV H/PF/2013 (MOI=1) or left uninfected. 48 and 72 hours post-infection, cells were fixed, labeled with anti-VCP and anti-NS4B antibodies and observed by confocal microscopy. The right panel shows a magnification of an infected cell. (B) Huh7.5-T7 cells were transfected with the indicated constructs. 18 hours post-transfection, cells were fixed, labeled with anti-VCP and anti-NS4B or anti-HA antibodies and observed by confocal microscopy. The right panel shows a magnification of a transfected cell.

Figure 4: VCP and NS3 associate with ZIKV-induced convoluted membranes. Huh7.5 cells were infected with ZIKV H/PF/2013 (MOI=20). 48 hours later, cells were fixed and labeled with either anti-VCP (A) or NS3 (B) antibodies and then with gold-conjugated secondary antibodies. Following preparation, embedding and ultrathin sectioning, cells were imaged using transmission electron microscopy. Arrows show gold-labeled proteins.

Figure 5: The inhibition of VCP ATPase activity alters ZIKV replication factories. (A) Huh7.5 cells were infected with ZIKV H/PF/2013 (MOI=20) or left uninfected. 48 hours post-infection, cells were treated with either DMSO or 20 μ M NMS-873 during 4 hours before fixation. Cells were then labeled with anti-ZIKV NS4B and anti-dsRNA antibodies and observed by confocal microscopy. (B) Huh7.5 cells were treated as in (A) and processed for transmission electron microscopy. Representative images for each condition are shown. From two independent experiments as in (B), the abundance (C) and size (D) of CMs were analyzed. Mean and SEMs were also determined and are indicated as black lines.

Figure 6: ZIKV NS4B interacts with NS3. (A) Huh7.5 cells were infected with ZIKV H/PF/2013 (MOI=20) or left uninfected. 72 hours post-infection, cell extracts were prepared and subjected to immunoprecipitation with ZIKV-cross-reactive mouse anti-DENV NS3 antibodies or mouse anti-HA antibodies as specificity control. Resulting eluates and cell extracts were analyzed by western blotting using the indicated antibodies. (B) Cells were treated exactly as in (A) except that rabbit anti-ZIKV NS4B antibodies or rabbit anti-HA antibodies were used for the pull-down. * Non-specific of immunoglobulin heavy chain. (C) Huh7.5 were infected with ZIKV H/PF/2013 (MOI=5),

ZIKV MR766 (MOI=1) or left uninfected. 72 hours post-infection, cells were fixed, subjected to PLA using ZIKV-cross-reactive rabbit anti-NS4B and mouse anti-NS3 antibodies and analyzed using confocal microscopy. (D) From two independent experiments, the amount of PLA puncta were quantified for each condition including those for the negative controls. Mean and SEMs were also determined and are indicated as black lines. (E) Huh7.5 cells were infected with ZIKV H/PF/2013 (MOI=1) or left uninfected. 48 hours post-infection, cells were fixed, labeled with mouse anti-NS3 and rabbit anti-NS4B antibodies and observed by confocal microscopy. The right panel shows a magnification of an infected cell.

Figure 7: ZIKV NS3 and NS4B interact in the absence of other viral proteins. (A) Huh7.5-T7 cells were transduced with lentiviruses expressing either ZIKV NS2B-NS3 or DENV NS2B-NS3 and treated with puromycin. The resulting stable cell lines were analyzed for NS3 expression by western blotting using anti-DENV NS3 (cross-reactive with ZIKV NS3) or anti-ZIKV-NS3 antibodies. (B) Huh7.5-T7 or Huh7.5-T7/ZIKV NS2B/3 cells were transfected with various NS4B-expressing plasmids. 18 hours later, NS3 and NS4B expression was analyzed by western blot using the indicated antibodies. (C) Huh7.5-T7 cells that stably express ZIKV NS2B/3 were transfected with the indicated constructs. 18 hours post-transfection, cell extracts were prepared and subjected to immunoprecipitation with mouse anti-HA antibodies. Resulting eluates and cell extracts were analyzed by western blotting using the indicated antibodies.

Figure 8: VCP ATPase inhibition specifically decrease ZIKV NS3 expression in infected cells. (A) Huh7.5-T7/NS2B3 cells transfected with the indicated constructs. 18 hours post-transfection, cells were treated with either DMSO or 10 μ M NMS-873 during 3 hours. Cell extracts were then prepared and subjected to immunoprecipitation with mouse anti-HA antibodies. Resulting eluates and cell extracts were analyzed by western blotting using the indicated antibodies. (B) Huh7.5 cells were infected with ZIKV H/PF/2013 (MOI=1) or left uninfected. 48 hours post-infection, cells were treated with either DMSO or 10 μ M NMS-873 during 4 hours before fixation. Cells were then labeled with anti-ZIKV NS4B antibodies and observed by confocal microscopy. (C) Huh7.5 cells were left uninfected or infected with ZIKV H/PF/2013 (MOI=1). 48 hours post-infection, cells were treated with either DMSO or 20 μ M NMS-873 during 1 hour. Cell extracts were then prepared and the expression of the indicated proteins was analyzed by western blotting using the indicated antibodies. (D) Quantification of the expression of ZIKV proteins (normalized to actin levels) from (C). Error bars indicates SEM which were calculated from 3 independent experiments. ***: p-value<0.001.

Figure 9: VCP ATPase inhibition dampens ZIKV-dependent mitochondrial elongation. Huh7.5 cells were infected with ZIKV H/PF/2013 (MOI=5; A) or left uninfected (B). 48 hours post-infection, cells were treated with either DMSO or 20 μ M NMS-873 during 4 hours before fixation. Cells were then labeled with rabbit anti-ZIKV NS4B, rat anti-NS3 and mouse anti-GRP75 antibodies. GRP75 is used as a marker of mitochondria. Viral protein distribution and mitochondrial morphology were analyzed using confocal microscopy. (C) Quantification of the mitochondria morphology phenotypes from (A) and (B).

Figure 10: VCP ATPase inhibition increases ZIKV-induced apoptosis. Huh7.5 cells were infected with ZIKV H/PF/2013 (MOI=10) or left uninfected. 48 hours post-infection, cells were treated with either DMSO or 20 μ M NMS-873 during 4 hours. Cells were treated with LIVE/DEAD reagent and the CellEvent caspase-3/7 green before labeling with anti-NS3 antibodies and AlexaFluor secondary anti-rat antibodies. Fixed cells were then analyzed by flow cytometry. A representative experiment is shown. (A) Analysis of the % of ZIKV-NS3 expressing cells. (B) Active caspase 3/7 and dead cell quantification. For the ZIKV infection condition, the analysis was performed on the NS3-positive cells. Actinomycin D treatment (2.5 μ M, 24 hours) was performed as a positive control of apoptosis induction. (C-D) Determination of the abundance of (C) NS3-positive caspase 3/7+ dead cells and (D) total apoptotic infected cells compiled from 2 independent experiments.

3.12 FIGURES

Figure 3-1 ZIKV NS4B interacts with VCP.

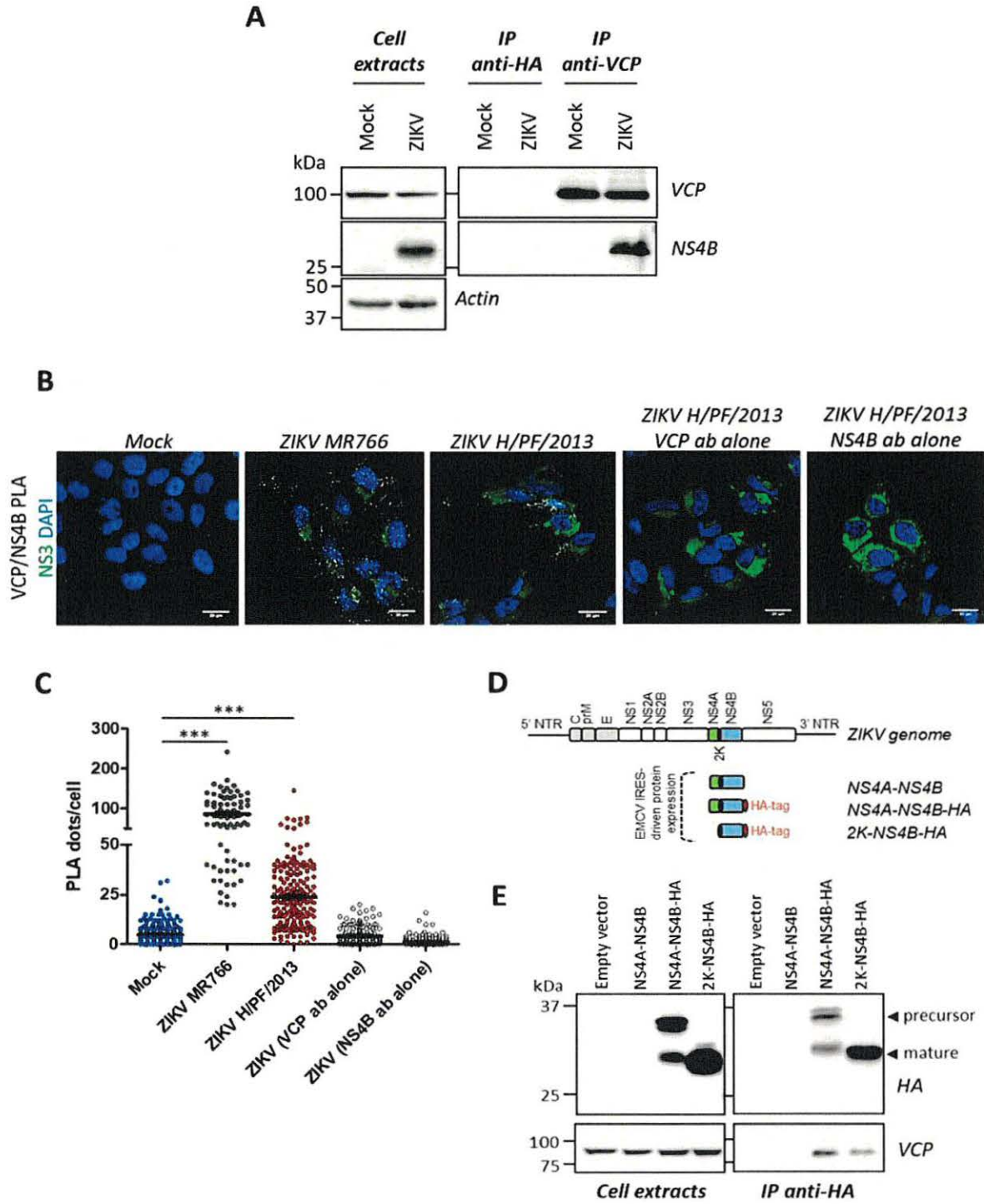


Figure 1

Figure 3-2 VCP regulates ZIKV replication

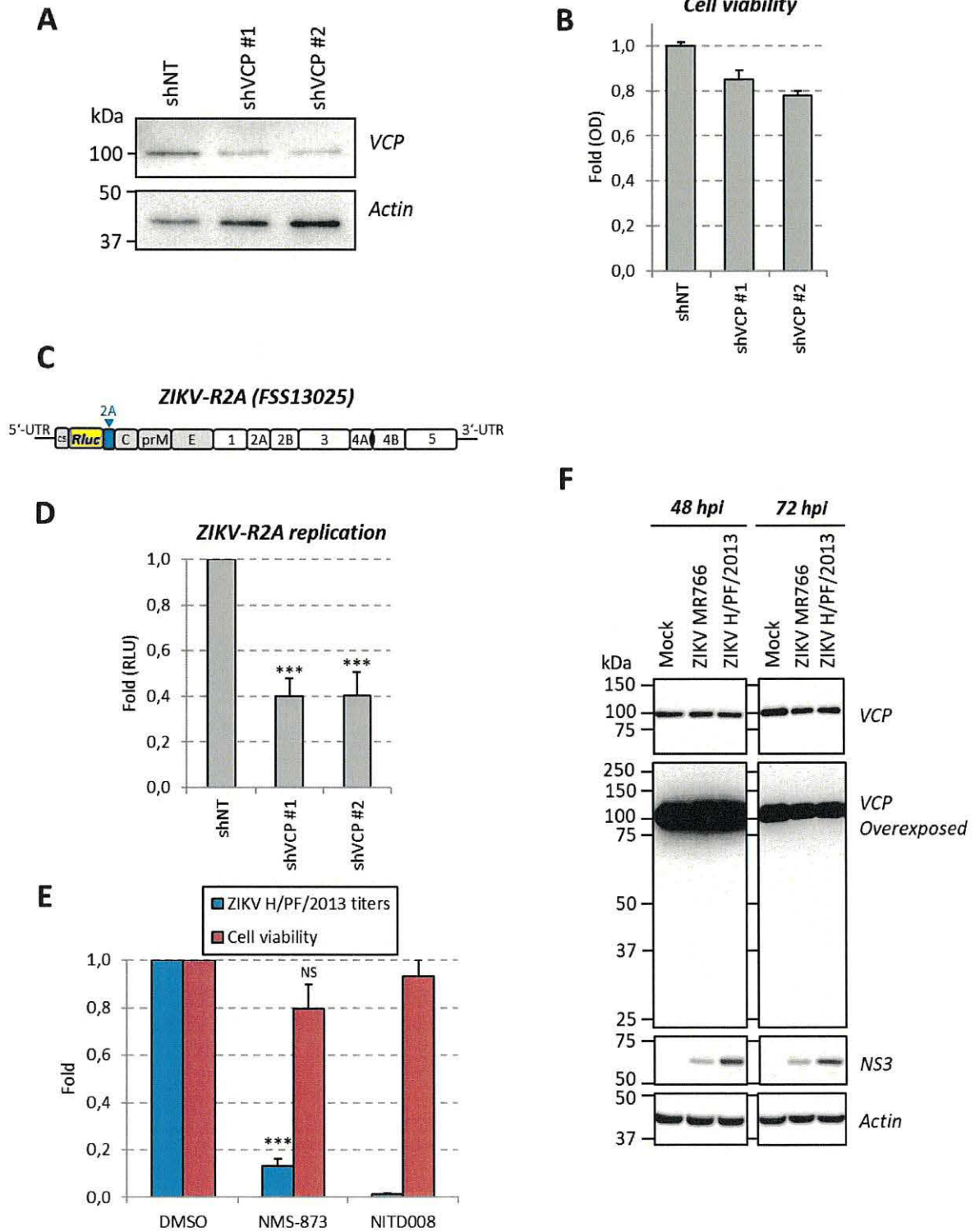


Figure 2

Figure 3-3 ZIKV NS4B induces the redistribution of VCP into large cytoplasmic structures

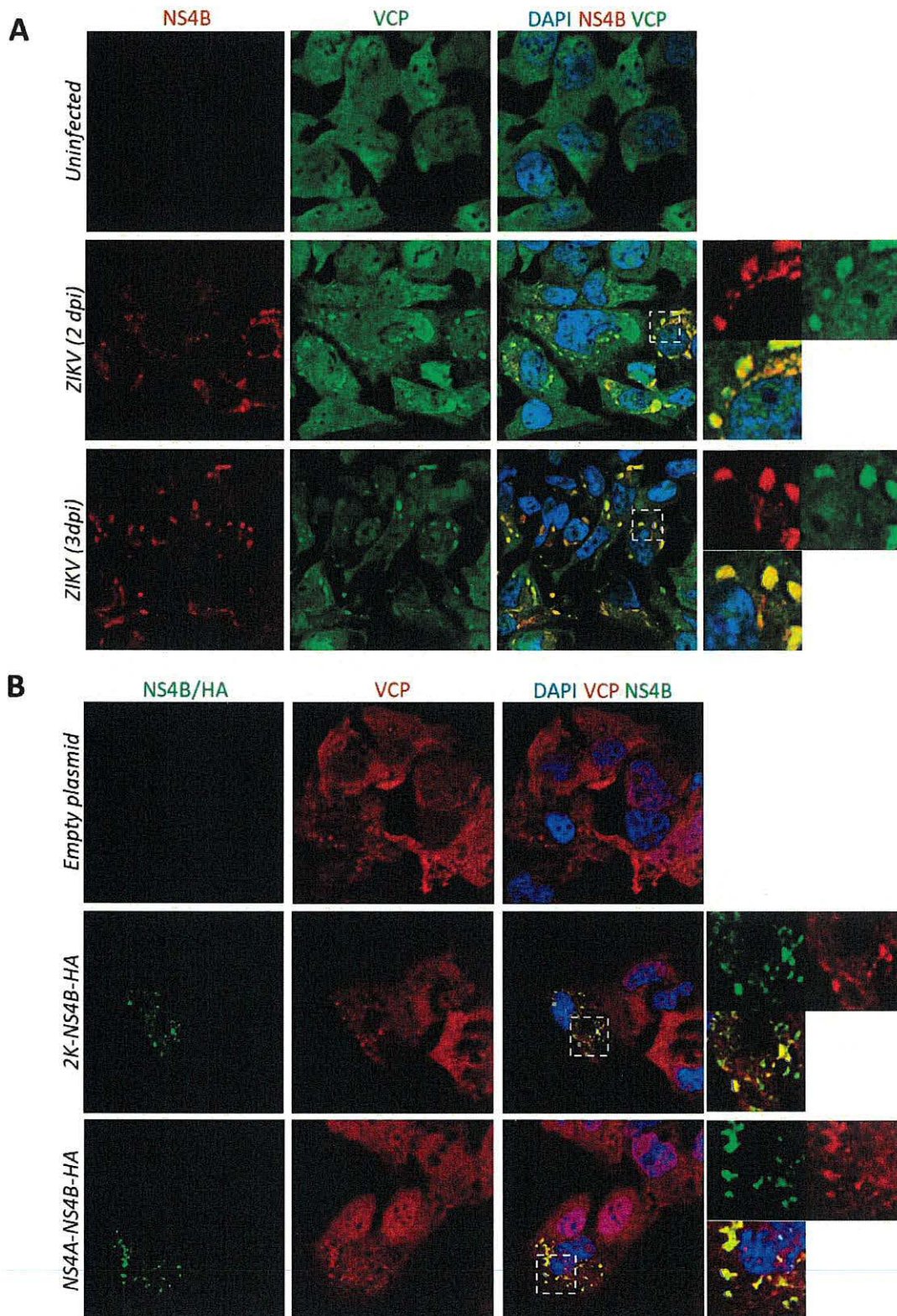
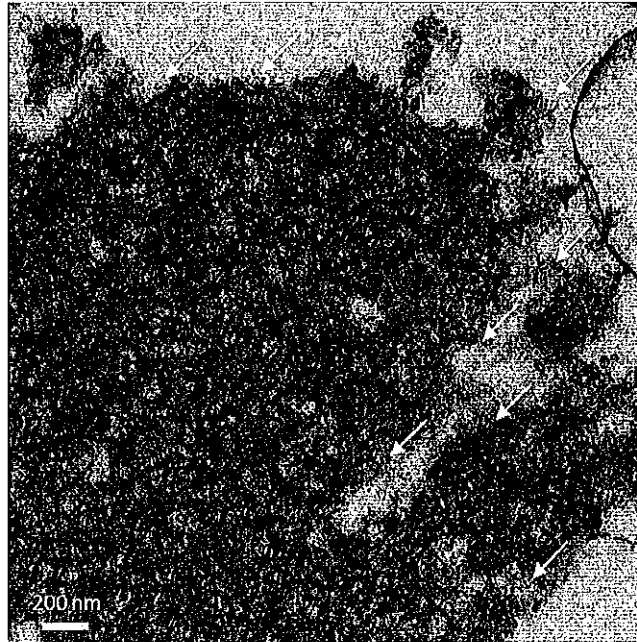


Figure 3

Figure 3-4 VCP and NS3 associate with ZIKV-induced convoluted membranes.

A

Anti-VCP



B

Anti-NS3

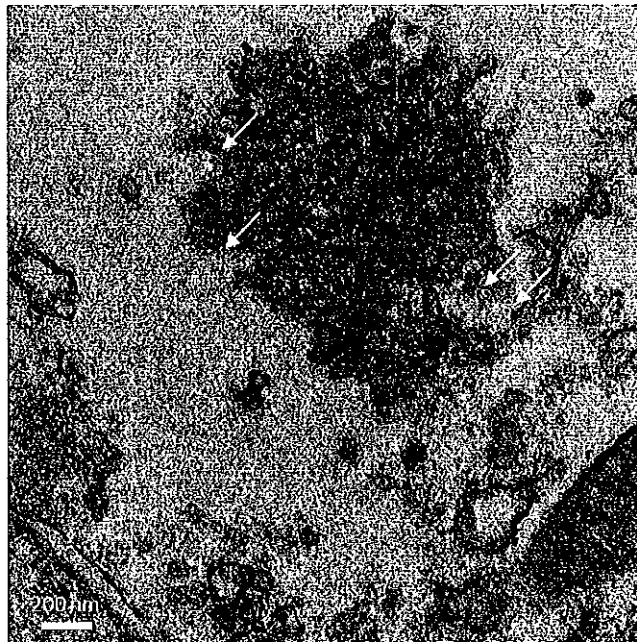
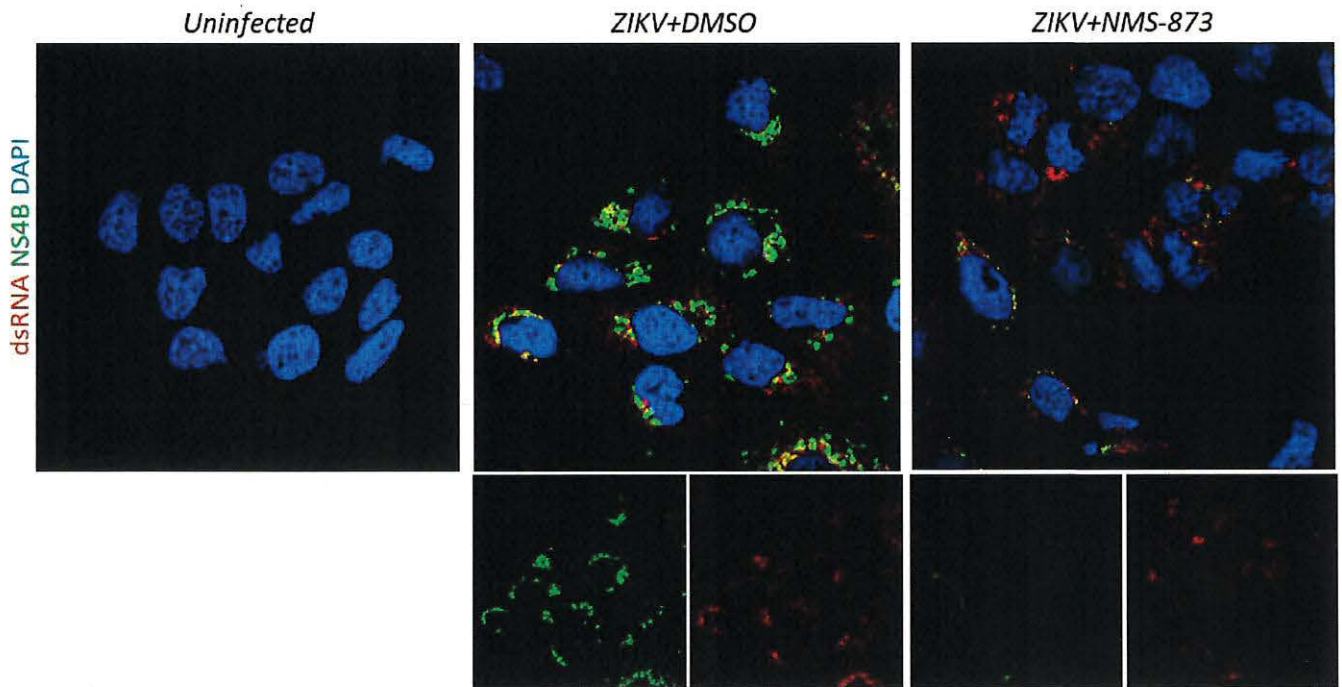


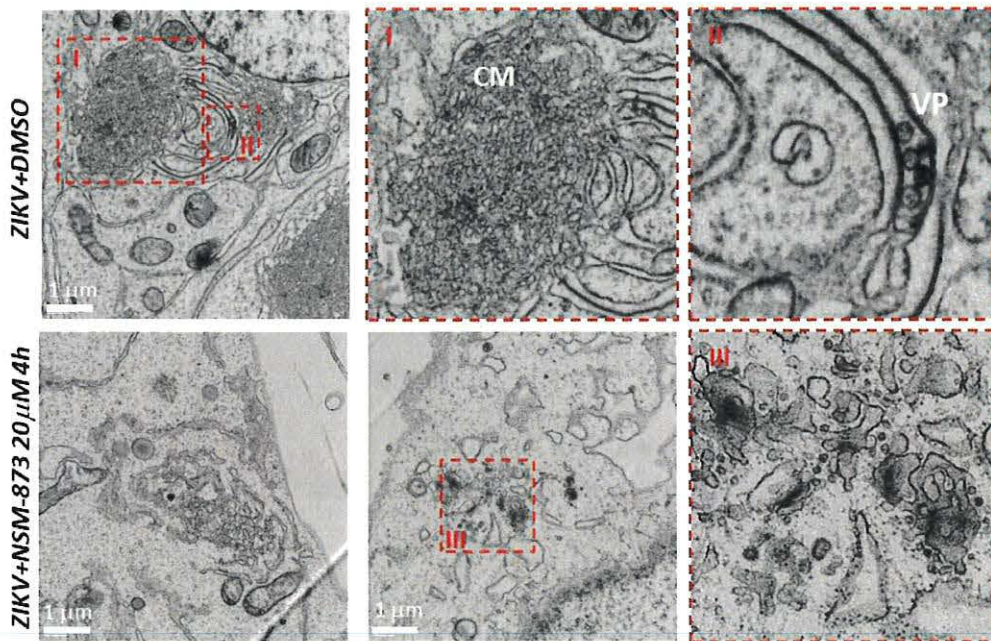
Figure 4

Figure 3-5 The inhibition of VCP ATPase activity alters ZIKV replication factories

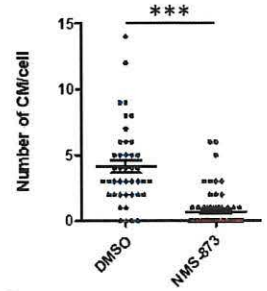
A



B



C



D

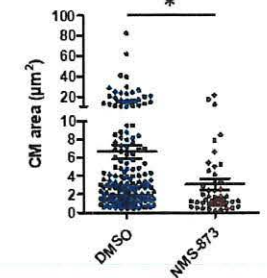


Figure 5

Figure 3-6 ZIKV NS4B interacts with NS3.

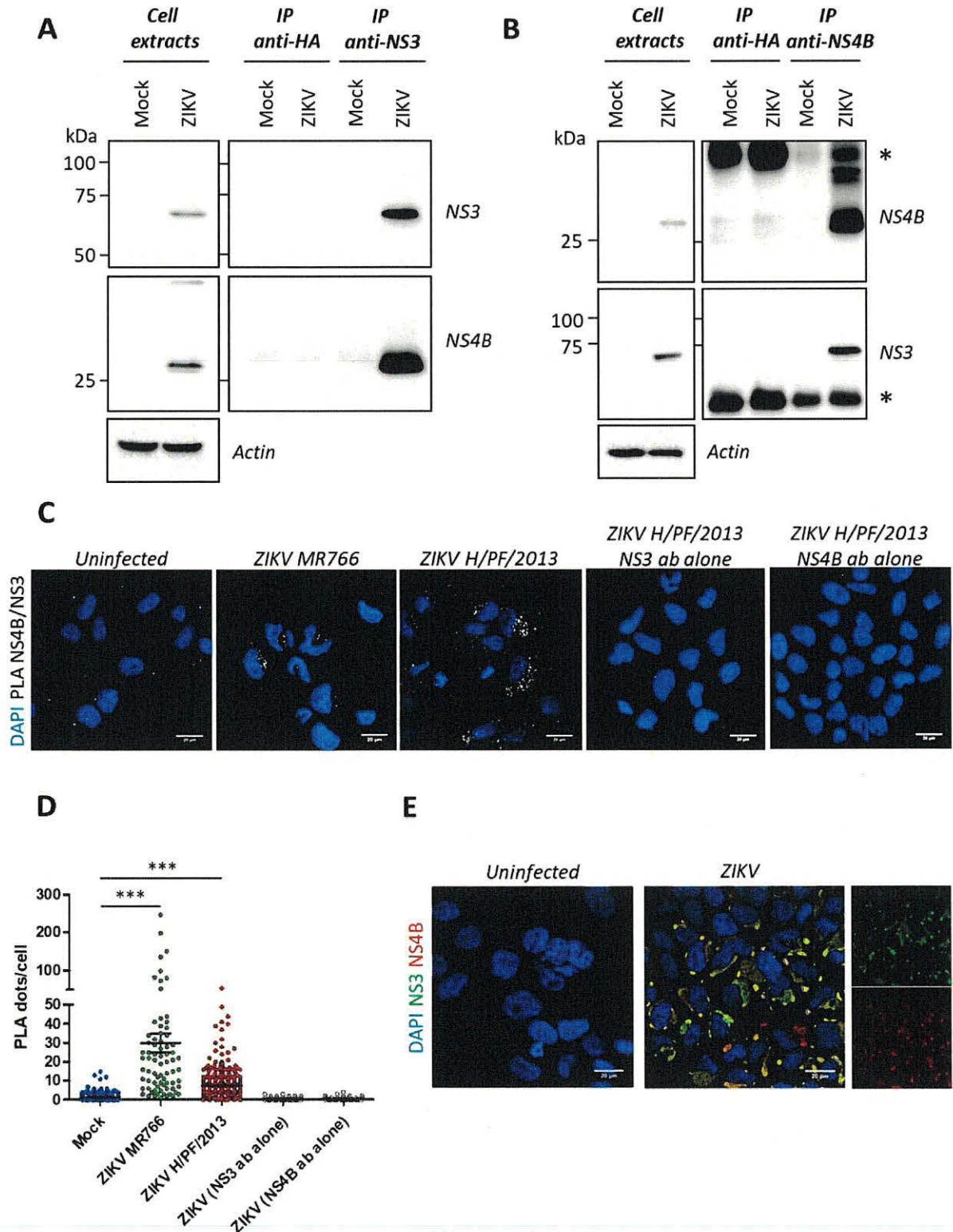


Figure 6

Figure 3-7 ZIKV NS3 and NS4B interact in the absence of other viral proteins.

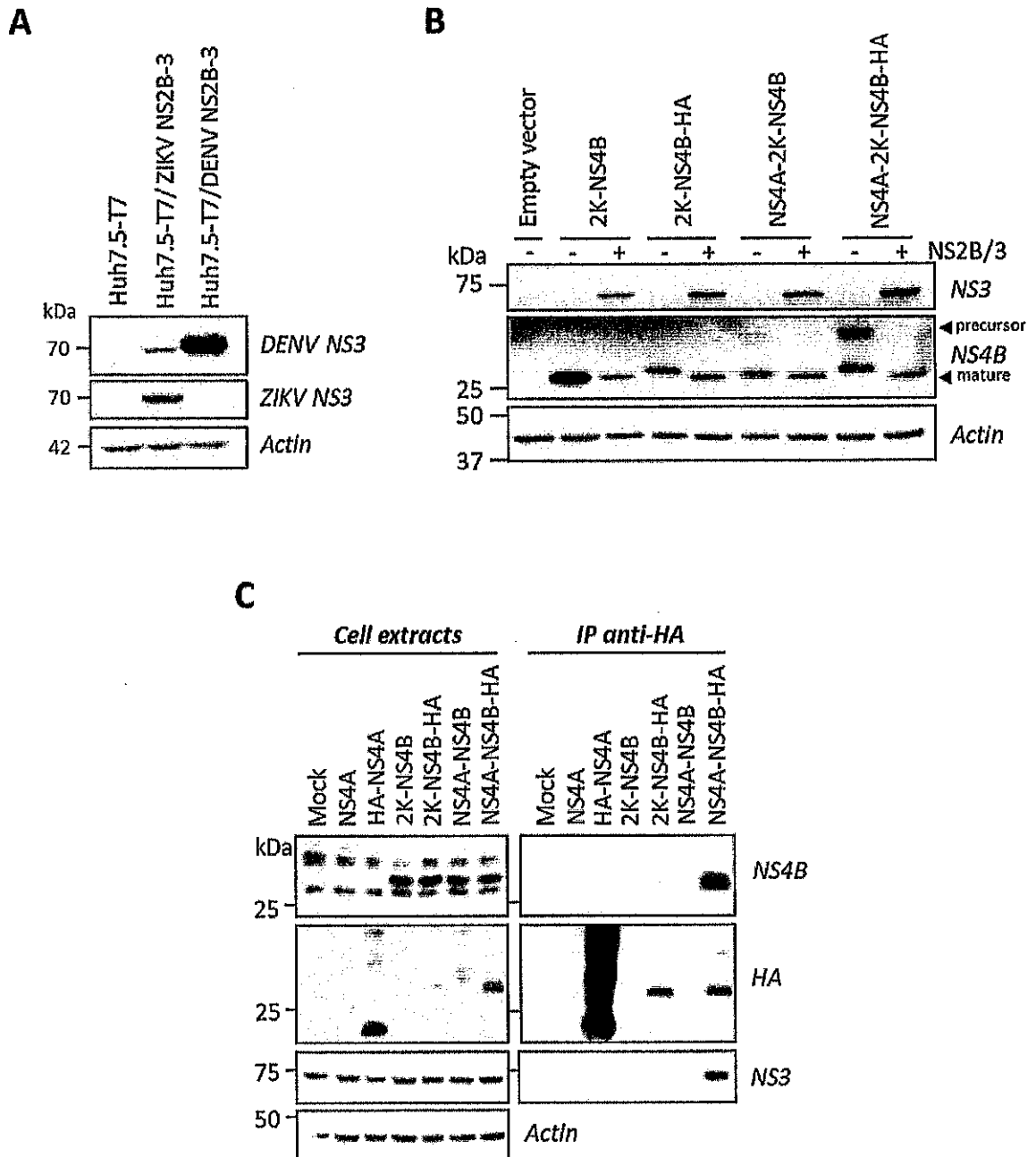


Figure 7

Figure 3-8 VCP ATPase inhibition specifically decrease ZIKV NS3 expression in infected cells

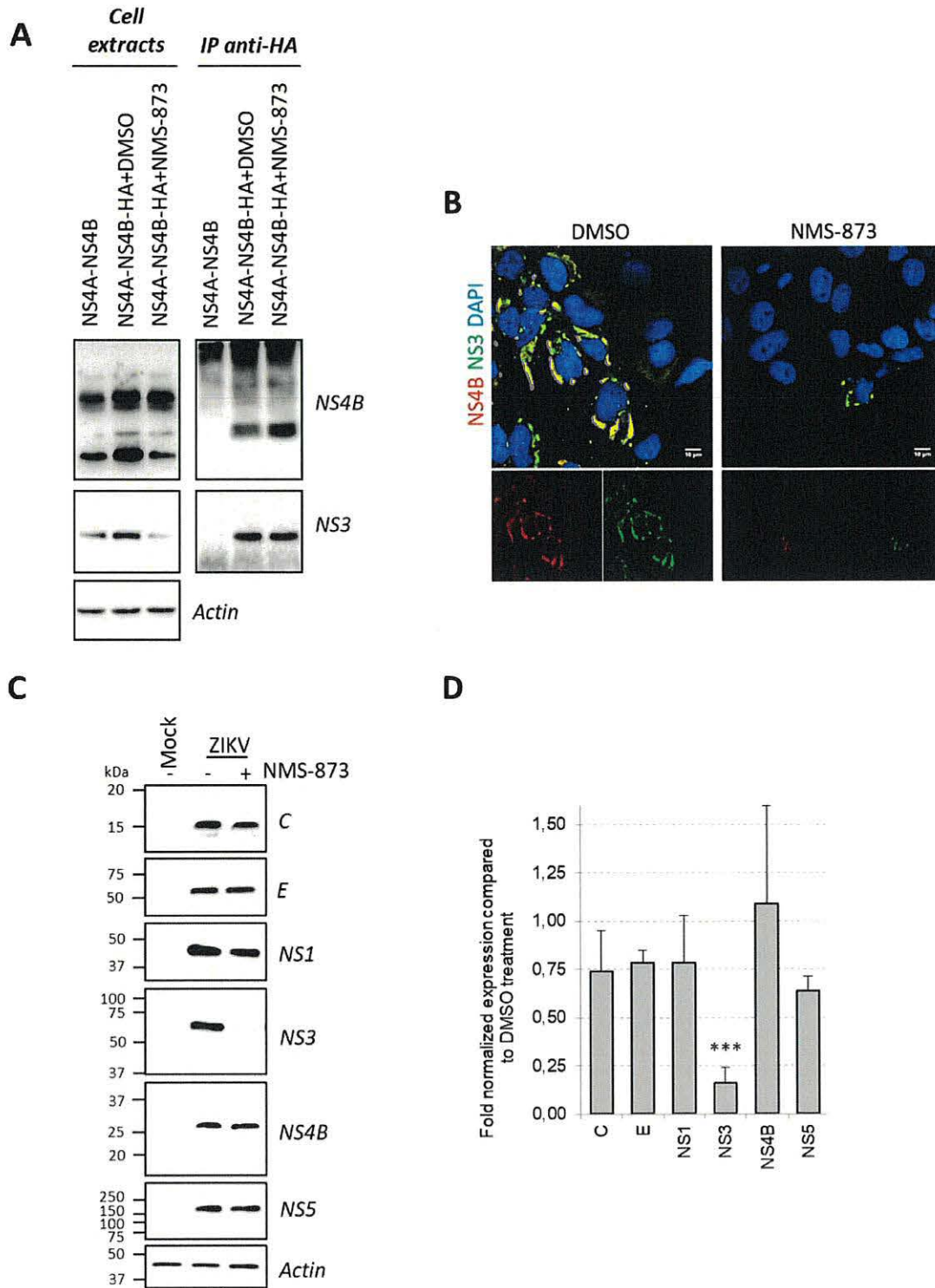


Figure 8

Figure 3-9 VCP ATPase inhibition dampens ZIKV-dependent mitochondrial elongation

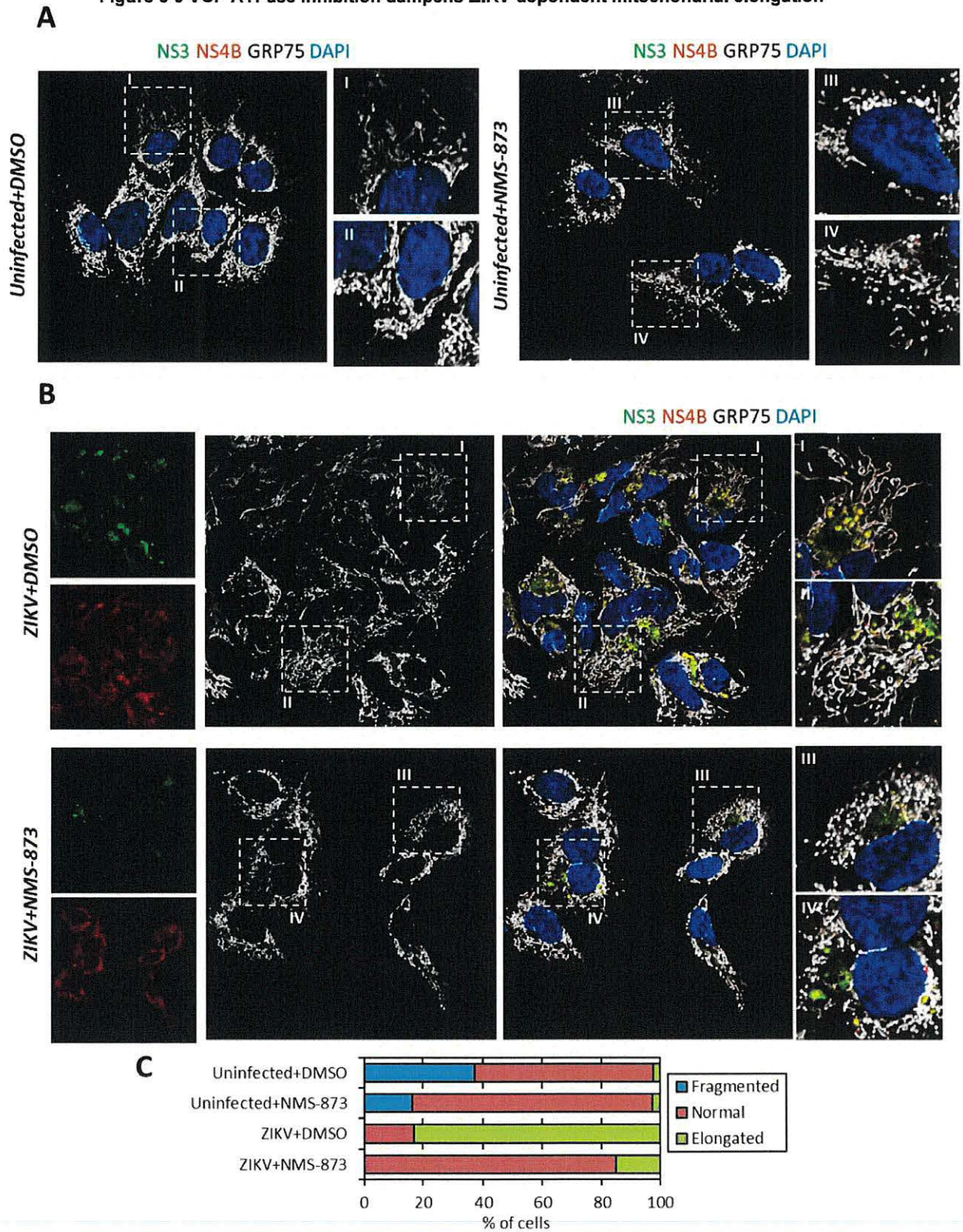


Figure 9

Figure 3-10 VCP ATPase inhibition increases ZIKV-induced apoptosis

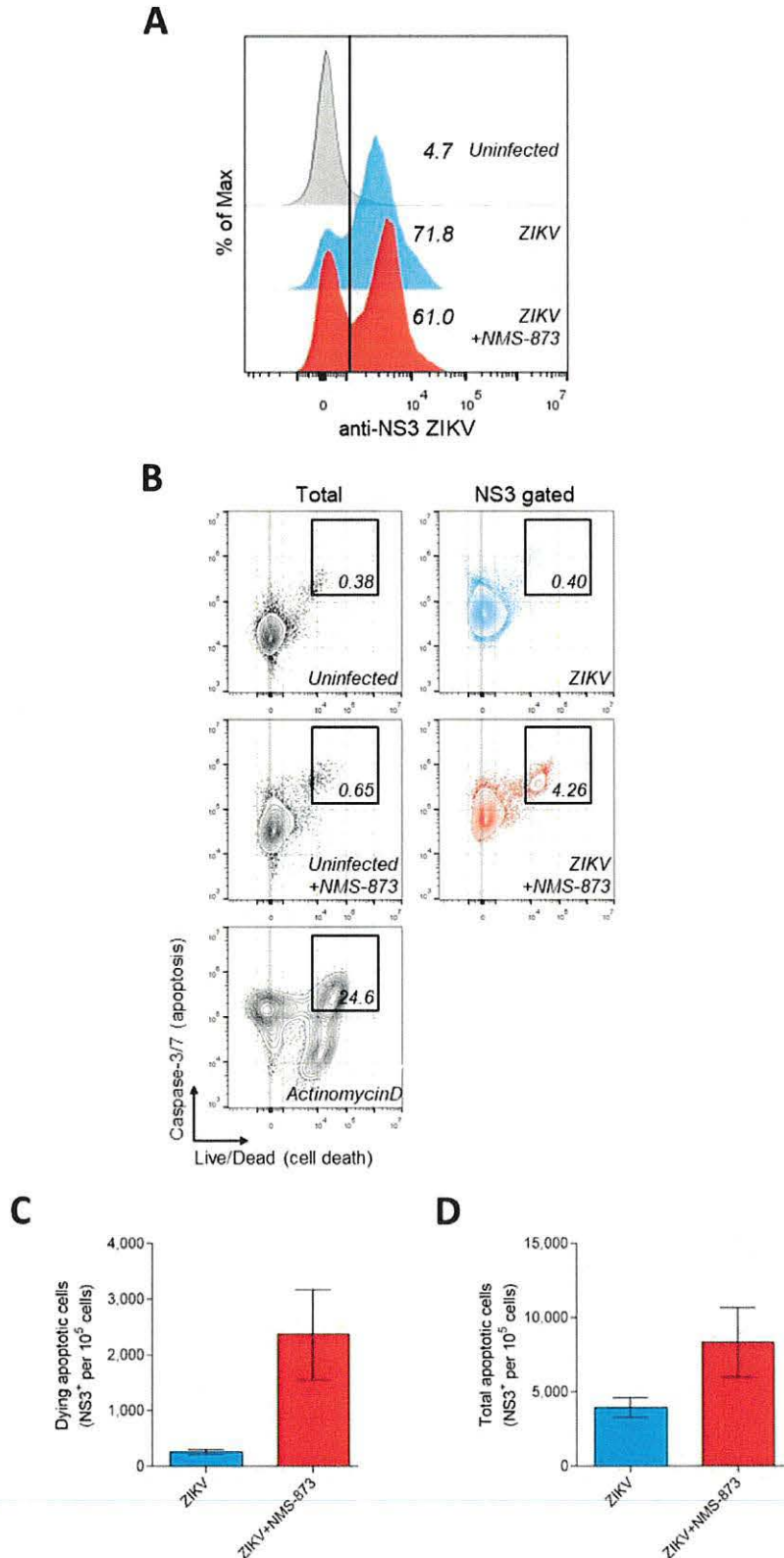


Figure 10

3.13 REFERENCES

1. World Health Organization. 2016. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005): Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations. <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1st-emergency-committee-zika/en/>.
2. World Health Organization. 2017. Zika: We must be ready for the long haul. <http://www.who.int/mediacentre/commentaries/2017/zika-long-haul/en/>.
3. Grubaugh ND, Faria NR, Andersen KG, Pybus OG. 2018. Genomic Insights into Zika Virus Emergence and Spread. *Cell* 172:1160-1162.
4. Lazear HM, Diamond MS. 2016. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. *J Virol* 90:4864-4875.
5. Li H, Saucedo-Cuevas L, Shrestha S, Gleeson JG. 2016. The Neurobiology of Zika Virus. *Neuron* 92:949-958.
6. Pierson TC, Graham BS. 2016. Zika Virus: Immunity and Vaccine Development. *Cell* 167:625-631.
7. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JL, Guimaraes KP, Benazzato C, Almeida N, Pignatari GC, Romero S, Polonio CM, Cunha I, Freitas CL, Brandao WN, Rossato C, Andrade DG, Faria Dde P, Garcez AT, Buchpiguel CA, Braconi CT, Mendes E, Sall AA, Zanotto PM, Peron JP, Muotri AR, Beltrao-Braga PC. 2016. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* 534:267-271.
8. Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X, Zhang N, Shi L, Qin CF, Xu Z. 2016. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* 19:672.
9. Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, Garber C, Noll M, Klein RS, Noguchi KK, Mysorekar IU, Diamond MS. 2016. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell* 165:1081-1091.
10. Barrows NJ, Campos RK, Powell ST, Prasanth KR, Schott-Lerner G, Soto-Acosta R, Galarza-Munoz G, McGrath EL, Urrabaz-Garza R, Gao J, Wu P, Menon R, Saade G, Fernandez-Salas I, Rossi SL, Vasilakis N, Routh A, Bradrick SS, Garcia-Blanco MA. 2016. A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* 20:259-270.
11. Rausch K, Hackett BA, Weinbren NL, Reeder SM, Sadovsky Y, Hunter CA, Schultz DC, Coyne CB, Cherry S. 2017. Screening Bioactives Reveals Nanchangmycin as a Broad Spectrum Antiviral Active against Zika Virus. *Cell Rep* 18:804-815.
12. Xu M, Lee EM, Wen Z, Cheng Y, Huang WK, Qian X, Tcw J, Kouznetsova J, Ogden SC, Hammack C, Jacob F, Nguyen HN, Itkin M, Hanna C, Shinn P, Allen C, Michael SG, Simeonov A, Huang W, Christian KM, Goate A, Brennand KJ, Huang R, Xia M, Ming GL, Zheng W, Song H, Tang H. 2016. Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen. *Nat Med* 22:1101-1107.
13. Zhou T, Tan L, Cederquist GY, Fan Y, Hartley BJ, Mukherjee S, Tomishima M, Brennand KJ, Zhang Q, Schwartz RE, Evans T, Studer L, Chen S. 2017. High-Content Screening in hPSC-Neural Progenitors Identifies Drug Candidates that Inhibit Zika Virus Infection in Fetal-like Organoids and Adult Brain. *Cell Stem Cell* 21:274-283 e275.
14. Neufeldt CJ, Cortese M, Acosta EG, Bartenschlager R. 2018. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nat Rev Microbiol* 16:125-142.
15. 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 Rep* 18:2113-2123.
16. Chatel-Chaix L, Bartenschlager R. 2014. Dengue virus- and hepatitis C virus-induced replication and assembly compartments: the enemy inside--caught in the web. *J Virol* 88:5907-5911.

17. Chatel-Chaix L, Fischl W, Scaturro P, Cortese M, Kallis S, Bartenschlager M, Fischer B, Bartenschlager R. 2015. A Combined Genetic-Proteomic Approach Identifies Residues within Dengue Virus NS4B Critical for Interaction with NS3 and Viral Replication. *J Virol* 89:7170-7186.
18. Zou J, Lee le T, Wang QY, Xie X, Lu S, Yau YH, Yuan Z, Geifman Shochat S, Kang C, Lescar J, Shi PY. 2015. Mapping the Interactions between the NS4B and NS3 proteins of dengue virus. *J Virol* 89:3471-3483.
19. Zou J, Xie X, Lee le T, Chandrasekaran R, Reynaud A, Yap L, Wang QY, Dong H, Kang C, Yuan Z, Lescar J, Shi PY. 2014. Dimerization of flavivirus NS4B protein. *J Virol* 88:3379-3391.
20. Chatel-Chaix L, Cortese M, Romero-Brey I, Bender S, Neufeldt CJ, Fischl W, Scaturro P, Schieber N, Schwab Y, Fischer B, Ruggieri A, Bartenschlager R. 2016. Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell Host Microbe* 20:342-356.
21. Miller S, Sparacio S, Bartenschlager R. 2006. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *J Biol Chem* 281:8854-8863.
22. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, Fuller SD, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. 2009. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* 5:365-375.
23. van Cleef KW, Overheul GJ, Thomassen MC, Kaptein SJ, Davidson AD, Jacobs M, Neyts J, van Kuppeveld FJ, van Rij RP. 2013. Identification of a new dengue virus inhibitor that targets the viral NS4B protein and restricts genomic RNA replication. *Antiviral Res* 99:165-171.
24. Wang QY, Dong H, Zou B, Karuna R, Wan KF, Zou J, Susila A, Yip A, Shan C, Yeo KL, Xu H, Ding M, Chan WL, Gu F, Seah PG, Liu W, Lakshminarayana SB, Kang C, Lescar J, Blasco F, Smith PW, Shi PY. 2015. Discovery of Dengue Virus NS4B Inhibitors. *J Virol* 89:8233-8244.
25. Xie X, Wang QY, Xu HY, Qing M, Kramer L, Yuan Z, Shi PY. 2011. Inhibition of dengue virus by targeting viral NS4B protein. *J Virol* 85:11183-11195.
26. Xie X, Zou J, Wang QY, Shi PY. 2015. Targeting dengue virus NS4B protein for drug discovery. *Antiviral Res* 118:39-45.
27. Barbier V, Lang D, Valois S, Rothman AL, Medin CL. 2017. Dengue virus induces mitochondrial elongation through impairment of Drp1-triggered mitochondrial fission. *Virology* 500:149-160.
28. Liang Q, Luo Z, Zeng J, Chen W, Foo SS, Lee SA, Ge J, Wang S, Goldman SA, Zlokovic BV, Zhao Z, Jung JU. 2016. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell* 19:663-671.
29. Meyer H, Wehl CC. 2014. The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease pathogenesis. *J Cell Sci* 127:3877-3883.
30. Stach L, Freemont PS. 2017. The AAA+ ATPase p97, a cellular multitool. *Biochem J* 474:2953-2976.
31. van den Boom J, Meyer H. 2018. VCP/p97-Mediated Unfolding as a Principle in Protein Homeostasis and Signaling. *Mol Cell* 69:182-194.
32. Bartolome F, Wu HC, Burchell VS, Preza E, Wray S, Mahoney CJ, Fox NC, Calvo A, Canosa A, Moglia C, Mandrioli J, Chio A, Orrell RW, Houlden H, Hardy J, Abramov AY, Plun-Favreau H. 2013. Pathogenic VCP mutations induce mitochondrial uncoupling and reduced ATP levels. *Neuron* 78:57-64.
33. Guo X, Sun X, Hu D, Wang YJ, Fujioka H, Vyas R, Chakrapani S, Joshi AU, Luo Y, Mochly-Rosen D, Qi X. 2016. VCP recruitment to mitochondria causes mitophagy impairment and neurodegeneration in models of Huntington's disease. *Nat Commun* 7:12646.
34. Kim NC, Tresse E, Kolaitis RM, Molliex A, Thomas RE, Alami NH, Wang B, Joshi A, Smith RB, Ritson GP, Winborn BJ, Moore J, Lee JY, Yao TP, Pallanck L, Kundu M, Taylor JP. 2013. VCP is essential for mitochondrial quality control by PINK1/Parkin and this function is impaired by VCP mutations. *Neuron* 78:65-80.
35. Ludtmann MHR, Arber C, Bartolome F, de Vicente M, Preza E, Carro E, Houlden H, Gandhi S, Wray S, Abramov AY. 2017. Mutations in valosin-containing protein (VCP) decrease ADP/ATP translocation across

- the mitochondrial membrane and impair energy metabolism in human neurons. *J Biol Chem* 292:8907-8917.
36. Zhang T, Mishra P, Hay BA, Chan D, Guo M. 2017. Valosin-containing protein (VCP/p97) inhibitors relieve Mitofusin-dependent mitochondrial defects due to VCP disease mutants. *Elife* 6.
 37. Imamura S, Yabu T, Yamashita M. 2012. Protective role of cell division cycle 48 (CDC48) protein against neurodegeneration via ubiquitin-proteasome system dysfunction during zebrafish development. *J Biol Chem* 287:23047-23056.
 38. Shah PS, Link N, Jang GM, Sharp PP, Zhu T, Swaney DL, Johnson JR, Von Dollen J, Ramage HR, Satkamp L, Newton B, Huttenhain R, Petit MJ, Baum T, Everitt A, Laufman O, Tassetto M, Shales M, Stevenson E, Iglesias GN, Shokat L, Tripathi S, Balasubramaniam V, Webb LG, Aguirre S, Willsey AJ, Garcia-Sastre A, Pollard KS, Cherry S, Gamarnik AV, Marazzi I, Taunton J, Fernandez-Sesma A, Bellen HJ, Andino R, Krogan NJ. 2018. Comparative Flavivirus-Host Protein Interaction Mapping Reveals Mechanisms of Dengue and Zika Virus Pathogenesis. *Cell* 175:1931-1945 e1918.
 39. Shan C, Xie X, Muruato AE, Rossi SL, Roundy CM, Azar SR, Yang Y, Tesh RB, Bourne N, Barrett AD, Vasilakis N, Weaver SC, Shi PY. 2016. An Infectious cDNA Clone of Zika Virus to Study Viral Virulence, Mosquito Transmission, and Antiviral Inhibitors. *Cell Host Microbe* 19:891-900.
 40. Yin Z, Chen YL, Schul W, Wang QY, Gu F, Duraiswamy J, Kondreddi RR, Niyomrattanakit P, Lakshminarayana SB, Goh A, Xu HY, Liu W, Liu B, Lim JY, Ng CY, Qing M, Lim CC, Yip A, Wang G, Chan WL, Tan HP, Lin K, Zhang B, Zou G, Bernard KA, Garrett C, Beltz K, Dong M, Weaver M, He H, Pichota A, Dartois V, Keller TH, Shi PY. 2009. An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:20435-20439.
 41. Deng YQ, Zhang NN, Li CF, Tian M, Hao JN, Xie XP, Shi PY, Qin CF. 2016. Adenosine Analog NITD008 Is a Potent Inhibitor of Zika Virus. *Open Forum Infect Dis* 3:ofw175.
 42. Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. 2006. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol* 87:2605-2614.
 43. Montessuit S, Somasekharan SP, Terrones O, Lucken-Ardjomande S, Herzig S, Schwarzenbacher R, Manstein DJ, Bossy-Wetzell E, Basanez G, Meda P, Martinou JC. 2010. Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. *Cell* 142:889-901.
 44. Park JH, Ko J, Hwang J, Koh HC. 2015. Dynamin-related protein 1 mediates mitochondria-dependent apoptosis in chlorpyrifos-treated SH-SY5Y cells. *Neurotoxicology* 51:145-157.
 45. Oettinghaus B, D'Alonzo D, Barbieri E, Restelli LM, Savoia C, Licci M, Tolnay M, Frank S, Scorrano L. 2016. DRP1-dependent apoptotic mitochondrial fission occurs independently of BAX, BAK and APAF1 to amplify cell death by BID and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1857:1267-1276.
 46. Yi Z, Fang C, Zou J, Xu J, Song W, Du X, Pan T, Lu H, Yuan Z. 2016. Affinity Purification of the Hepatitis C Virus Replicase Identifies Valosin-Containing Protein, a Member of the ATPases Associated with Diverse Cellular Activities Family, as an Active Virus Replication Modulator. *J Virol* 90:9953-9966.
 47. Yi Z, Yuan Z. 2017. Aggregation of a hepatitis C virus replicase module induced by ablation of p97/VCP. *J Gen Virol* 98:1667-1678.
 48. Phongphaew W, Kobayashi S, Sasaki M, Carr M, Hall WW, Orba Y, Sawa H. 2017. Valosin-containing protein (VCP/p97) plays a role in the replication of West Nile virus. *Virus Res* 228:114-123.
 49. Panda D, Rose PP, Hanna SL, Gold B, Hopkins KC, Lyde RB, Marks MS, Cherry S. 2013. Genome-wide RNAi screen identifies SEC61A and VCP as conserved regulators of Sindbis virus entry. *Cell Rep* 5:1737-1748.
 50. Brahm A, Mudhasani R, Pinkham C, Kota K, Nasar F, Zamani R, Bavari S, Kehn-Hall K. 2017. Sorafenib Impedes Rift Valley Fever Virus Egress by Inhibiting Valosin-Containing Protein Function in the Cellular Secretory Pathway. *J Virol* 91.
 51. Arita M, Wakita T, Shimizu H. 2012. Valosin-containing protein (VCP/p97) is required for poliovirus replication and is involved in cellular protein secretion pathway in poliovirus infection. *J Virol* 86:5541-5553.

52. Gilfoy F, Fayzulin R, Mason PW. 2009. West Nile virus genome amplification requires the functional activities of the proteasome. *Virology* 385:74-84.
53. Xin QL, Deng CL, Chen X, Wang J, Wang SB, Wang W, Deng F, Zhang B, Xiao G, Zhang LK. 2017. Quantitative Proteomic Analysis of Mosquito C6/36 Cells Reveals Host Proteins Involved in Zika Virus Infection. *J Virol* 91.
54. Choy MM, Sessions OM, Gubler DJ, Ooi EE. 2015. Production of Infectious Dengue Virus in *Aedes aegypti* Is Dependent on the Ubiquitin Proteasome Pathway. *PLoS Negl Trop Dis* 9:e0004227.
55. Kanlaya R, Pattanakitsakul SN, Sinchaikul S, Chen ST, Thongboonkerd V. 2010. The ubiquitin-proteasome pathway is important for dengue virus infection in primary human endothelial cells. *J Proteome Res* 9:4960-4971.
56. Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Buhler S, Bartenschlager R. 2007. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem* 282:8873-8882.
57. Kaufusi PH, Kelley JF, Yanagihara R, Nerurkar VR. 2014. Induction of endoplasmic reticulum-derived replication-competent membrane structures by West Nile virus non-structural protein 4B. *PLoS One* 9:e84040.
58. Roosendaal J, Westaway EG, Khromykh A, Mackenzie JM. 2006. Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. *J Virol* 80:4623-4632.
59. Zou J, Xie X, Wang QY, Dong H, Lee MY, Kang C, Yuan Z, Shi PY. 2015. Characterization of dengue virus NS4A and NS4B protein interaction. *J Virol* 89:3455-3470.
60. Youn S, Li T, McCune BT, Edeling MA, Fremont DH, Cristea IM, Diamond MS. 2012. Evidence for a genetic and physical interaction between nonstructural proteins NS1 and NS4B that modulates replication of West Nile virus. *J Virol* 86:7360-7371.
61. Junjhon J, Pennington JG, Edwards TJ, Perera R, Lanman J, Kuhn RJ. 2014. Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells. *J Virol* 88:4687-4697.
62. Berger C, Romero-Brey I, Radujkovic D, Terreux R, Zayas M, Paul D, Harak C, Hoppe S, Gao M, Penin F, Lohmann V, Bartenschlager R. 2014. Daclatasvir-like inhibitors of NS5A block early biogenesis of hepatitis C virus-induced membranous replication factories, independent of RNA replication. *Gastroenterology* 147:1094-1105 e1025.
63. Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, 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 Pathog* 8:e1003056.
64. Chou TF, Brown SJ, Minond D, Nordin BE, Li K, Jones AC, Chase P, Porubsky PR, Stoltz BM, Schoenen FJ, Patricelli MP, Hodder P, Rosen H, Deshaies RJ. 2011. Reversible inhibitor of p97, DBeQ, impairs both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:4834-4839.
65. Ju JS, Fuentealba RA, Miller SE, Jackson E, Piwnicka-Worms D, Baloh RH, Weihl CC. 2009. Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *J Cell Biol* 187:875-888.
66. Tresse E, Salomons FA, Vesa J, Bott LC, Kimonis V, Yao TP, Dantuma NP, Taylor JP. 2010. VCP/p97 is essential for maturation of ubiquitin-containing autophagosomes and this function is impaired by mutations that cause IBMPFD. *Autophagy* 6:217-227.
67. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, Perera-Lecoin M, Surasombatpattana P, Tallignani L, Thomas F, Cao-Lormeau VM, Choumet V, Briant L, Despres P, Amara A, Yssel H, Misse D. 2015. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol* 89:8880-8896.

68. Ke PY. 2018. The Multifaceted Roles of Autophagy in Flavivirus-Host Interactions. *Int J Mol Sci* 19.
69. Chiramel AI, Best SM. 2018. Role of autophagy in Zika virus infection and pathogenesis. *Virus Res* 254:34-40.
70. Metz P, Chiramel A, Chatel-Chaix L, Alvisi G, Bankhead P, Mora-Rodriguez R, Long G, Hamacher-Brady A, Brady NR, Bartenschlager R. 2015. Dengue Virus Inhibition of Autophagic Flux and Dependency of Viral Replication on Proteasomal Degradation of the Autophagy Receptor p62. *J Virol* 89:8026-8041.
71. Heidelberger JB, Voigt A, Borisova ME, Petrosino G, Ruf S, Wagner SA, Bell P. 2018. Proteomic profiling of VCP substrates links VCP to K6-linked ubiquitylation and c-Myc function. *EMBO Rep* 19.
72. 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 Rep* 21:1639-1654.
73. Kimura Y, Fukushi J, Hori S, Matsuda N, Okatsu K, Kakiyama Y, Kawawaki J, Kakizuka A, Tanaka K. 2013. Different dynamic movements of wild-type and pathogenic VCPs and their cofactors to damaged mitochondria in a Parkin-mediated mitochondrial quality control system. *Genes Cells* 18:1131-1143.
74. McLelland GL, Goiran T, Yi W, Dorval G, Chen CX, Lauinger ND, Krahn AI, Valimehr S, Rakovic A, Rouiller I, Durcan TM, Trempe JF, Fon EA. 2018. Mfn2 ubiquitination by PINK1/parkin gates the p97-dependent release of ER from mitochondria to drive mitophagy. *Elife* 7.
75. Anderson DJ, Le Moigne R, Djakovic S, Kumar B, Rice J, Wong S, Wang J, Yao B, Valle E, Kiss von Soly S, Madriaga A, Soriano F, Menon MK, Wu ZY, Kampmann M, Chen Y, Weissman JS, Aftab BT, Yakes FM, Shawver L, Zhou HJ, Wustrow D, Rolfe M. 2015. Targeting the AAA ATPase p97 as an Approach to Treat Cancer through Disruption of Protein Homeostasis. *Cancer Cell* 28:653-665.
76. Le Moigne R, Aftab BT, Djakovic S, Dhimolea E, Valle E, Murnane M, King EM, Soriano F, Menon MK, Wu ZY, Wong ST, Lee GJ, Yao B, Wilta AP, Lam C, Rice J, Wang J, Chesi M, Bergsagel PL, Kraus M, Driessen C, Kiss von Soly S, Yakes FM, Wustrow D, Shawver L, Zhou HJ, Martin TG, 3rd, Wolf JL, Mitsiades CS, Anderson DJ, Rolfe M. 2017. The p97 Inhibitor CB-5083 Is a Unique Disrupter of Protein Homeostasis in Models of Multiple Myeloma. *Mol Cancer Ther* 16:2375-2386.
77. Zhou HJ, Wang J, Yao B, Wong S, Djakovic S, Kumar B, Rice J, Valle E, Soriano F, Menon MK, Madriaga A, Kiss von Soly S, Kumar A, Parlati F, Yakes FM, Shawver L, Le Moigne R, Anderson DJ, Rolfe M, Wustrow D. 2015. Discovery of a First-in-Class, Potent, Selective, and Orally Bioavailable Inhibitor of the p97 AAA ATPase (CB-5083). *J Med Chem* 58:9480-9497.
78. Fischl W, Bartenschlager R. 2013. High-throughput screening using dengue virus reporter genomes. *Methods Mol Biol* 1030:205-219.

4 DISCUSSION

Lors de leur réplication, les virus doivent utiliser et détourner de nombreux processus et facteurs de la cellule hôte pour compléter efficacement leur cycle. Ceci est souvent réalisé par l'intermédiaire d'interactions physiques entre les protéines virales et les protéines de l'hôte.

Nous avons identifié dans cette étude que l'ATPase cellulaire VCP/p97 est un facteur cellulaire important pour la réplication du virus Zika et qu'elle interagit avec la protéine virale NS4B.

En effet, on observe une diminution de la réplication virale lorsque la fonction ATPase de VCP est inhibée pharmacologiquement par le NMS-873 et également lorsque l'on diminue son expression par ARNi (Figure 3-2). D'autres inhibiteurs de VCP tel que CB-5086 et Eerl ont également été testés et montrent le même phénotype (expériences effectuées par Aicha Aissatou Sow, données non montrées) (Wang et al., 2010; Zhou et al., 2015). D'autres études ont également identifié VCP comme un facteur proviral lors de l'infection par d'autres virus (introduction section 1.9.3). Parmi ceux-ci, des virus de la famille des *Flaviviridae* comme le VHC et même des *Flavivirus* comme le VNO (Phongphaew et al., 2017; Yi et al., 2016).

Nous avons observé une colocalisation de VCP et de NS4B au niveau des CM dans les cellules infectées par le VZIK (Figure 3-3 et Figure 3-4). Chez le VDEN, NS4B fait partie des protéines non-structurales importantes pour la réplication de l'ARNv et fait partie intégrante des OR. Ceci semble être conservé chez le VZIK. De façon intéressante, chez le VHC et le VCHIK, VCP colocalise également avec des protéines non structurales importantes pour la réplication de l'ARNv et qui font partie des OR lors de l'infection. En effet, la protéine NS5A du VHC colocalise et interagit avec VCP lors de l'infection. NS5A est importante pour l'établissement des OR en plus d'être indispensable à la réplication virale (Romero-Brey et al., 2015; Yi and Yuan, 2017). Chez le VCHIK, VCP se lie avec plusieurs protéines non-structurales importantes pour la réplication de l'ARNv, nsP1, 2 et 3, qui sont responsables de la mise en place des sphérules, OR dérivés de la membrane plasmique cellulaire (Carissimo et al., 2019; Silva and Dermody, 2017). L'implication de VCP au niveau des OR pourrait donc être un mécanisme conservé.

Nous avons démontré dans notre étude que la fonction ATPase de VCP est importante pour la stabilité ou la morphogénèse des CM induites par le VZIK. En effet, un traitement avec le NMS-873 entraîne une diminution de la taille et du nombre des CM induites par le VZIK (Figure 3-5).

VCP est une chaperonne importante dans la protéostasie cellulaire et dans le « contrôle qualité » des protéines. D'autres chaperonnes partageant les mêmes fonctions sont également

nécessaires pour la réplication du VZIK telles que Hsp70, GRP94 ou Hrd1 suggérant l'importance de ces facteurs lors de l'infection (Rothan et al., 2019; Ruan et al., 2019; Taguwa et al., 2019). De plus, Taguwa et al. ont montré que Hsp70, est aussi importante dans l'établissement des complexes de réplication et qu'elle se localise dans les compartiments induits par le virus, dont des structures NS3-positives réminiscentes des CM. Cependant, Hsp70 semble aussi nécessaire à d'autres étapes du cycle de réplication comme l'entrée ou l'assemblage de la capsid (Taguwa et al., 2019).

Ainsi, bien que nos données montrent l'importance de VCP pour les CM, nous ne pouvons exclure une implication dans d'autres étapes du cycle telles que l'entrée comme c'est le cas pour le VNO (Phongphaew et al., 2017). Il serait donc intéressant de voir les effets d'un traitement avec les NMS-873 sur les différentes étapes du cycle de réplication du VZIK. Par exemple, pour examiner si VCP est importante pour l'entrée et la réplication de l'ARNv, un traitement avec le NMS-873 pourrait être effectué lors de l'utilisation de particules trans-complémentées. Ces particules infectieuses contiennent un réplicon sous-génomique rapporteur (codant pour une *Renilla luciferase*). Elles peuvent être produites par électroporation du réplicon couplée à une transduction de 2 lentivirus codant pour la protéine de capsid et pour prM/E (Scaturro et al., 2014). Ces particules sont capables d'infecter les cellules mais sont incapables de se propager en culture cellulaire car le réplicon sous-génomique ne code pas pour les protéines structurales. Ainsi, ce système ne supporte qu'un cycle d'infection et l'effet du NMS-873 pourrait être analysé par essai luciférase. L'effet de l'inhibition de VCP sur les étapes de réplication et de traduction de l'ARNv uniquement pourrait être étudié en électroporant directement le réplicon sous-génomique rapporteur dans les cellules. La traduction pourrait être étudiée avec le réplicon sous-génomique rapporteur non-réplicatif (mutation GNN dans NS5 générant une polymérase non-fonctionnelle éliminant l'étape de réplication de l'ARNv) en effectuant les essais luciférase 4h après l'électroporation et le traitement au NMS-873. Pour tester l'importance de VCP dans la production des particules virales infectieuses, les cellules pourraient être infectées assez longtemps pour permettre aux cellules d'accumuler un pool significatif à la fois d'ARNv et de protéines virales (environ 24 à 36h). Par la suite elles pourraient être récoltées et rincées pour éliminer les virions pré-existants puis le NMS-873 pourrait être ajouté. Les niveaux d'ARNv, de protéines de virions et de titres infectieux pourraient ensuite être étudiés après le traitement (par qRT-PCR et essais de plaques par exemple).

Comme mentionné plus tôt, plusieurs protéines cellulaires impliquées dans le «contrôle-qualité» des protéines et dans la protéostasie sont importantes pour la réplication du VZIK. En accord

avec cela, une récente étude protéomique orthogonale a montré que NS4B interagit avec ce type de protéine tel que STT3B, SQSTM1 (p62) ou EMC (Lin et al., 2019; Scaturro et al., 2018). Ceci suggère que la manipulation de ces mécanismes par le VZIK implique probablement NS4B.

Compte tenu de l'architecture très complexe des OR induites par les virus à ARNs^{b+} et de leur petit génome, les altérations membranaires sont induites par l'action concertée de facteurs viraux et cellulaires. En principe, la courbure de la membrane peut être atteinte par des altérations locales dans la composition des lipides membranaires ; ou par des interactions asymétriques des protéines avec les membranes. Ceci comprend l'échafaudage de la membrane par des protéines en périphérie, l'insertion de protéines asymétriques ou de complexes protéiques dans la membrane, l'insertion d'hélices amphipathiques dans la bicouche lipidique ou les interactions de la membrane avec le cytosquelette (Figure 4-1; Paul and Bartenschlager, 2013).

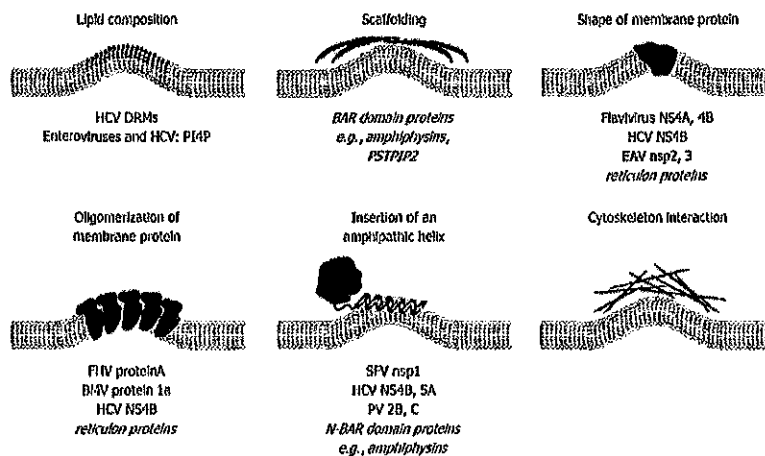


Figure 4-1 Mécanismes de courbure et modifications des membranes

Mécanismes possiblement responsables de l'induction de la courbure de la membrane dans la formation des OR des virus à ARNs^{b+} (Paul and Bartenschlager, 2013)

La protéine NS4B des *Flavivirus* pourrait être impliquée dans plusieurs de ces processus notamment grâce à sa structure intégralement membranaire permettant la courbure des membranes et via ses interactions avec des protéines cellulaires et virales comme NS1, NS3 et NS4A (Chatel-Chaix et al., 2015; Płaszczycza et al., 2019; Zou et al., 2015).

Plusieurs études soulèvent surtout l'importance de NS4A dans le remodelage membranaire induit par les *Flavivirus*. En effet, l'expression de NS4A du VDEN et du VNO semble suffire à induire

les CM (Miller et al., 2007; Roosendaal et al., 2006). Cependant ce mécanisme est très inefficace et les structures paraissent tout de même différentes de celles observées lors de l'infection. Ainsi d'autres facteurs viraux semblent être nécessaires. De plus, il se pourrait que la maturation de la forme NS4A-2K-NS4B soit importante pour le réarrangement membranaire. Cependant, il est suggéré que ces mécanismes diffèrent entre les membres des *Flavivirus* et il serait intéressant d'étudier plus en profondeur cela dans le contexte d'infection par le VZIK. Il se pourrait également que NS4B permette une potentialisation de l'activité de remodelage membranaire de NS4A (Miller et al., 2007; Roosendaal et al., 2006).

D'autres études montrent l'importance de facteurs cellulaires dans le remodelage membranaire. Par exemple la protéine de l'hôte réticulon 3.1A est nécessaire à la réplication des *Flavivirus* et est impliquée dans le remodelage des membranes induit par ces virus (Aktepe et al., 2017). La famille des protéines du réticulon (RTN) est un grand groupe de protéines associées à la membrane qui sont importantes pour le maintien de l'architecture du RE (Voeltz et al., 2006). Il s'avère que dans le cas du VNO, c'est NS4A qui interagit avec RTN3.1A pour promouvoir sa fonction (Aktepe et al., 2017). De façon intéressante, une étude protéomique a montré qu'une des protéines de la même famille, le RTN4 est un substrat spécifique de VCP (Heidelberger et al., 2018). Il est donc possible que l'implication de VCP dans la formation ou le maintien des CM soit lié à un facteur cellulaire permettant la courbure des membranes.

Cependant il est aussi possible que VCP agisse directement sur des facteurs viraux importants pour le remodelage membranaire. Il a récemment été montré que l'établissement adéquat des différents passages transmembranaires de NS4A et de NS4B dans la membrane du RE nécessite le complexe de protéines membranaires du RE (EMC). Ce complexe est donc indispensable à la réplication ainsi qu'à l'expression de la bonne forme de NS4A et NS4B, en permettant leur insertion membranaire adéquate (Lin et al., 2019; Ngo et al., 2019). Considérant le rôle de chaperonne de VCP ainsi que son interaction avec NS4B nous pouvons spéculer que VCP pourrait agir de façon similaire sur NS4B du VZIK. La topologie membranaire de NS4A et de NS4B semble donc être importante à la mise en place des OR et ceci pourrait expliquer la perturbation des CM lors du traitement avec le NMS-873. Il serait intéressant d'étudier dans un premier temps s'il existe une relation entre VCP et NS4A du VZIK et par la suite d'étudier la topologie membranaire de ces deux protéines lorsque VCP est inhibée (avec le NMS-873) ou encore lorsque VCP présente des mutations pathologiques familiales impliquées dans l'IBMPFD/ALS (voir introduction section 1.9.2). Il faut cependant savoir que les topologies

membranaires exactes de NS4B et de NS4A du VZIK ne sont pas encore connues à l'inverse de celles des protéines du VDEN (Miller et al., 2006, 2007).

Il serait intéressant d'analyser l'impact des mutations pathologiques familiales de VCP sur d'autres aspects de l'infection par le VZIK. Les mutations identifiées peuvent entraîner différents changements dans la fonction ATPase de VCP. En effet, certains mutants présentent une activité ATPase accrue et des défauts mitochondriaux (telles que R155H ou A232E). D'autre part, un mutant dominant négatif E305Q/E578Q identifié par génie génétique montre une perte de fonction de VCP en altérant son activité ATPase (Gitcho et al., 2009; Meyer and Weihi, 2014; Tresse et al., 2010). L'étude des effets de ces mutants sur les niveaux de réplication du VZIK, sur l'interaction avec NS4B ainsi que sur la formation des OR et plus particulièrement des CM, permettrait de mieux comprendre cette fonction lors de l'infection par le VZIK.

Nos analyses par immunomarquages couplés à l'or (Figure 3-4 et Figure 4-2) ne nous ont pas permis de détecter VCP au sein ou à proximité des PV. De plus, il nous était impossible d'effectuer des quantifications concernant les PV lors de notre traitement au NMS-873 (Figure 3-5) car nous n'avons pas été capables d'en observer dans ces conditions. Il faut savoir que lors du traitement au DMSO, leur occurrence étaient déjà très faibles. Ainsi nous ne pouvons pas exclure l'implication de VCP dans les PV. Des changements concernant l'approche méthodologique pourraient permettre d'obtenir de plus amples informations. En effet, avant d'effectuer l'immunomarquage couplé à l'or nous avons dû perméabiliser les membranes pour rendre nos épitopes accessibles aux anticorps. Nous avons testé plusieurs concentrations de détergent (saponine) pour utiliser celle où les cellules seraient assez perméabilisées pour permettre le passage des anticorps sans que les CM ne soient dénaturées. D'une part, il est possible que les seuils de dénaturation des CM et des PV ne soient pas les mêmes et d'autre part il est possible que les anticorps n'aient pas eu accès à l'intérieur des CM. Cette dernière raison pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas été capables d'observer nos différentes protéines (VCP, NS3 et NS4B) au sein même des CM mais plutôt à leur surface (Figure 3-4 et Figure 4-2).

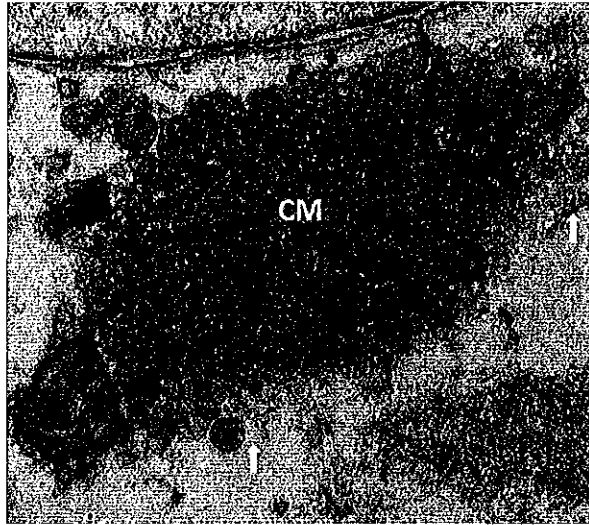


Figure 4-2 Association de NS4B avec les CM

Image de microscopie électronique de cellules Huh7.5 infectées avec le VZIK H/PF/2013 (MOI=20). 48 h plus tard, les cellules ont été fixées et sujettes à l'immunomarquage de NS4B couplé à des billes d'or puis préparées pour l'analyse en microscopie électronique à transmission (méthodologie section 3.9).

NS4B était la protéine la plus difficile à observer avec cette technique probablement dû au fait qu'elle est entièrement membranaire, limitant encore plus l'accessibilité des épitopes par les anticorps (Figure 4-2). En effet, chez le VDEN, NS3 et NS4B se retrouvent dans les CM (Chatel-Chaix et al., 2016; Welsch et al., 2009). Pour contourner ces problèmes, l'immunomarquage pourrait être effectué sur des cryo-sections plutôt que sur des cellules perméabilisées. Ceci permettrait de voir si l'implication de VCP est généralisée aux remodelages membranaires induits par le VZIK ou si cela est spécifique aux CM.

Nous avons aussi montré qu'en immunofluorescence NS3 et NS4B se colocalisent au niveau de structures correspondant probablement à des CM (Figure 3-3). Nos images des immunomarquages couplés à l'or montrent que NS3 et NS4B sont retrouvées en surface de ces structures mais il est fort probable que ces deux protéines se trouvent au sein des CM (voir problème de méthodologie mentionné plus haut). Nous avons également vu que ces protéines interagissent. Il serait intéressant de voir si cette interaction est également indispensable à la réplication du VZIK et si les résidus ultraconservés parmi les *Flavivirus* de la boucle cytosolique comme Q134, R136, G140, M140 (Q136, R138, G142 et M142 chez le VZIK) sont aussi importants pour l'interaction (voir introduction section 1.8.1; Chatel-Chaix et al., 2015). Nos résultats préliminaires nous montrent que les mutations Q136A, M144A et R138A semblent perturber l'association avec NS3 (Figure 4-3).

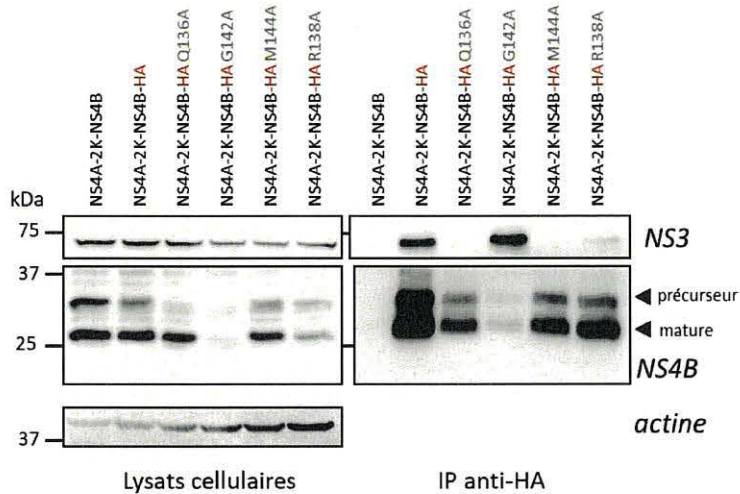


Figure 4-3 Interaction NS4B/NS3 : mutants NS4B

Des cellules Huh7.5-T7 qui expriment de manière stable NS2B3 du VZIK ont été transfectées avec les constructions indiquées. 18 heures après la transfection, des extraits cellulaires ont été préparés et soumis à une immunoprécipitation avec des anticorps anti-HA de souris. Les éluats obtenus et les lysats cellulaires ont été analysés par western blot en utilisant les anticorps indiqués (méthodologie section 3.9).

L'utilisation de virus rapporteurs comportant les différentes mutations dans NS4B pourrait nous permettre d'établir l'importance de cette interaction sur la réplication virale.

De plus, il semblerait que la fonction ATPase de VCP ne soit pas importante pour l'interaction NS3/NS4B (Figure 3-8). En effet, le ratio de NS3/NS4B immunoprécipité ne semble pas changer lors du traitement avec le NMS-873 (Figure 4-4).

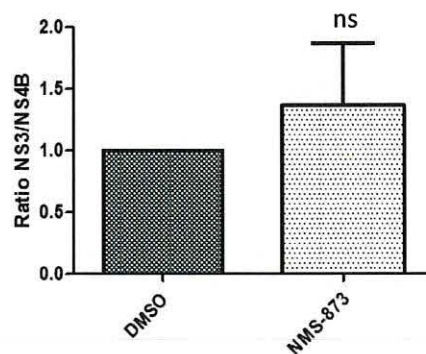


Figure 4-4 Quantification ratio NS3/NS4B

Quantification du ratio de NS3 immunoprécipité sur NS4B immunoprécipité (la Figure 3-8 A de l'article est associée). Les barres d'erreur indiquent les SEM qui ont été calculées à partir de 4 expériences indépendantes. ns: non-significatif. P-value >0.1.

La boucle cytosolique étant la seule portion cytosolique de NS4B il serait intéressant de déterminer si cette portion est aussi importante pour l'interaction avec VCP. Nos résultats préliminaires montrent que les mutations affectant l'interaction avec NS3 (Q136, M144 et R138A) ne semblent pas affecter l'interaction avec VCP (données non montrées). Ainsi les déterminants de l'interaction semblent être différents et il ne semble pas y avoir de compétition entre NS3 et VCP pour l'interaction avec NS4B. Des études futures devront identifier les déterminants importants pour l'interaction VCP/NS4B chez le VZIK.

Il est possible que l'importance de VCP au niveau des CM soit en lien avec ses rôles dans les mécanismes cellulaires de réponse au stress du RE comme la réponse UPR, le phénomène d'ERAD ou encore l'autophagie. En effet, VCP est une protéine au cœur de ces mécanismes par son rôle de chaperonne, de ségrégase et de son implication dans le ciblage des protéines à la dégradation par le protéasome (Van den Boom and Meyer, 2018).

De façon intéressante, plusieurs études ont démontré que les *Flavivirus* modulent ces mécanismes pour faciliter leur réplication (Heaton and Randall, 2010; Kanlaya et al., 2010; Yu et al., 2006). La réplication des *Flavivirus* se fait en très proche association avec le RE qui fournit les éléments essentiels tels que des protéines et des lipides en plus de servir de plateforme pour différentes étapes du cycle comme la traduction et maturation de la polyprotéine, la réplication de l'ARNv ou encore l'encapsidation (introduction section 1.4).

Lors de l'infection, les changements métaboliques et l'abondance des protéines virales entraînent une accumulation de protéines incorrectement repliées et induisent le stress du RE. L'une des réponses pour remédier à ce stress est l'UPR. Ce mécanisme permet l'induction de différentes voies de signalisation ayant pour but de rétablir l'homéostasie. Pour cela, l'arrêt de la machinerie de traduction, l'augmentation de la dégradation des protéines mal repliées ou encore l'augmentation de la production des chaperonnes impliquées dans le repliement des protéines peuvent être induits. Le mécanisme ERAD est la dégradation des protéines du RE et implique les acteurs responsables de leur extraction jusqu'à leur transport au niveau du protéasome. Il peut être activé par l'UPR. Si le retour à l'homéostasie ne se fait pas dans un certain laps de temps ou si la perturbation se prolonge, l'UPR peut entraîner le déclenchement de voies menant à la mort cellulaire par apoptose (Hampton, 2000).

Ainsi, les mécanismes de l'UPR et de l'ERAD sont manipulés par les *Flavivirus* pour, dans une certaine mesure, empêcher l'induction prématurée de la mort de la cellule par apoptose et ceci

supposément pour leur laisser le temps de se répliquer. Plusieurs études montrent que les *Flavivirus* induisent l'UPR au début de l'infection par différents procédés. Par exemple, la protéase virale NS2B3 du VDEN participerait à l'épissage de XBP1 (Yu et al., 2006). De plus, l'infection de fibroblastes d'embryons de souris déficientes pour certaines voies de l'UPR comme PERK ou IRE1 montre une diminution de la réplication virale confirmant la nécessité de ce mécanisme dans la réplication du VDEN (Peña and Harris, 2011).

Le VNO est capable d'activer l'UPR et cela entraîne une production des chaperonnes et une induction de biogenèse membranaire profitant la réplication virale. Cette étude montre aussi qu'une induction trop longue de l'UPR entraîne la mort cellulaire par apoptose (Medigeschi et al., 2007). Nos résultats montrent que VCP est relocalisée au niveau des CM et sa quantité ne semble pas changer lors de l'infection par le VZIK (Figure 3-2 et Figure 3-4). De plus, les CM sont des structures imposantes, riches en protéines virales et cellulaires et leur établissement implique probablement de nombreuses chaperonnes cellulaires comme VCP. Considérant cela, il est possible que VCP, par son interaction avec NS4B, soit retenue au niveau des OR pour permettre de maximiser son rôle au sein des CM où la quantité de protéines incorrectement repliées est probablement très grande. Cela permettrait une réponse plus rapide et empêcherait donc une activation précoce de l'apoptose. Cette hypothèse est soutenue par nos résultats montrant une augmentation de l'induction d'apoptose associée à l'infection par le VZIK lorsque VCP est inhibée par le NMS-873 (Figure 3-10). VCP serait donc un facteur proviral utilisé par le virus pour retarder l'apoptose et ce possiblement pour avoir plus de temps pour se répliquer.

Paradoxalement, l'infection dans le cortex cérébral humain par le VZIK entraîne une forte induction de l'UPR et cela mène à de l'apoptose prématurée. Cette étude montre aussi que l'inhibition pharmacologique de l'UPR réduit l'incidence de la microcéphalie dans un modèle de souris (Gladwyn-Ng et al., 2018). D'autres *Flavivirus* neurotropes induisent aussi l'UPR entraînant une augmentation d'apoptose prématurée dans les neurones (Su et al., 2002). Ainsi, l'équilibre entre l'effet anti- et pro- apoptotique de l'UPR peut dépendre de différents facteurs tels que le type cellulaire ou le moment de l'infection. Il se peut que les *Flavivirus* aient évolué pour pouvoir induire l'UPR au début de l'infection pour répondre au stress du RE en inhibant l'apoptose puis de déclencher l'apoptose en fin de réplication comme stratégie de propagation au sein du système nerveux. De façon très intéressante, NS4B semble être la protéine capable de moduler les effecteurs de l'UPR chez le VDEN et elle est suspectée être la protéine qui permet d'équilibrer les fonctions pro- et anti- apoptotiques de l'UPR induites par le virus (Sepúlveda-Salinas and Ramos-Castañeda, 2017).

Ainsi le VZIK semble être capable d'inhiber l'apoptose par différentes stratégies et les protéines non-structurales semblent être importantes pour ce phénomène. Par exemple, certaines d'entre-elles, y compris NS4B, inhibent l'induction de l'IFN entraînant une réduction de la mort par apoptose induite par le virus (Wu et al., 2017). Un des mécanismes d'inhibition de l'IFN serait l'élongation mitochondriale. Il a été montré que NS4B est la protéine responsable de l'élongation mitochondriale chez le VDENV en inhibant la phosphorylation activatrice de DRP1, responsable de la fission des mitochondries. Ce mécanisme entraîne une atténuation de l'immunité innée induite par RIG-I. Dans la même étude, un lien physique entre les CM et les mitochondries avait été établi. De plus, la modulation de la morphologie mitochondriale montrait un impact sur la morphodynamique des CM (Chatel-Chaix et al., 2016). Dans notre étude, nous montrons que VCP semble également importante pour la morphologie des mitochondries car nous avons observé que son inhibition avec les NMS-873 entraîne une perte de l'élongation mitochondriale induite par le VZIK. Cependant il reste à déterminer si l'inhibition de VCP perturbe la morphologie des mitochondries et c'est cela qui perturbe les CM ou si la perturbation des CM entraîne une perturbation des mitochondries. Pour tester cela, des cellules où la morphologie des mitochondries est contrôlée (knockdown de DRP1 ou de MFN2 par exemple), pourraient être infectées et traitées avec le NMS-873. En effet, MFN2 est une protéine résidente des mitochondries qui se localisent sur leur membrane externe et favorisent leur fusion. DRP1 est principalement cytosolique et est transféré aux mitochondries pour médier leur fragmentation via son activité liée à la dynamine (Chan, 2012). Cet équilibre fusion/fission peut être influencé en modulant l'expression de ces facteurs. En effet, le knockdown de DRP1 stimule l'élongation des mitochondries, tandis que le knockdown de MFN2 favorise leur fragmentation (Chatel-Chaix et al., 2016). Suite au traitement avec le NMS-873 dans ces cellules, les CM pourraient être analysées en microscopie électronique.

Il faut savoir que VCP est aussi impliquée dans le mécanisme de dégradation associé aux mitochondries (MAD) et dans la mitophagie (autophagie des mitochondries). Elle est responsable d'extraire et d'envoyer à la dégradation des protéines associées aux membranes mitochondriales telles que les protéines de la famille des Mitofusines (MFN 1 et 2) qui sont impliquées dans la fusion des mitochondries. De plus, la Mitofusine 2 (MFN 2) est aussi impliquée dans l'interface RE/mitochondries et sa dégradation entraîne une fragmentation mitochondriale et permet notamment de faciliter leur élimination par le processus autophagique (McLelland et al., 2018). La fission des mitochondries (dépendante de DRP1) est un phénomène stimulant l'apoptose en facilitant l'oligomérisation de BAX (Montessuit et al., 2010).

Considérant l'importance de l'élongation des mitochondries ainsi que de l'interface RE/mitochondries lors de l'infection par le VDEN, nous pouvons émettre l'hypothèse que VCP serait séquestré au niveau des CM pour empêcher l'élimination des facteurs menant à la fragmentation mitochondriale tels que MFN2 et que ceci empêcherait l'induction de l'apoptose. Il serait intéressant d'étudier le lien entre la morphologie des mitochondries et l'induction de l'apoptose dans le contexte de l'infection par le VZIK. De plus, le modèle cellulaire que nous avons utilisé dans notre étude (cellules d'hépatocarcinome Huh7.5) ne présente pas de réponse immunitaire dépendante de RIG-I (Sumpter et al., 2005). Ainsi, l'implication de cette voie dans l'induction de l'apoptose peut être exclue (Figure 3-10).

La spécificité d'action de VCP dans la protéostasie cellulaire est conférée par ses partenaires protéiques. Ses co-facteurs permettent par exemple, le ciblage spécifique de certaines protéines à la dégradation (Van den Boom and Meyer, 2018). Afin de mieux caractériser l'implication de VCP lors de l'infection par le VZIK il serait intéressant d'étudier son interactome. Connaître la nature de ses substrats et de ses co-facteurs lors de l'infection permettrait d'avoir une idée plus précise sur son implication. Par la suite des analyses de son protéome lors d'un traitement avec un inhibiteur de sa fonction ATPase comme le NMS-873 pourrait donner plus d'informations concernant les substrats importants lors de l'infection par le VZIK.

Notre étude permet d'appuyer le modèle dans lequel les CM tamponneraient des mécanismes défavorables à la réplication virale. En effet cette structure permet d'atténuer des voies de l'immunité innée en altérant les MAMs ou en séquestrant des facteurs des voies de signalisations antivirales comme STING (Chatel-Chaix et al., 2016; Yu et al., 2012; Chatel-Chaix et Bartenschlager non publié). Nos données suggèrent que l'induction de l'apoptose pourrait aussi être un mécanisme atténué par les CM et que l'ATPase cellulaire VCP est importante dans ce processus.

Finalement, nous avons vu dans cette étude que l'inhibiteur de la fonction ATPase de VCP, le NMS-873, possède une activité antivirale lors de l'infection par le VZIK. Considérant l'importance de VCP dans le développement neuronal, il est tentant de spéculer que ce facteur serait détourné par le virus et que cela pourrait être impliqué dans la microcéphalie induite par l'infection. Pour tester cette hypothèse, il serait pertinent dans un premier temps d'étudier le développement du cerveau par la croissance de neurosphères lors d'un traitement avec le NMS-873. En effet les CNP foétales pourraient être infectées et traitées avec l'inhibiteur, puis les tailles des organoïdes obtenues pourraient être mesurées et comparées. Nous nous attendons à voir une altération de la neurogenèse moins importante lors du traitement. Des modèles murins pourrait également être

utilisés pour étudier l'effet des inhibiteurs de VCP lors de l'infection par le VZIK en regardant la létalité (Lazear et al., 2016; Shan et al., 2016) ou la transmission verticale et l'induction de la microcéphalie (Cugola et al., 2016).

De plus, si les études des mutations pathologiques familiales sur la réplication du VZIK montrent des effets intéressants, cela voudrait dire que les polymorphismes de VCP pourraient être indicatifs de la gravité des symptômes induits par le virus. Pour tester cela il serait également intéressant d'analyser ces différentes mutations dans un contexte de neurogenèse. L'étude des polymorphismes non-pathogéniques de VCP pourrait également être intéressante.

Il faut savoir que le NMS-873 ainsi que d'autres inhibiteurs de VCP sont bien tolérés chez la souris ce qui en fait des inhibiteurs attrayants pour des thérapies anti-flavivirales (Anderson et al., 2015). Parmi ceux-ci, le CB-5083 a même atteint le stade d'étude clinique de phase I dans le contexte de cancer (Le Moigne et al., 2017). Il serait intéressant de voir si ce type d'inhibiteur pourrait permettre de traiter les infections induites par le VZIK ou s'il pourrait prévenir la transmission verticale responsable des microcéphalies.

5 CONCLUSION

Pour conclure nous avons vu dans cette étude que l'ATPase cellulaire VCP est importante pour la réplication du virus Zika. Nous avons vu qu'elle est relocalisée aux CM lors de l'infection et qu'elle interagit avec NS4B, protéine résidente des CM. Nous avons aussi vu que NS3 et NS4B interagissent et qu'elles se retrouvent au niveau des CM. VCP semble importante pour la biogenèse ou le maintien des CM car son inhibition par le NMS-873 entraîne une diminution de leur taille et de leur nombre. De plus, VCP semble importante pour l'élongation mitochondriale et pour limiter l'induction de l'apoptose lors de l'infection (Voir schéma modèles Figure 5-1).

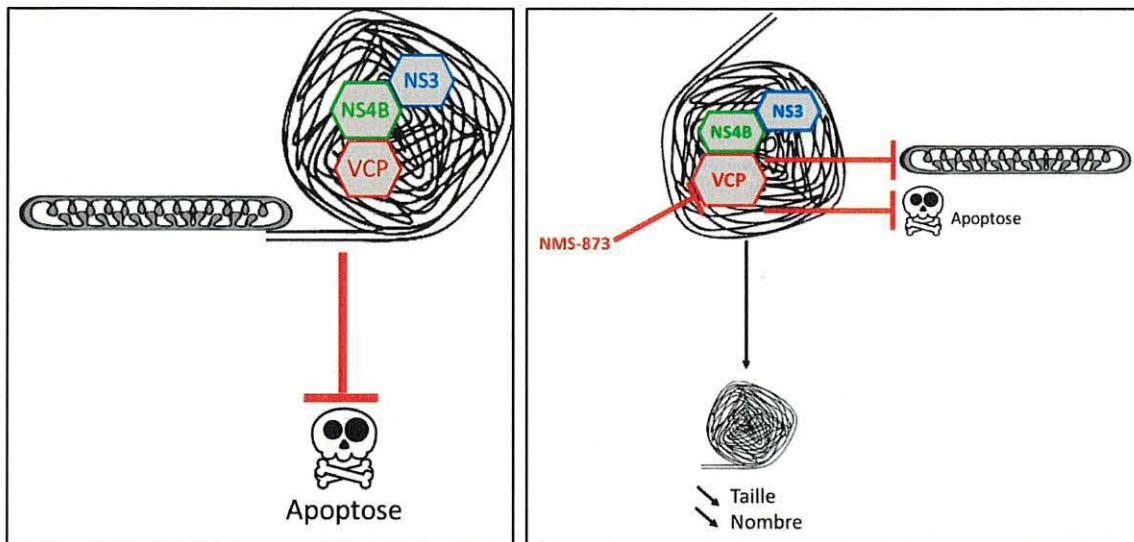


Figure 5-1 Modèles récapitulatifs

Le premier modèle (à gauche) récapitule les effets possibles de VCP lors de l'infection par le VZIK. VCP interagit avec NS4B et est relocalisée aux CM lors de l'infection. VCP semble importante pour la biogenèse ou le maintien des CM et elle semble importante pour l'élongation mitochondriale induite par le virus. Finalement VCP permet de retarder l'apoptose induite par le VZIK.

Le deuxième modèle (à droite) récapitule les effets du NMS-873 lors de l'infection par le VZIK. Le traitement avec le NMS-873 entraîne une diminution de la taille et du nombre des CM induites par le virus. Le NMS-873 entraîne également une inhibition de l'élongation mitochondriale et augmente l'apoptose induites par le VZIK.

Nos résultats semblent appuyer l'hypothèse dans laquelle les CM tamponneraient des mécanismes défavorables à la réplication virale, ici l'induction de l'apoptose. Cette hypothèse nécessite toutefois une étude plus approfondie afin d'être confirmée.

Les études *in vivo* permettront d'évaluer le potentiel thérapeutique des inhibiteurs de VCP sur l'infection par le VZIK et plus particulièrement sur l'induction des microcéphalies congénitales. Considérant que certains de ces inhibiteurs sont déjà testés en stade clinique pour le cancer, une approche de réorientation de traitement pourrait être envisagée.

6 REFERENCES

- Agarwal, A., Vibha, D., Srivastava, A.K., Shukla, G., and Prasad, K. (2017). Guillain-Barre syndrome complicating chikungunya virus infection. *J. Neurovirol.* 23, 504–507.
- Aguiar, M., Halstead, S.B., and Stollenwerk, N. (2017). Consider stopping dengvaxia administration without immunological screening. *Expert Rev Vaccines* 16, 301–302.
- Aguirre, S., Maestre, A.M., Pagni, S., Patel, J.R., Savage, T., Gutman, D., Maringer, K., Bernal-Rubio, D., Shabman, R.S., Simon, V., et al. (2012). DENV Inhibits Type I IFN Production in Infected Cells by Cleaving Human STING. *PLOS Pathogens* 8, e1002934.
- Aguirre, S., Luthra, P., Sanchez-Aparicio, M.T., Maestre, A.M., Patel, J., Lamothe, F., Fredericks, A.C., Tripathi, S., Zhu, T., Pintado-Silva, J., et al. (2017). Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. *Nat Microbiol* 2, 1–11.
- Aktepe, T.E., Liebscher, S., Prier, J.E., Simmons, C.P., and Mackenzie, J.M. (2017). The Host Protein Reticulon 3.1A Is Utilized by Flaviviruses to Facilitate Membrane Remodelling. *Cell Reports* 21, 1639–1654.
- Alimonti, J.B., Ribecco-Lutkiewicz, M., Sodja, C., Jezierski, A., Stanimirovic, D.B., Liu, Q., Haqqani, A.S., Conlan, W., and Bani-Yaghoub, M. (2018). Zika virus crosses an in vitro human blood brain barrier model. *Fluids and Barriers of the CNS* 15, 15.
- Anderson, D.J., Le Moigne, R., Djakovic, S., Kumar, B., Rice, J., Wong, S., Wang, J., Yao, B., Valle, E., Kiss von Soly, S., et al. (2015). Targeting the AAA ATPase p97 as an Approach to Treat Cancer through Disruption of Protein Homeostasis. *Cancer Cell* 28, 653–665.
- Arita, M., Wakita, T., and Shimizu, H. (2012). Valosin-containing protein (VCP/p97) is required for poliovirus replication and is involved in cellular protein secretion pathway in poliovirus infection. *J. Virol.* 86, 5541–5553.
- Asselah, T. (2014). Sofosbuvir for the treatment of hepatitis C virus. *Expert Opin Pharmacother* 15, 121–130.
- Atkinson, B., Hearn, P., Afrough, B., Lumley, S., Carter, D., Aarons, E.J., Simpson, A.J., Brooks, T.J., and Hewson, R. (2016). Detection of Zika Virus in Semen. *Emerging Infect. Dis.* 22, 940.

- Banerjee, S., Bartesaghi, A., Merk, A., Rao, P., Bulfer, S.L., Yan, Y., Green, N., Mroczkowski, B., Neitz, R.J., Wipf, P., et al. (2016). 2.3 Å resolution cryo-EM structure of human p97 and mechanism of allosteric inhibition. *Science* 351, 871–875.
- Barbier, V., Lang, D., Valois, S., Rothman, A.L., and Medin, C.L. (2017). Dengue virus induces mitochondrial elongation through impairment of Drp1-triggered mitochondrial fission. *Virology* 500, 149–160.
- Barrows, N.J., Campos, R.K., Powell, S., Prasanth, K.R., Schott-Lerner, G., Soto-Acosta, R., Galarza-Muñoz, G., McGrath, E.L., Urrabaz-Garza, R., Gao, J., et al. (2016). A screen of FDA-approved drugs for inhibitors of Zika virus infection. *Cell Host Microbe* 20, 259–270.
- Beau, F., Mallet, H.-P., Lastère, S., Broult, J., and Laperche, S. (2019). Transfusion risk associated with recent arbovirus outbreaks in French Polynesia. *Vox Sang.*
- Bebeacua, C., Förster, A., McKeown, C., Meyer, H.H., Zhang, X., and Freemont, P.S. (2012). Distinct conformations of the protein complex p97-Ufd1-Npl4 revealed by electron cryomicroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1098–1103.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2, 326–332.
- Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Sankoh, O., et al. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496, 504–507.
- Bhattacharyya, S., Sen, U., and Vratsi, S. (2014). Regulated IRE1-dependent decay pathway is activated during Japanese encephalitis virus-induced unfolded protein response and benefits viral replication. *J. Gen. Virol.* 95, 71–79.
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Coutard, B., Decroly, E., de Lamballerie, X., Gould, E.A., et al. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Res* 87, 125–148.
- Brahms, A., Mudhasani, R., Pinkham, C., Kota, K., Nasar, F., Zamani, R., Bavari, S., and Kehn-Hall, K. (2017). Sorafenib Impedes Rift Valley Fever Virus Egress by Inhibiting Valosin-Containing Protein Function in the Cellular Secretory Pathway. *J. Virol.* 91.

- Brasil, P., Pereira, J.P., Moreira, M.E., Ribeiro Nogueira, R.M., Damasceno, L., Wakimoto, M., Rabello, R.S., Valderramos, S.G., Halai, U.-A., Salles, T.S., et al. (2016). Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N. Engl. J. Med.* 375, 2321–2334.
- Buchberger, A. (2010). Control of ubiquitin conjugation by cdc48 and its cofactors. *Subcell. Biochem.* 54, 17–30.
- Cao-Lormeau, V., Blake, A., Mons, S., Lastere, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., Dub, T., Baudouin, L., Teissier, A., Larre, P., et al. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak caused by ZIKA virus infection in French Polynesia. *Lancet* 387, 1531–1539.
- Capeding, M.R., Tran, N.H., Hadinegoro, S.R.S., Ismail, H.I.H.J.M., Chotpitayasunondh, T., Chua, M.N., Luong, C.Q., Rusmil, K., Wirawan, D.N., Nallusamy, R., et al. (2014). Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet* 384, 1358–1365.
- Carissimo, G., Chan, Y.-H., Utt, A., Chua, T.-K., Bakar, F.A., Merits, A., and Ng, L.F.P. (2019). VCP/p97 Is a Proviral Host Factor for Replication of Chikungunya Virus and Other Alphaviruses. *Front Microbiol* 10, 2236.
- Cauchemez, S., Besnard, M., Bompard, P., Dub, T., Guillemette-Artur, P., Eyrolle-Guignot, D., Salje, H., Van Kerkhove, M.D., Abadie, V., Garel, C., et al. (2016). Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–2015: a retrospective study. *Lancet* 387, 2125–2132.
- CDC (2019). Congenital Zika Syndrome & Other Birth Defects | CDC. <https://www.cdc.gov/pregnancy/zika/testing-follow-up/zika-syndrome-birth-defects.html> (consulté le 02 janvier 2020).
- Chan, D.C. (2012). Fusion and Fission: Interlinked Processes Critical for Mitochondrial Health. *Annu. Rev. Genet.* 46, 265–287.
- Chatel-Chaix, L., and Bartenschlager, R. (2014). Dengue Virus- and Hepatitis C Virus-Induced Replication and Assembly Compartments: the Enemy Inside—Caught in the Web. *Journal of Virology* 88, 5907–5911.
- Chatel-Chaix, L., Fischl, W., Scaturro, P., Cortese, M., Kallis, S., Bartenschlager, M., Fischer, B., and Bartenschlager, R. (2015). A Combined Genetic-Proteomic Approach Identifies Residues within Dengue Virus NS4B Critical for Interaction with NS3 and Viral Replication. *Journal of Virology* 89, 7170–7186.

- Chatel-Chaix, L., Cortese, M., Romero-Brey, I., Bender, S., Neufeldt, C.J., Fischl, W., Scaturro, P., Schieber, N., Schwab, Y., Fischer, B., et al. (2016). Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell Host Microbe* 20, 342–356.
- Cheng, C.Y., and Mruk, D.D. (2012). The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. *Pharmacol Rev* 64, 16–64.
- Chou, T.-F., Li, K., Frankowski, K.J., Schoenen, F.J., and Deshaies, R.J. (2013). Structure-activity relationship study reveals ML240 and ML241 as potent and selective inhibitors of p97 ATPase. *ChemMedChem* 8, 297–312.
- Cortese, M., Goellner, S., Acosta, E.G., Neufeldt, C.J., Oleksiuk, O., Lampe, M., Haselmann, U., Funaya, C., Schieber, N., Ronchi, P., et al. (2017). Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Rep* 18, 2113–2123.
- Cugola, F.R., Fernandes, I.R., Russo, F.B., Freitas, B.C., Dias, J.L.M., Guimarães, K.P., Benazzato, C., Almeida, N., Pignatari, G.C., Romero, S., et al. (2016). The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* 534, 267–271.
- Dalrymple, N.A., Cimica, V., and Mackow, E.R. (2015). Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant. *MBio* 6, e00553-00515.
- Daniels, B.P., Kofman, S.B., Smith, J.R., Norris, G.T., Snyder, A.G., Kolb, J.P., Gao, X., Locasale, J.W., Martinez, J., Gale, M., et al. (2019). The Nucleotide Sensor ZBP1 and Kinase RIPK3 Induce the Enzyme IRG1 to Promote an Antiviral Metabolic State in Neurons. *Immunity* 50, 64-76.e4.
- Dick, G.W.A., Kitchen, S.F., and Haddow, A.J. (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 46, Issue 5, September 1952, Pages 509–520.
- Duffy, M.R., Chen, T.-H., Hancock, W.T., Powers, A.M., Kool, J.L., Lanciotti, R.S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., et al. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine* 360, 2536–2543.
- Dupont-Rouzeyrol, M., Biron, A., O'Connor, O., Huguon, E., and Descloux, E. (2016). Infectious Zika viral particles in breastmilk. *The Lancet* 387, 1051.
- Durbin, A.P. (2016). Dengue Antibody and Zika: Friend or Foe? *Trends in Immunology* 37, 635–636.

- Fernández-Sáiz, V., and Buchberger, A. (2010). Imbalances in p97 co-factor interactions in human proteinopathy. *EMBO Reports* 11, 479–485.
- Franz, A.W.E., Kantor, A.M., Passarelli, A.L., and Clem, R.J. (2015). Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses* 7, 3741–3767.
- Fribley, A., Zhang, K., and Kaufman, R.J. (2009). Regulation of Apoptosis by the Unfolded Protein Response. *Methods Mol Biol* 559, 191–204.
- Gaudinski, M.R., Houser, K.V., Morabito, K.M., Hu, Z., Yamshchikov, G., Rothwell, R.S., Berkowitz, N., Mendoza, F., Saunders, J.G., Novik, L., et al. (2018). Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. *Lancet* 391, 552–562.
- Ghouzzi, V.E., Bianchi, F.T., Molineris, I., Mounce, B.C., Berto, G.E., Rak, M., Lebon, S., Aubry, L., Tocco, C., Gai, M., et al. (2016). ZIKA virus elicits P53 activation and genotoxic stress in human neural progenitors similar to mutations involved in severe forms of genetic microcephaly. *Cell Death Dis* 7, e2440.
- Gillespie, L.K., Hoenen, A., Morgan, G., and Mackenzie, J.M. (2010). The Endoplasmic Reticulum Provides the Membrane Platform for Biogenesis of the Flavivirus Replication Complex. *Journal of Virology* 84, 10438–10447.
- Giordano, B.V., Gasparotto, A., Liang, P., Nelder, M.P., Russell, C., and Hunter, F.F. (2019). Discovery of an *Aedes (Stegomyia) albopictus* population and first records of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in Canada. *Med. Vet. Entomol.*
- Gitcho, M.A., Strider, J., Carter, D., Taylor-Reinwald, L., Forman, M.S., Goate, A.M., and Cairns, N.J. (2009). VCP Mutations Causing Frontotemporal Lobar Degeneration Disrupt Localization of TDP-43 and Induce Cell Death. *J Biol Chem* 284, 12384–12398.
- Gladwyn-Ng, I., Córdón-Barris, L., Alfano, C., Creppe, C., Couderc, T., Morelli, G., Thelen, N., America, M., Bessières, B., Encha-Razavi, F., et al. (2018). Stress-induced unfolded protein response contributes to Zika virus-associated microcephaly. *Nat. Neurosci.* 21, 63–71.
- Gonzalez, M.A., Feely, S.M., Speziani, F., Strickland, A.V., Danzi, M., Bacon, C., Lee, Y., Chou, T.-F., Blanton, S.H., Weihl, C.C., et al. (2014). A novel mutation in VCP causes Charcot–Marie–Tooth Type 2 disease. *Brain* 137, 2897–2902.

Gourinat, A.-C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C., and Dupont-Rouzeyrol, M. Detection of Zika Virus in Urine - Volume 21, Number 1—January 2015 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC.

Govero, J., Esakky, P., Scheaffer, S.M., Fernandez, E., Drury, A., Platt, D.J., Gorman, M.J., Richner, J.M., Caine, E.A., Salazar, V., et al. (2016). Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature* 540, 438–442.

Guo, X., Sun, X., Hu, D., Wang, Y.-J., Fujioka, H., Vyas, R., Chakrapani, S., Joshi, A.U., Luo, Y., Mochly-Rosen, D., et al. (2016). VCP recruitment to mitochondria causes mitophagy impairment and neurodegeneration in models of Huntington's disease. *Nat Commun* 7.

Halstead, S.B. (2018). Safety issues from a Phase 3 clinical trial of a live-attenuated chimeric yellow fever tetravalent dengue vaccine. *Hum Vaccin Immunother* 14, 2158–2162.

Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Perera-Lecoin, M., Surasombatpattana, P., Talignani, L., Thomas, F., et al. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J. Virol.* 89, 8880–8896.

Hamel, R., Ferraris, P., Wichit, S., Diop, F., Talignani, L., Pompon, J., Garcia, D., Liégeois, F., Sall, A.A., Yssel, H., et al. (2017). African and Asian Zika virus strains differentially induce early antiviral responses in primary human astrocytes. *Infect. Genet. Evol.* 49, 134–137.

Hampton, R.Y. (2000). ER stress response: Getting the UPR hand on misfolded proteins. *Current Biology* 10, R518–R521.

Haubenberger, D., Bittner, R.E., Rauch-Shorny, S., Zimprich, F., Mannhalter, C., Wagner, L., Mineva, I., Vass, K., Auff, E., and Zimprich, A. (2005). Inclusion body myopathy and Paget disease is linked to a novel mutation in the VCP gene. *Neurology* 65, 1304–1305.

He, Z., Chen, J., Zhu, X., An, S., Dong, X., Yu, J., Zhang, S., Wu, Y., Li, G., Zhang, Y., et al. (2018). NLRP3 Inflammasome Activation Mediates Zika Virus-Associated Inflammation. *J. Infect. Dis.* 217, 1942–1951.

Heaton, N.S., and Randall, G. (2010). Dengue virus induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe* 8, 422–432.

Heaton, N.S., Perera, R., Berger, K.L., Khadka, S., LaCount, D.J., Kuhn, R.J., and Randall, G. (2010). Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *PNAS* 107, 17345–17350.

- Heidelberger, J.B., Voigt, A., Borisova, M.E., Petrosino, G., Ruf, S., Wagner, S.A., and Beli, P. (2018). Proteomic profiling of VCP substrates links VCP to K6-linked ubiquitylation and c-Myc function. *EMBO Rep.* 19.
- Hills, S.L., Russell, K., Hennessey, M., Williams, C., Oster, A.M., Fischer, M., and Mead, P. (2016). Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission - Continental United States, 2016. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 215–216.
- Horner, S.M., Liu, H.M., Park, H.S., Briley, J., and Gale, M. (2011). Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14590–14595.
- Hou, W., Han, J., Lu, C., Goldstein, L.A., and Rabinowich, H. (2010). Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* 6, 891–900.
- Huang, M., Xu, A., Wu, X., Zhang, Y., Guo, Y., Guo, F., Pan, Z., and Kong, L. (2016). Japanese encephalitis virus induces apoptosis by the IRE1/JNK pathway of ER stress response in BHK-21 cells. *Arch. Virol.* 161, 699–703.
- Huang, Y., Li, Y., Zhang, H., Zhao, R., Jing, R., Xu, Y., He, M., Peer, J., Kim, Y.C., Luo, J., et al. (2018). Zika virus propagation and release in human fetal astrocytes can be suppressed by neutral sphingomyelinase-2 inhibitor GW4869. *Cell Discov* 4, 1–16.
- Hury, D.M., Kornfilt, D.J.P., and Wipf, P. (2019). p97: An Emerging Target for Cancer, Neurodegenerative Diseases, and Viral Infections. *J. Med. Chem.*
- Imamura, S., Yabu, T., and Yamashita, M. (2012). Protective role of cell division cycle 48 (CDC48) protein against neurodegeneration via ubiquitin-proteasome system dysfunction during zebrafish development. *J. Biol. Chem.* 287, 23047–23056.
- Ishikawa, H., and Barber, G.N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455, 674–678.
- Ishikawa, H., Ma, Z., and Barber, G.N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461, 788–792.
- Junjhon, J., Pennington, J.G., Edwards, T.J., Perera, R., Lanman, J., and Kuhn, R.J. (2014). Ultrastructural Characterization and Three-Dimensional Architecture of Replication Sites in Dengue Virus-Infected Mosquito Cells. *J Virol* 88, 4687–4697.

- Kanlaya, R., Pattanakitsakul, S., Sinchaikul, S., Chen, S.-T., and Thongboonkerd, V. (2010). The ubiquitin-proteasome pathway is important for dengue virus infection in primary human endothelial cells. *J. Proteome Res.* 9, 4960–4971.
- Khaiboullina, S.F., Ribeiro, F.M., Uppal, T., Martynova, E.V., Rizvanov, A.A., and Verma, S.C. (2019). Zika Virus Transmission Through Blood Tissue Barriers. *Front. Microbiol.* 10.
- Khakh, B.S., and Sofroniew, M.V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat. Neurosci.* 18, 942–952.
- Kuivanen, S., Bepalov, M.M., Nandania, J., Ianevski, A., Velagapudi, V., De Brabander, J.K., Kainov, D.E., and Vapalahti, O. (2017). Obatoclox, saliphenylhalamide and gemcitabine inhibit Zika virus infection in vitro and differentially affect cellular signaling, transcription and metabolism. *Antiviral Research* 139, 117–128.
- Kustermann, M., Manta, L., Paone, C., Kustermann, J., Lausser, L., Wiesner, C., Eichinger, L., Clemen, C.S., Schröder, R., Kestler, H.A., et al. (2018). Loss of the novel Vcp (valosin containing protein) interactor Washc4 interferes with autophagy-mediated proteostasis in striated muscle and leads to myopathy in vivo. *Autophagy* 14, 1911–1927.
- Lazear, H.M., Govero, J., Smith, A.M., Platt, D.J., Fernandez, E., Miner, J.J., and Diamond, M.S. (2016). A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host & Microbe* 19, 720–730.
- Le Moigne, R., Aftab, B.T., Djakovic, S., Dhimolea, E., Valle, E., Murnane, M., King, E.M., Soriano, F., Menon, M.-K., Wu, Z.Y., et al. (2017). The p97 Inhibitor CB-5083 Is a Unique Disrupter of Protein Homeostasis in Models of Multiple Myeloma. *Mol. Cancer Ther.* 16, 2375–2386.
- Leda, A.R., Bertrand, L., Andras, I.E., El-Hage, N., Nair, M., and Toborek, M. (2019). Selective Disruption of the Blood–Brain Barrier by Zika Virus. *Front. Microbiol.* 10.
- Lee, J.K., and Shin, O.S. (2019). Advances in Zika Virus–Host Cell Interaction: Current Knowledge and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 20.
- Li, C., Xu, D., Ye, Q., Hong, S., Jiang, Y., Liu, X., Zhang, N., Shi, L., Qin, C.-F., and Xu, Z. (2016a). Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* 19, 120–126.
- Li, C., Wang, Q., Jiang, Y., Ye, Q., Xu, D., Gao, F., Xu, J.W., Wang, R., Zhu, X., Shi, L., et al. (2018). Disruption of glial cell development by Zika virus contributes to severe microcephalic newborn mice. *Cell Discov* 4.

- Li, H., Saucedo-Cuevas, L., Regla-Nava, J.A., Chai, G., Sheets, N., Tang, W., Terskikh, A.V., Shrestha, S., and Gleeson, J.G. (2016b). Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. *Cell Stem Cell* 19, 593–598.
- Liang, Q., Luo, Z., Zeng, J., Chen, W., Foo, S.-S., Lee, S.-A., Ge, J., Wang, S., Goldman, S.A., Zlokovic, B.V., et al. (2016). Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell* 19, 663–671.
- Lin, C., Amberg, S.M., Chambers, T.J., and Rice, C.M. (1993). Cleavage at a novel site in the NS4A region by the yellow fever virus NS2B-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4A/4B signalase site. *J. Virol.* 67, 2327–2335.
- Lin, D., Li, L., Xie, T., Yin, Q., Saksena, N., Wu, R., Li, W., Dai, G., Ma, J., Zhou, X., et al. (2018). Codon usage variation of Zika virus: The potential roles of NS2B and NS4A in its global pandemic. *Virus Research* 247, 71–83.
- Link, N., Chung, H., Jolly, A., Withers, M., Tepe, B., Arenkiel, B.R., Shah, P.S., Krogan, N.J., Aydin, H., Geckinli, B.B., et al. (2019). Mutations in ANKLE2, a ZIKA Virus Target, Disrupt an Asymmetric Cell Division Pathway in *Drosophila* Neuroblasts to Cause Microcephaly. *Developmental Cell* 51, 713-729.e6.
- Loe, M.W.C., Lee, R.C.H., and Chu, J.J.H. (2019). Antiviral activity of the FDA-approved drug candesartan cilexetil against Zika virus infection. *Antiviral Research* 172, 104637.
- Long, A.R., Yang, M., Kaiser, K., and Shepherd, D. (1998). Isolation and characterisation of smallminded, a *Drosophila* encoding a new member of the Cdc48p/VCP subfamily of AAA proteins. *Gene* 208, 191–199.
- Lucchese, G., and Kanduc, D. (2016). Zika virus and autoimmunity: From microcephaly to Guillain-Barré syndrome, and beyond. *Autoimmun Rev* 15, 801–808.
- Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A., and Parton, R.G. (2007). Cholesterol Manipulation by West Nile Virus Perturbs the Cellular Immune Response. *Cell Host & Microbe* 2, 229–239.
- Magnaghi, P., D'Alessio, R., Valsasina, B., Avanzi, N., Rizzi, S., Asa, D., Gasparri, F., Cozzi, L., Cucchi, U., Orrenius, C., et al. (2013). Covalent and allosteric inhibitors of the ATPase VCP/p97 induce cancer cell death. *Nat. Chem. Biol.* 9, 548–556.

- Mann, T.Z., Haddad, L.B., Williams, T.R., Hills, S.L., Read, J.S., Dee, D.L., Dziuban, E.J., Pérez-Padilla, J., Jamieson, D.J., Honein, M.A., et al. (2018). Breast Milk Transmission of Flaviviruses in the Context of Zika Virus: A Systematic Review. *Paediatr Perinat Epidemiol* 32, 358–368.
- Martinet, J.-P., Ferté, H., Failloux, A.-B., Schaffner, F., and Depaquit, J. (2019). Mosquitoes of North-Western Europe as Potential Vectors of Arboviruses: A Review. *Viruses* 11.
- Mazeaud, C., Freppel, W., and Chatel-Chaix, L. (2018). The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis. *Front Genet* 9.
- McLean, J.E., Wudzinska, A., Datan, E., Quaglino, D., and Zakeri, Z. (2011). Flavivirus NS4A-induced Autophagy Protects Cells against Death and Enhances Virus Replication. *J Biol Chem* 286, 22147–22159.
- McLelland, G.-L., Goiran, T., Yi, W., Dorval, G., Chen, C.X., Lauinger, N.D., Krahn, A.I., Valimehr, S., Rakovic, A., Rouiller, I., et al. (2018). Mfn2 ubiquitination by PINK1/parkin gates the p97-dependent release of ER from mitochondria to drive mitophagy. *Elife* 7.
- Medigeshi, G.R., Lancaster, A.M., Hirsch, A.J., Briese, T., Lipkin, W.I., DeFilippis, V., Früh, K., Mason, P.W., Nikolich-Zugich, J., and Nelson, J.A. (2007a). West Nile virus infection activates the unfolded protein response, leading to CHOP induction and apoptosis. *J. Virol.* 81, 10849–10860.
- Medigeshi, G.R., Lancaster, A.M., Hirsch, A.J., Briese, T., Lipkin, W.I., DeFilippis, V., Früh, K., Mason, P.W., Nikolich-Zugich, J., and Nelson, J.A. (2007b). West Nile Virus Infection Activates the Unfolded Protein Response, Leading to CHOP Induction and Apoptosis. *Journal of Virology* 81, 10849–10860.
- Medlock, J.M., Vaux, A.G., Cull, B., Schaffner, F., Gillingham, E., Pfluger, V., and Leach, S. (2017). Detection of the invasive mosquito species *Aedes albopictus* in southern England. *The Lancet Infectious Diseases* 17, 140.
- Mello, A.S., Pascalicchio Bertozzi, A.P.A., Rodrigues, M.M.D., Gazeta, R.E., Moron, A.F., Soriano-Arandes, A., Sarmiento, S.G.P., Vedovello, D., Silva, A.C.B., Grillo Fajardo, T.C., et al. (2019). Development of Secondary Microcephaly After Delivery: Possible Consequence of Mother-Baby Transmission of Zika Virus in Breast Milk. *Am J Case Rep* 20, 723–725.

- Messina, J.P., Kraemer, M.U., Brady, O.J., Pigott, D.M., Shearer, F.M., Weiss, D.J., Golding, N., Ruktanonchai, C.W., Gething, P.W., Cohn, E., et al. (2016). Mapping global environmental suitability for Zika virus. *Elife* 5.
- Meyer, H., and Wehl, C.C. (2014). The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease pathogenesis. *J. Cell. Sci.* 127, 3877–3883.
- Miller, S., Sparacio, S., and Bartenschlager, R. (2006). Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *J. Biol. Chem.* 281, 8854–8863.
- Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Bühler, S., and Bartenschlager, R. (2007). The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J. Biol. Chem.* 282, 8873–8882.
- Miner, J.J., and Diamond, M.S. (2017). Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host & Microbe* 21, 134–142.
- Miner, J.J., Sene, A., Richner, J.M., Smith, A.M., Santeford, A., Ban, N., Weger-Lucarelli, J., Manzella, F., Rückert, C., Govero, J., et al. (2016). Zika Virus Infection in Mice Causes Panuveitis with Shedding of Virus in Tears. *Cell Reports* 16, 3208–3218.
- Miorin, L., Romero-Brey, I., Maiuri, P., Hoppe, S., Krijnse-Locker, J., Bartenschlager, R., and Marcello, A. (2013). Three-Dimensional Architecture of Tick-Borne Encephalitis Virus Replication Sites and Trafficking of the Replicated RNA. *Journal of Virology* 87, 6469–6481.
- Mladinich, M.C., Schwedes, J., and Mackow, E.R. (2017). Zika Virus Persistently Infects and Is Basolaterally Released from Primary Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *MBio* 8.
- Monel, B., Compton, A.A., Bruel, T., Amraoui, S., Burlaud-Gaillard, J., Roy, N., Guivel-Benhassine, F., Porrot, F., Génin, P., Meertens, L., et al. (2017). Zika virus induces massive cytoplasmic vacuolization and paraptosis-like death in infected cells. *The EMBO Journal* 36, 1653–1668.
- Montessuit, S., Somasekharan, S.P., Terrones, O., Lucken-Ardjomande, S., Herzig, S., Schwarzenbacher, R., Manstein, D.J., Bossy-Wetzler, E., Basañez, G., Meda, P., et al. (2010). Membrane Remodeling Induced by the Dynamin-Related Protein Drp1 Stimulates Bax Oligomerization. *Cell* 142, 889–901.
- Moradpour, D., Penin, F., and Rice, C.M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5, 453–463.

- Moura da Silva, A.A., Ganz, J.S.S., Sousa, P. da S., Doriqui, M.J.R., Ribeiro, M.R.C., Branco, M.D.R.F.C., Queiroz, R.C. de S., Pacheco, M. de J.T., Vieira da Costa, F.R., Silva, F. de S., et al. (2016). Early Growth and Neurologic Outcomes of Infants with Probable Congenital Zika Virus Syndrome. *Emerging Infect. Dis.* 22, 1953–1956.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., and Rossmann, M.G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 13–22.
- Mulkey, S.B., Arroyave-Wessel, M., Peyton, C., Bulas, D.I., Fourzali, Y., Jiang, J., Russo, S., McCarter, R., Msall, M.E., du Plessis, A.J., et al. (2020). Neurodevelopmental Abnormalities in Children With In Utero Zika Virus Exposure Without Congenital Zika Syndrome. *JAMA Pediatr.*
- Müller, J.M.M., Deinhardt, K., Rosewell, I., Warren, G., and Shima, D.T. (2007). Targeted deletion of p97 (VCP/CDC48) in mouse results in early embryonic lethality. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354, 459–465.
- Muñoz, L.S., Parra, B., and Pardo, C.A. (2017). Neurological Implications of Zika Virus Infection in Adults. *J Infect Dis* 216, S897–S905.
- Muñoz-Jordán, J.L., Laurent-Rolle, M., Ashour, J., Martínez-Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W.I., and García-Sastre, A. (2005). Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J. Virol.* 79, 8004–8013.
- Musso, D., Nilles, E.J., and Cao-Lormeau, V.-M. (2014). Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection* 20, O595–O596.
- Musso, D., Roche, C., Nhan, T.-X., Robin, E., Teissier, A., and Cao-Lormeau, V.-M. (2015a). Detection of Zika virus in saliva. *Journal of Clinical Virology* 68, 53–55.
- Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., and Cao-Lormeau, V.-M. (2015b). Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerging Infect. Dis.* 21, 359–361.
- Musso, D., Ko, A.I., and Baud, D. (2019). Zika Virus Infection — After the Pandemic. *New England Journal of Medicine* 381, 1444–1457.
- Nascimento, O.J.M., and da Silva, I.R.F. (2017). Guillain-Barré syndrome and Zika virus outbreaks. *Curr. Opin. Neurol.* 30, 500–507.
- Neufeldt, C.J., Cortese, M., Acosta, E.G., and Bartenschlager, R. (2018). Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 125–142.

- Ngo, A.M., Shurtleff, M.J., Popova, K.D., Kulsuptrakul, J., Weissman, J.S., and Puschnik, A.S. (2019). The ER membrane protein complex is required to ensure correct topology and stable expression of flavivirus polyproteins. *ELife* 8.
- Ojha, C.R., Rodriguez, M., Lapiere, J., Muthu Karuppan, M.K., Branscome, H., Kashanchi, F., and El-Hage, N. (2018). Complementary Mechanisms Potentially Involved in the Pathology of Zika Virus. *Front Immunol* 9, 2340.
- Okamoto, T., Suzuki, T., Kusakabe, S., Tokunaga, M., Hirano, J., Miyata, Y., and Matsuura, Y. (2017). Regulation of Apoptosis during Flavivirus Infection. *Viruses* 9.
- Panda, D., Rose, P.P., Hanna, S.L., Gold, B., Hopkins, K.C., Lyde, R.B., Marks, M.S., and Cherry, S. (2013). Genome-wide RNAi screen identifies SEC61A and VCP as conserved regulators of Sindbis virus entry. *Cell Rep* 5, 1737–1748.
- Papadopoulos, C., Kirchner, P., Bug, M., Grum, D., Koerver, L., Schulze, N., Poehler, R., Dressler, A., Fengler, S., Arhzaouy, K., et al. (2017). VCP/p97 cooperates with YOD1, UBXD1 and PLAA to drive clearance of ruptured lysosomes by autophagy. *The EMBO Journal* 36, 135–150.
- Patergnani, S., Missiroli, S., Marchi, S., and Giorgi, C. (2015). Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes Microenvironment: Targeting Autophagic and Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. *Front Oncol* 5.
- Pattnaik, A., Palermo, N., Sahoo, B.R., Yuan, Z., Hu, D., Annamalai, A.S., Vu, H.L.X., Correias, I., Prathipati, P.K., Destache, C.J., et al. (2018). Discovery of a non-nucleoside RNA polymerase inhibitor for blocking Zika virus replication through in silico screening. *Antiviral Res.* 151, 78–86.
- Paul, D., and Bartenschlager, R. (2013). Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World J Virol* 2, 32–48.
- Paul, D., and Bartenschlager, R. (2015). Flaviviridae Replication Organelles: Oh, What a Tangled Web We Weave. *Annu Rev Virol* 2, 289–310.
- Paul, L.M., Carlin, E.R., Jenkins, M.M., Tan, A.L., Barcellona, C.M., Nicholson, C.O., Michael, S.F., and Isern, S. (2016). Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. *Clin Transl Immunology* 5, e117.
- Peña, J., and Harris, E. (2011). Dengue virus modulates the unfolded protein response in a time-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 286, 14226–14236.

- Peng, H., Liu, B., Yves, T.D., He, Y., Wang, S., Tang, H., Ren, H., Zhao, P., Qi, Z., and Qin, Z. (2018). Zika Virus Induces Autophagy in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Viruses* 10.
- Perera, N., Miller, J.L., and Zitzmann, N. (2017). The role of the unfolded protein response in dengue virus pathogenesis. *Cellular Microbiology* 19, e12734.
- Perera-Lecoin, M., Meertens, L., Carnec, X., and Amara, A. (2013). Flavivirus Entry Receptors: An Update. *Viruses* 6, 69–88.
- Phongphaew, W., Kobayashi, S., Sasaki, M., Carr, M., Hall, W.W., Orba, Y., and Sawa, H. (2017). Valosin-containing protein (VCP/p97) plays a role in the replication of West Nile virus. *Virus Research* 228, 114–123.
- Phoo, W.W., Li, Y., Zhang, Z., Lee, M.Y., Loh, Y.R., Tan, Y.B., Ng, E.Y., Lescar, J., Kang, C., and Luo, D. (2016). Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. *Nat Commun* 7.
- Pijlman, G.P., Funk, A., Kondratieva, N., Leung, J., Torres, S., van der Aa, L., Liu, W.J., Palmenberg, A.C., Shi, P.-Y., Hall, R.A., et al. (2008). A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host Microbe* 4, 579–591.
- Plaszczyca, A., Scaturro, P., Neufeldt, C.J., Cortese, M., Cerikan, B., Ferla, S., Brancale, A., Pichlmair, A., and Bartenschlager, R. (2019). A novel interaction between dengue virus nonstructural protein 1 and the NS4A-2K-4B precursor is required for viral RNA replication but not for formation of the membranous replication organelle. *PLOS Pathogens* 15, e1007736.
- Pluskota, B., Jöst, A., Augsten, X., Stelzner, L., Ferstl, I., and Becker, N. (2016). Successful overwintering of *Aedes albopictus* in Germany. *Parasitol. Res.* 115, 3245–3247.
- Poland, G.A., Ovsyannikova, I.G., and Kennedy, R.B. (2019). Zika Vaccine Development: Current Status. *Mayo Clinic Proceedings* 94, 2572–2586.
- Puerta-Guardo, H., Glasner, D.R., Espinosa, D.A., Biering, S.B., Patana, M., Rathasiri, K., Wang, C., Beatty, P.R., and Harris, E. (2019). Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial Dysfunction Reflecting Disease Tropism. *Cell Rep* 26, 1598-1613.e8.
- Puerta-Guardo, H., Tabata, T., Pettitt, M., Dimitrova, M., Glasner, D.R., Pereira, L., and Harris, E. (2020). Zika Virus Nonstructural Protein 1 Disrupts Glycosaminoglycans and Causes Permeability in Developing Human Placentas. *J. Infect. Dis.* 221, 313–324.

- Quicke, K.M., Bowen, J.R., Johnson, E.L., McDonald, C.E., Ma, H., O'Neal, J.T., Rajakumar, A., Wrammert, J., Rimawi, B.H., Pulendran, B., et al. (2016). Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe* 20, 83–90.
- Ritz, D., Vuk, M., Kirchner, P., Bug, M., Schütz, S., Hayer, A., Bremer, S., Lusk, C., Baloh, R.H., Lee, H., et al. (2011). Endolysosomal sorting of ubiquitylated caveolin-1 is regulated by VCP and UBXD1 and impaired by VCP disease mutations. *Nature Cell Biology* 13, 1116–1123.
- Romero-Brey, I., and Bartenschlager, R. (2014). Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses. *Viruses* 6, 2826–2857.
- Romero-Brey, I., and Bartenschlager, R. (2016). Endoplasmic Reticulum: The Favorite Intracellular Niche for Viral Replication and Assembly. *Viruses* 8.
- Romero-Brey, I., Berger, C., Kallis, S., Kolovou, A., Paul, D., Lohmann, V., and 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.
- Roosendaal, J., Westaway, E.G., Khromykh, A., and Mackenzie, J.M. (2006). Regulated Cleavages at the West Nile Virus NS4A-2K-NS4B Junctions Play a Major Role in Rearranging Cytoplasmic Membranes and Golgi Trafficking of the NS4A Protein. *Journal of Virology* 80, 4623–4632.
- Rothan, H.A., Zhong, Y., Sanborn, M.A., Teoh, T.C., Ruan, J., Yusof, R., Hang, J., Henderson, M.J., and Fang, S. (2019). Small molecule grp94 inhibitors block dengue and Zika virus replication. *Antiviral Research* 171, 104590.
- Ruan, J., Rothan, H.A., Zhong, Y., Yan, W., Henderson, M.J., Chen, F., and Fang, S. (2019). A small molecule inhibitor of ER-to-cytosol protein dislocation exhibits anti-dengue and anti-Zika virus activity. *Sci Rep* 9, 1–12.
- Rumpf, S., and Jentsch, S. (2006). Functional Division of Substrate Processing Cofactors of the Ubiquitin-Selective Cdc48 Chaperone. *Molecular Cell* 21, 261–269.
- Rumpf, S., Lee, S.B., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2011). Neuronal remodeling and apoptosis require VCP-dependent degradation of the apoptosis inhibitor DIAP1. *Development* 138, 1153–1160.
- Sacramento, C.Q., Melo, G.R. de, Freitas, C.S. de, Rocha, N., Hoelz, L.V.B., Miranda, M., Fintelman-Rodrigues, N., Marttorelli, A., Ferreira, A.C., Barbosa-Lima, G., et al. (2017). The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. *Sci Rep* 7, 1–12.

- Scaturro, P., Stukalov, A., Haas, D.A., Cortese, M., Draganova, K., Płaszczycza, A., Bartenschlager, R., Götz, M., and Pichlmair, A. (2018). An orthogonal proteomic survey uncovers novel Zika virus host factors. *Nature* 561, 253–257.
- Sepúlveda-Salinas, K.J., and Ramos-Castañeda, J. (2017). Participation of dengue virus NS4B protein in the modulation of immune effectors dependent on ER stress in insect cells. *Cell Stress and Chaperones* 22, 799–810.
- Shah, P.S., Link, N., Jang, G.M., Sharp, P.P., Zhu, T., Swaney, D.L., Johnson, J.R., Von Dollen, J., Ramage, H.R., Satkamp, L., et al. (2018). Comparative Flavivirus-Host Protein Interaction Mapping Reveals Mechanisms of Dengue and Zika Virus Pathogenesis. *Cell* 175, 1931–1945.e18.
- Shaily, S., and Upadhya, A. (2019). Zika virus: Molecular responses and tissue tropism in the mammalian host. *Reviews in Medical Virology* 29, e2050.
- Shan, C., Xie, X., Muruato, A.E., Rossi, S.L., Roundy, C.M., Azar, S.R., Yang, Y., Tesh, R.B., Bourne, N., Barrett, A.D., et al. (2016). An Infectious cDNA Clone of Zika Virus to Study Viral Virulence, Mosquito Transmission, and Antiviral Inhibitors. *Cell Host & Microbe* 19, 891–900.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* 3, 99–111.
- Shiryayev, S.A., Farhy, C., Pinto, A., Huang, C.-T., Simonetti, N., Elong Ngonu, A., Dewing, A., Shresta, S., Pinkerton, A.B., Cieplak, P., et al. (2017). Characterization of the Zika virus two-component NS2B-NS3 protease and structure-assisted identification of allosteric small-molecule antagonists. *Antiviral Res.* 143, 218–229.
- Siemann, D.N., Strange, D.P., Maharaj, P.N., Shi, P.-Y., and Verma, S. (2017). Zika Virus Infects Human Sertoli Cells and Modulates the Integrity of the In Vitro Blood-Testis Barrier Model. *J. Virol.* 91.
- Silva, L.A., and Dermody, T.S. (2017). Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J Clin Invest* 127, 737–749.
- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E.A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D.B., et al. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J Gen Virol* 98, 2–3.

- Simon, O., Billot, S., Guyon, D., Daures, M., Descloux, E., Gourinat, A.C., Molko, N., and Dupont-Rouzeyrol, M. (2016). Early Guillain–Barré Syndrome associated with acute dengue fever. *Journal of Clinical Virology* 77, 29–31.
- Sirohi, D., and Kuhn, R.J. (2017). Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *J Infect Dis* 216, S935–S944.
- Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T.C., Rossmann, M.G., and Kuhn, R.J. (2016). The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science* 352, 467–470.
- Smith, D.R., Hollidge, B., Daye, S., Zeng, X., Blancett, C., Kuszpit, K., Bocan, T., Koehler, J.W., Coyne, S., Minogue, T., et al. (2017). Neuropathogenesis of Zika Virus in a Highly Susceptible Immunocompetent Mouse Model after Antibody Blockade of Type I Interferon. *PLoS Negl Trop Dis* 11, e0005296.
- Song, B.-H., Yun, S.-I., Woolley, M., and Lee, Y.-M. (2017). Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *J. Neuroimmunol.* 308, 50–64.
- de Sousa, J.R., Azevedo, R. do S. da S., Quaresma, J.A.S., and Vasconcelos, P.F. da C. (2019). Cell Death And Zika Virus: An Integrated Network Of The Mechanisms Of Cell Injury. *Infect Drug Resist* 12, 2917–2921.
- de Sousa, J.R. de, Azevedo, R.S.S., Filho, A.J.M., Araujo, M.T.F., Moutinho, E.R.C., Vasconcelos, B.C.B., Cruz, A.C.R., Oliveira, C.S., Martins, L.C., Vasconcelos, B.H.B., et al. (2018). Correlation between Apoptosis and in Situ Immune Response in Fatal Cases of Microcephaly Caused by Zika Virus. *The American Journal of Pathology* 188, 2644–2652.
- Souza, B.S.F., Sampaio, G.L.A., Pereira, C.S., Campos, G.S., Sardi, S.I., Freitas, L.A.R., Figueira, C.P., Paredes, B.D., Nonaka, C.K.V., Azevedo, C.M., et al. (2016). Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Sci Rep* 6, 39775.
- Stern, O., Hung, Y.-F., Valdau, O., Yaffe, Y., Harris, E., Hoffmann, S., Willbold, D., and Sklan, E.H. (2013). An N-terminal amphipathic helix in dengue virus nonstructural protein 4A mediates oligomerization and is essential for replication. *J. Virol.* 87, 4080–4085.
- Stolz, A., Hilt, W., Buchberger, A., and Wolf, D.H. (2011). Cdc48: a power machine in protein degradation. *Trends in Biochemical Sciences* 36, 515–523.

- Su, H.-L., Liao, C.-L., and Lin, Y.-L. (2002). Japanese Encephalitis Virus Infection Initiates Endoplasmic Reticulum Stress and an Unfolded Protein Response. *Journal of Virology* 76, 4162–4171.
- Sumpter, R., Loo, Y.-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M., and Gale, M. (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J. Virol.* 79, 2689–2699.
- Sun, W., Li, Y., Chen, L., Chen, H., You, F., Zhou, X., Zhou, Y., Zhai, Z., Chen, D., and Jiang, Z. (2009). ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *PNAS* 106, 8653–8658.
- Tabata, T., Pettitt, M., Puerta-Guardo, H., Michlmayr, D., Wang, C., Fang-Hoover, J., Harris, E., and Pereira, L. (2016). Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host & Microbe* 20, 155–166.
- Tabata, T., Pettitt, M., Puerta-Guardo, H., Michlmayr, D., Harris, E., and Pereira, L. (2018). Zika Virus Replicates in Proliferating Cells in Explants From First-Trimester Human Placentas, Potential Sites for Dissemination of Infection. *J Infect Dis* 217, 1202–1213.
- Taguwa, S., Yeh, M.-T., Rainbolt, T.K., Nayak, A., Shao, H., Gestwicki, J.E., Andino, R., and Frydman, J. (2019). Zika Virus Dependence on Host Hsp70 Provides a Protective Strategy against Infection and Disease. *Cell Rep* 26, 906-920.e3.
- Tanaka, A., Cleland, M.M., Xu, S., Narendra, D.P., Suen, D.-F., Karbowski, M., and Youle, R.J. (2010). Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin/PINK1- and Parkin-mediated proteasomal degradation of Mfn1 and Mfn2. *J Cell Biol* 191, 1367–1380.
- Tang, H., Hammack, C., Ogden, S.C., Wen, Z., Qian, X., Li, Y., Yao, B., Shin, J., Zhang, F., Lee, E.M., et al. (2016a). Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* 18, 587–590.
- Tang, W.W., Young, M.P., Mamidi, A., Regla-Nava, J.A., Kim, K., and Shresta, S. (2016b). A Mouse Model of Zika Virus Sexual Transmission and Vaginal Viral Replication. *Cell Rep* 17, 3091–3098.
- Taylor, A., Foo, S.-S., Bruzzone, R., Dinh, L.V., King, N.J.C., and Mahalingam, S. (2015). Fc receptors in antibody-dependent enhancement of viral infections. *Immunological Reviews* 268, 340–364.

- Thepparit, C., Khakpoor, A., Khongwicht, S., Wikan, N., Fongsaran, C., Chingsuwanrote, P., Panraksa, P., and Smith, D.R. (2013). Dengue 2 infection of HepG2 liver cells results in endoplasmic reticulum stress and induction of multiple pathways of cell death. *BMC Res Notes* 6, 372.
- Tresse, E., Salomons, F.A., Vesa, J., Bott, L.C., Kimonis, V., Yao, T.-P., Dantuma, N.P., and Taylor, J.P. (2010). VCP/p97 is essential for maturation of ubiquitin-containing autophagosomes and this function is impaired by mutations that cause IBMPFD. *Autophagy* 6, 217–227.
- Turpin, J., Frumence, E., Desprès, P., Viranaicken, W., and Krejbich-Trotot, P. (2019). The ZIKA Virus Delays Cell Death Through the Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Proteins. *Cells* 8.
- Van den Boom, J., and Meyer, H. (2018). VCP/p97-Mediated Unfolding as a Principle in Protein Homeostasis and Signaling. *Mol. Cell* 69, 182–194.
- Vaz, B., Halder, S., and Ramadan, K. (2013). Role of p97/VCP (Cdc48) in genome stability. *Front Genet* 4.
- Viassolo, V., Previtali, S.C., Schiatti, E., Magnani, G., Minetti, C., Zara, F., Grasso, M., Dagna-Bricarelli, F., and Di Maria, E. (2008). Inclusion body myopathy, Paget's disease of the bone and frontotemporal dementia: recurrence of the VCP R155H mutation in an Italian family and implications for genetic counselling. *Clin. Genet.* 74, 54–60.
- Victoria, C.G., Schuler-Faccini, L., Matijasevich, A., Ribeiro, E., Pessoa, A., and Barros, F.C. (2016). Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers? *The Lancet* 387, 621–624.
- Villordo, S.M., Filomatori, C.V., Sánchez-Vargas, I., Blair, C.D., and Gamarnik, A.V. (2015). Dengue Virus RNA Structure Specialization Facilitates Host Adaptation. *PLOS Pathogens* 11, e1004604.
- Voeltz, G.K., Prinz, W.A., Shibata, Y., Rist, J.M., and Rapoport, T.A. (2006). A Class of Membrane Proteins Shaping the Tubular Endoplasmic Reticulum. *Cell* 124, 573–586.
- Wang, Q., Shinkre, B.A., Lee, J., Weniger, M.A., Liu, Y., Chen, W., Wiestner, A., Trenkle, W.C., and Ye, Y. (2010). The ERAD inhibitor Eeyarestatin I is a bifunctional compound with a membrane-binding domain and a p97/VCP inhibitory group. *PLoS ONE* 5, e15479.
- Wang, Q.-Y., Dong, H., Zou, B., Karuna, R., Wan, K.F., Zou, J., Susila, A., Yip, A., Shan, C., Yeo, K.L., et al. (2015). Discovery of Dengue Virus NS4B Inhibitors. *Journal of Virology* 89, 8233–8244.
- Watts, G.D.J., Wymer, J., Kovach, M.J., Mehta, S.G., Mumm, S., Darvish, D., Pestronk, A., Whyte, M.P., and Kimonis, V.E. (2004). Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone

and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat. Genet.* 36, 377–381.

Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K.E., Walther, P., Fuller, S.D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2009). Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* 5, 365–375.

WHO | Global Strategy for dengue prevention and control, 2012–2020. (2012). <https://www.who.int/denguecontrol/9789241504034/en/> (consulté le 22 janvier 2020).

WHO | Statement on the first meeting of the International Health Regulations (2016) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations. <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1st-emergency-committee-zika/en/> (consulté le 15 décembre 2019).

WHO | Zika virus disease – France. (2019). <http://www.who.int/csr/don/01-november-2019-zika-virus-disease-france/en/> (consulté le 4 janvier 2020).

Woods, C.G. (2004). Human microcephaly. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 112–117.

Wu, Y., Liu, Q., Zhou, J., Xie, W., Chen, C., Wang, Z., Yang, H., and Cui, J. (2017). Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. *Cell Discovery* 3, 1–14.

Xie, X., Zou, J., Wang, Q.-Y., and Shi, P.-Y. (2015). Targeting dengue virus NS4B protein for drug discovery. *Antiviral Research* 118, 39–45.

Yang, S., Xu, M., Lee, E.M., Gorshkov, K., Shiryayev, S.A., He, S., Sun, W., Cheng, Y.-S., Hu, X., Tharappel, A.M., et al. (2018). Emetine inhibits Zika and Ebola virus infections through two molecular mechanisms: inhibiting viral replication and decreasing viral entry. *Cell Discovery* 4, 1–14.

Ye, Y., Tang, W.K., Zhang, T., and Xia, D. (2017). A Mighty “Protein Extractor” of the Cell: Structure and Function of the p97/CDC48 ATPase. *Front. Mol. Biosci.* 4.

Yi, Z., and Yuan, Z. (2017). Aggregation of a hepatitis C virus replicase module induced by ablation of p97/VCP. *J. Gen. Virol.* 98, 1667–1678.

Yi, Z., Fang, C., Zou, J., Xu, J., Song, W., Du, X., Pan, T., Lu, H., and Yuan, Z. (2016). Affinity Purification of the Hepatitis C Virus Replicase Identifies Valosin-Containing Protein, a Member of the ATPases Associated with Diverse Cellular Activities Family, as an Active Virus Replication Modulator. *J. Virol.* 90, 9953–9966.

Yoon, K.-J., Song, G., Qian, X., Pan, J., Xu, D., Rho, H.-S., Kim, N.-S., Habela, C., Zheng, L., Jacob, F., et al. (2017). Zika-Virus-Encoded NS2A Disrupts Mammalian Cortical Neurogenesis by Degrading Adherens Junction Proteins. *Cell Stem Cell* 21, 349-358.e6.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881–891.

Youle, R.J., and Karbowski, M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 657–663.

Yu, C.-Y., Hsu, Y.-W., Liao, C.-L., and Lin, Y.-L. (2006). Flavivirus Infection Activates the XBP1 Pathway of the Unfolded Protein Response To Cope with Endoplasmic Reticulum Stress. *J Virol* 80, 11868–11880.

Yu, C.-Y., Chang, T.-H., Liang, J.-J., Chiang, R.-L., Lee, Y.-L., Liao, C.-L., and Lin, Y.-L. (2012). Dengue Virus Targets the Adaptor Protein MITA to Subvert Host Innate Immunity. *PLOS Pathogens* 8, e1002780.

Yun, S.-I., Song, B.-H., Frank, J.C., Julander, J.G., Polejaeva, I.A., Davies, C.J., White, K.L., and Lee, Y.-M. (2016). Complete Genome Sequences of Three Historically Important, Spatiotemporally Distinct, and Genetically Divergent Strains of Zika Virus: MR-766, P6-740, and PRVABC-59. *Genome Announc.* 4.

Zhang, C., Feng, T., Cheng, J., Li, Y., Yin, X., Zeng, W., Jin, X., Li, Y., Guo, F., and Jin, T. (2017a). Structure of the NS5 methyltransferase from Zika virus and implications in inhibitor design. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 492, 624–630.

Zhang, T., Mishra, P., Hay, B.A., Chan, D., and Guo, M. (2017b). Valosin-containing protein (VCP/p97) inhibitors relieve Mitofusin-dependent mitochondrial defects due to VCP disease mutants. *Elife* 6.

Zhou, H.-J., Wang, J., Yao, B., Wong, S., Djakovic, S., Kumar, B., Rice, J., Valle, E., Soriano, F., Menon, M.-K., et al. (2015). Discovery of a First-in-Class, Potent, Selective, and Orally Bioavailable Inhibitor of the p97 AAA ATPase (CB-5083). *J. Med. Chem.* 58, 9480–9497.

Zimmerman, M.G., Quicke, K.M., O’Neal, J.T., Arora, N., Machiah, D., Priyamvada, L., Kauffman, R.C., Register, E., Adekunle, O., Swieboda, D., et al. (2018). Cross-Reactive Dengue Virus Antibodies Augment Zika Virus Infection of Human Placental Macrophages. *Cell Host & Microbe* 24, 731-742.e6.

Zou, J., Xie, X., Lee, L.T., Chandrasekaran, R., Reynaud, A., Yap, L., Wang, Q.-Y., Dong, H., Kang, C., Yuan, Z., et al. (2014). Dimerization of flavivirus NS4B protein. *J. Virol.* 88, 3379–3391.

Zou, J., Xie, X., Wang, Q.-Y., Dong, H., Lee, M.Y., Kang, C., Yuan, Z., and Shi, P.-Y. (2015). Characterization of dengue virus NS4A and NS4B protein interaction. *J. Virol.* 89, 3455–3470.