

Architecture et biogenèse des organelles de réplication des virus à ARN de polarité positive

William Bakhache¹

Élodie Couderc²

Aymeric Neyret¹

Laurence Briant¹

¹ Université de Montpellier,
Institut de recherche en infectiologie
de Montpellier (IRIM),
UMR9004 CNRS-UM,
1919, route de Mende,
34293 Montpellier cedex 5,
France

² Master de Biologie,
École normale supérieure de Lyon,
Université Claude-Bernard Lyon I,
Université de Lyon,
69342 Lyon cedex 07, France

Résumé. La réplication des agents pathogènes viraux repose sur leur capacité à manipuler leur hôte à des fins provirales. De nombreuses étapes du cycle infectieux dépendent de l'usurpation des membranes cellulaires. Pour les virus possédant un génome composé d'un ARN de polarité positive (ARN(+)) et se répliquant dans le cytoplasme de leur hôte, la réorganisation et le détournement des membranes permettent en particulier la formation d'organelles membranaires hébergeant la réplication virale. La formation de ces compartiments constituant de réelles usines à virus donne lieu à des modifications morphologiques de l'hôte très variables selon le pathogène considéré. Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans de tels remaniements restent le plus souvent incompris. Ils font cependant l'objet d'un intérêt intense puisque la formation de ces organelles de réplication, indispensables à la multiplication virale, représente une cible thérapeutique potentielle. Cette revue fait un état des lieux des connaissances relatives à l'architecture et aux interactions virus-hôte participant à la biogenèse des organelles de réplication des virus à ARN(+).

Mots clés : virus à ARN, organelles de réplication, membranes, interactions hôte-virus

Abstract. The replication of viral pathogens relies on their ability to manipulate their host. Several steps of the infectious cycle require the hijacking of cellular membranes. Positive stranded RNA viruses replicating in the cytoplasm of their host reorganize cellular membranes. This leads to the formation of organelles, which host viral replication. The formation of such compartments, which are genuine viral factories, induces morphological modifications of the host cell, which vary depending on the pathogen. However, the molecular mechanisms underlying such a remodeling remain unclear. These mechanisms are subject to intense research since their formation is indispensable to viral multiplication and therefore represent an attractive therapeutic target. In this review, we provide a bird's eye view on the current knowledge of the architecture and virus-host interactions involved in the biogenesis of positive stranded RNA virus replication organelles.

Key words: RNA virus, replication organelles, membranes, virus-host interactions

Introduction

Les virus à ARN de polarité positive (ARN(+)) constituent plus d'un tiers des virus connus. Cette classe d'agents infectieux regroupe des virus capables d'infecter les plantes ou les animaux et nombre d'entre eux sont responsables

d'épidémies humaines contemporaines, tels que le virus de l'hépatite C (HCV), le virus chikungunya (CHIKV), le virus de la dengue (DENV) ou le virus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS). L'impact de ces pathogènes sur la santé publique s'accompagne de façon générale d'une absence quasi totale de molécule antivirale et de stratégie vaccinale permettant de protéger les populations exposées. Les travaux engagés dans la recherche de cibles thérapeutiques pertinentes ont démontré que, malgré des caractéristiques parfois très distinctes, ces

Correspondance : L. Briant
<laurence.briant@irim.cnrs.fr>

virus répliquent invariablement leur génome en association avec les membranes de leur hôte. L'infection entraîne en effet un remaniement significatif des membranes cellulaires, observable en microscopie électronique sous la forme de vésicules ou de réseaux membranaires complexes dérivés des membranes intracellulaires ou encore de la membrane plasmique. Ce type de structure est d'ailleurs indifféremment observé, qu'il s'agisse de virus d'animaux, d'insectes ou de virus de plantes. Il apparaît désormais que ces organelles renfermant l'ARN et les enzymes virales sont de véritables usines à virus permettant l'ancrage des complexes de réplication et favorisant la concentration de la machinerie enzymatique virale, des métabolites et des cofacteurs cellulaires nécessaires au fonctionnement optimal du complexe de réplication. Ces organelles membranaires constituent également des barrières physiques capables de protéger la machinerie de réplication, tout particulièrement les ARN viraux, vis-à-vis des senseurs et des effecteurs de la réponse immune de l'hôte. Enfin, la formation de ces compartiments constitue une stratégie unique qui permet de séparer spatialement et temporellement l'ARN engagé dans la réplication des processus concurrents tels que la traduction et l'encapsidation d'ARN, souvent localisés à proximité des sites de la réplication virale.

L'identification des mécanismes participant à la formation des compartiments de réplication des virus à ARN(+) constitue donc désormais un enjeu majeur pour l'identification de cibles thérapeutiques pertinentes et le développement de stratégies permettant d'empêcher la multiplication de pathogènes à fort impact sur la santé humaine. Les connaissances actuelles ont largement démontré la contribution des protéines virales non structurales dans les remaniements membranaires indispensables à la biogenèse de ces organelles de réplication. Il est également évident que la formation et le maintien de ces structures nécessitent la contribution de cofacteurs cellulaires dont un grand nombre sont des acteurs du métabolisme lipidique ou participent à la régulation des courbures membranaires ou du trafic vésiculaire. Dans cette revue, nous faisons état des connaissances relatives à l'organisation des organelles membranaires formées lors de la réplication des virus à ARN(+). Nous décrivons également les principales interactions virus-hôte contribuant à la biogenèse de ces compartiments membranaires qui séparent, coordonnent et protègent la réplication du génome viral.

Architecture des organelles membranaires hébergeant la réplication des virus à ARN(+)

La réplication des virus à ARN(+) est initiée, après l'étape de décapsidation, par la prise en charge directe

du génome viral par la machinerie traductionnelle cellulaire (*figure 1*). Ces événements précoces permettent invariablement la traduction d'une polyprotéine dont la maturation par les protéases virales, et parfois cellulaires, permet l'assemblage des enzymes virales (protéines non structurales) et la formation d'une machinerie de réplication fonctionnelle. Ce complexe s'associe rapidement à une copie de ce même ARN génomique et permet la synthèse de nouveaux ARN de polarité positive grâce aux activités polymérase, hélicase et méthyltransférase qu'il contient. Cette synthèse nécessite la production d'un ARN de polarité négative complémentaire au génome viral conduisant temporairement à la présence de duplex d'ARN (ARNdb) dans le cytoplasme des cellules infectées. De façon générale, ces événements se réalisent en étroite association avec les membranes cellulaires. La présence, dans le complexe de réplication, de protéines non structurales contenant un ou plusieurs domaines hydrophobes permet en effet de cibler la machinerie de réplication vers les membranes de divers organites cellulaires où l'assemblage du complexe de réplication actif induit des remaniements membranaires. Ces événements aboutissent à la formation d'un réseau vésiculaire plus ou moins complexe [1]. La détection dans ces compartiments de protéines virales non structurales et de l'ARNdb, servant d'intermédiaire à la transcription de nouveaux ARN, a définitivement désigné ces compartiments comme sites de réplication des virus à ARN(+).

Selon la famille virale, les membranes qui servent de plateforme pour l'assemblage de ces compartiments dérivent soit du réticulum endoplasmique (RE) (*Coronavirus, Picornavirus, Flavivirus, Hepacivirus, Arterivirus*), du Golgi (*Enterovirus*), des membranes mitochondriales (*Nodavirus*), de la membrane plasmique (*Alphavirus*) ou encore des chloroplastes dans les cellules de plante (*Potyvirus, Tymovirus*) [2] (*tableau 1*, page 163). Dans certains cas (virus Flock house [FHV], virus Tomato Bushy Stunt [TBSV]), l'adressage vers ces compartiments spécifiques peut être contourné sans affecter l'efficacité du processus de réplication [3], suggérant la capacité de certains virus à utiliser les membranes de différentes organelles cellulaires en fonction des conditions ou de l'espèce hôte.

Le développement des techniques de cryofixation à haute pression combinées à la microscopie électronique (*cryo-electron microscopy* [Cryo-EM]) ou à la tomographie électronique (*cryo-electron tomography* [Cryo-ET]) (*figure 2*) [4, 5] ainsi que la microscopie électronique à corrélation de fluorescence (*correlative light and electron microscopy* [CLEM]) [5], qui combine les avantages du marquage fluorescent et de la microscopie électronique, ont permis de résoudre l'architecture tridimensionnelle de ces compartiments à une résolution nanométrique, faisant ainsi progresser fondamentalement notre compréhension de leur organisation. Leur utilisation a permis de

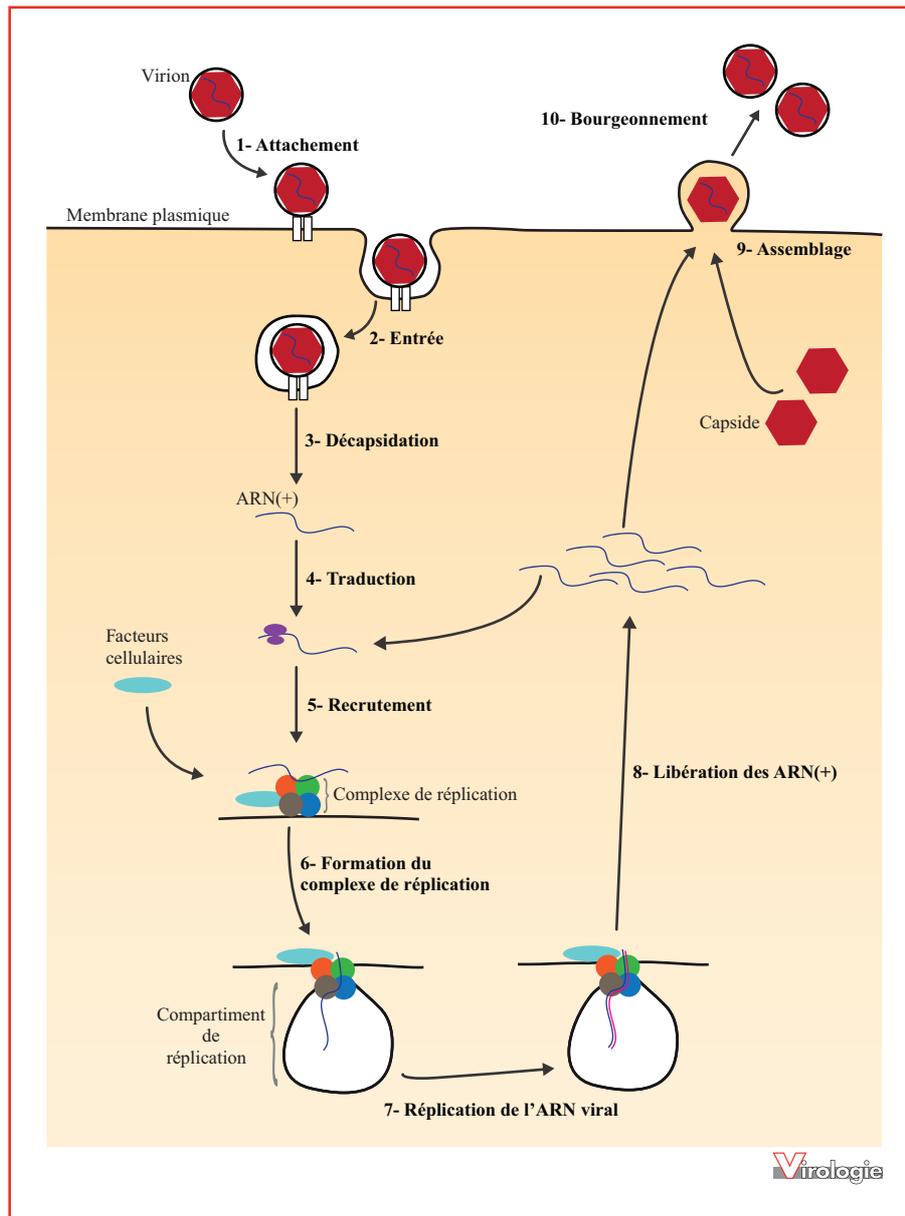


Figure 1. Cycle de réplication des virus à ARN de polarité positive. Après attachement à la membrane plasmique *via* des récepteurs membranaires (1), le virus pénètre dans la cellule hôte (2). S'ensuit une étape de décapsulation (3) qui permet la libération de l'ARN génomique viral dans le cytoplasme. Ces événements précoces mènent à la prise en charge du génome viral par la machinerie de traduction de la cellule hôte, permettant la synthèse de protéines virales (4). Les enzymes virales (protéines non structurales) synthétisées complexées à l'ARN génomique viral ainsi qu'à des facteurs cellulaires sont recrutées à la membrane (5), formant un complexe de réplication fonctionnel (6). La réplication de l'ARN viral est ensuite initiée dans ce compartiment de réplication (7), conduisant à la formation de duplex d'ARN, jusqu'à la libération de multiples copies d'ARN néosynthétisés dans le cytoplasme (8). De nouveaux virions sont finalement assemblés (9) puis libérés dans le milieu extracellulaire (10).

séparer ces compartiments en deux catégories morphologiques (figure 3) :

- les compartiments résultant d'une invagination positive des membranes cellulaires vers le cytoplasme. Il s'agit généralement de structures vésiculaires délimitées par une

double membrane (DMV) et connectées les unes aux autres, formant un compartiment de 150-300 nm identifié par exemple dans les cellules infectées par les *Coronavirus* (virus du syndrome respiratoire aigu sévère [SARS-CoV] [6], virus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient

Tableau 1 Facteurs cellulaires impliqués dans la biogenèse des organelles de réplication des virus à ARN(+).

Famille	Virus	Hôte	Organelle de réplication	Compartiment	Facteur cellulaire	Références
<i>Flavivirus</i>	DENV	Homme/oiseau/ primate/moustique		RE	OSBP, FASN, vimentine, Arf1/GBF1, réticulon	[51, 60, 70, 85]
	WNV				HMGCR, réticulon	[49, 85]
	ZIKV				Vimentine, réticulon	[14, 85]
	YFV				Arf1/GBF1	[68]
<i>Alphavirus</i>	SINV	Homme/moustique	SMV	MP/lysosomes	BIN/amphiphysin	[86]
	SFV				BIN/amphiphysin	[86]
	CHIKV				BIN/amphiphysin	[86]
<i>Nodavirus</i>	FHV	Insecte		Mitochondrie	Inconnu	
<i>Tombusvirus</i>	TBSV	Plante/levure		Péroxyosome	ESCRT, actine	[77, 78]
<i>Bromovirus</i>	BMV	Plante/levure		RE	ESCRT, réticulon, Ole1	[76, 82, 113]
<i>Picornavirus</i>	CBV3	Homme		Golgi	OSBP, Arf1/GBF1, PI4KIII α	[44, 47]
	PV				Arf1/GBF1, LC3	[67, 114]
<i>Hepacivirus</i>	HCV	Homme		RE	OSBP, FASN, PI4KIII α , PI4KIII β FAPP2, Arf1/GBF1, hVAP-A, PSTPIP2, réticulon	[43, 44, 48, 53, 58, 83, 84, 91, 115]
<i>Coronavirus</i>	MHV	Homme	DMV		Arf1/GBF1, LC3-I	
	SARS-CoV	Homme			Inconnu	
	MERS-CoV	Homme		RE	Inconnu	[72, 93, 111]
	IBV	Homme			Inconnu	
<i>Arterivirus</i>	PRRSV	Mammifère		RE	Inconnu	

BMV : virus de la mosaïque du Brome ; CBV3 : coxsackievirus B3 ; CHIKV : virus chikungunya ; DENV : virus de la dengue ; FHV : virus Flock House ; HCV : virus de l'hépatite C ; IBV : virus de la bronchite infectieuse ; MERS-CoV : Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient ; MHV : virus de l'hépatite murine ; PRRSV : virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcin ; PV : poliovirus ; SARS-CoV : Coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère ; SFV : virus de la forêt de Semliki ; SINV : virus Sindbis ; TBSV : virus Tomato Bushy Stunt ; WNV : virus du Nil occidental ; YFV : virus de la fièvre jaune ; ZIKV : virus Zika ; DMV : vésicule à double membrane ; MP : membrane plasmique ; RE : réticulum endoplasmique ; SMV : vésicule à simple membrane.

[MERS-CoV] et virus de l'hépatite murine [MHV] [7] ou de taille plus limitée (95-100 nm) dans le cas des *Arteriviridae* [3]. Ces structures à double membrane (DMV) sont également observées dans un contexte d'infection par le HCV (*figure 2D*) par opposition aux autres *Flaviviridae* [8]. La purification de ces compartiments a permis d'y détecter une activité réplicase, confirmant le rôle de ces structures dans la multiplication virale. Cependant, de façon surprenante, seulement 10 % de ces structures à double membrane apparaissent connectées au cytoplasme [9], suggérant soit

la possibilité que seul un petit nombre de ces structures sont engagées dans la réplication virale, soit l'existence de systèmes actifs de transport qui permettraient l'import, depuis le cytoplasme, des métabolites nécessaires à la réplication et l'export des ARN néosynthétisés depuis les organelles de réplication. La détection de nucléoporines (Nup358, Nup155, Nup53, Nup153, Nup98) dans les régions du cytoplasme avoisinant les organelles formées par le HCV [10] est en faveur de cette dernière hypothèse. Certaines études proposent enfin une localisation du complexe de

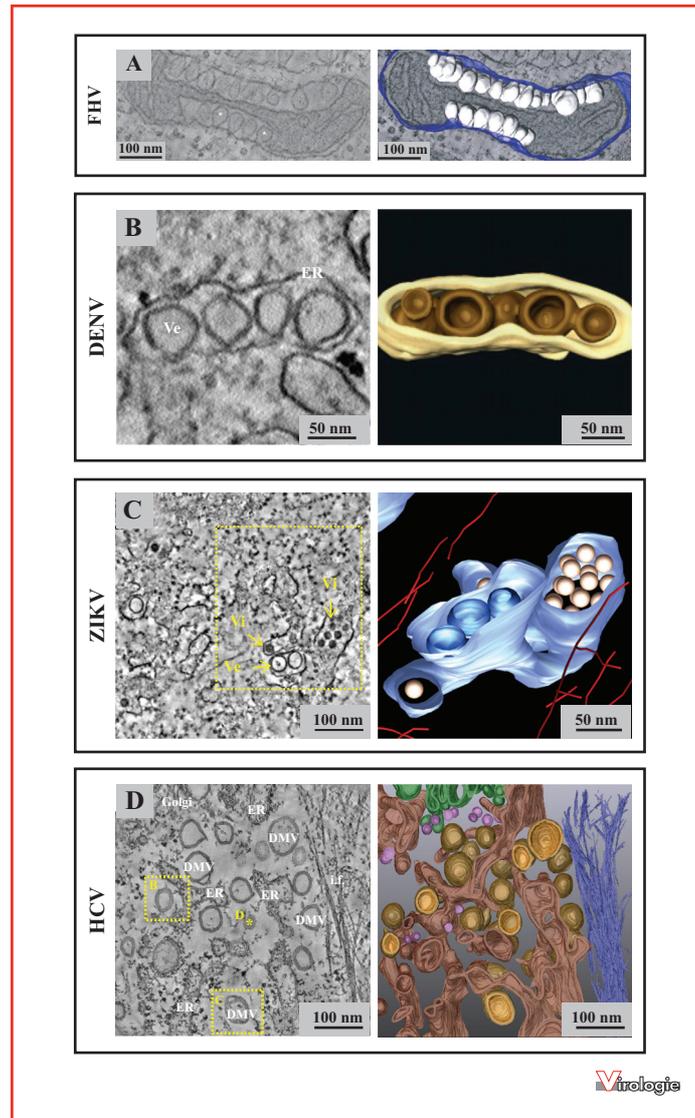


Figure 2. Observation microscopique et reconstruction tridimensionnelle des organelles de réplication de différents virus à ARN de polarité positive. A) Image de tomographie électronique d'une mitochondrie de cellule de drosophile infectée par le virus Flock House (FHV). Gauche : acquisition tomographique des sphérules induites par le FHV à la membrane mitochondriale. Les astérisques indiquent deux sphérules connectées à la membrane externe de la mitochondrie par un pore. Droite : reconstruction 3D de la même mitochondrie modifiée par le FHV superposée à l'image de microscopie électronique présentée à gauche. La membrane mitochondriale externe est colorisée en bleu, les sphérules induites par le FHV sont figurées en blanc [26]. **B) Image de tomographie électronique du réticulum endoplasmique d'une cellule infectée par le virus de la dengue (DENV).** Gauche : tomogramme montrant les vésicules de réplication (Ve) correspondant à des invaginations de la membrane du réticulum endoplasmique (ER) connectées au cytoplasme par un pore de 10 nm de diamètre. Droite : reconstruction 3D correspondante. Le réticulum endoplasmique est représenté en jaune, les organelles de réplication sont colorisées en marron [112]. **C) Image de tomographie électronique d'organelles de réplication induites par le virus Zika (ZIKV) dans des progéniteurs neuraux humains.** Gauche : tomogramme montrant des vésicules de réplication (Ve) induites par ZIKV dans le réticulum endoplasmique ainsi que des virions (Vi). Droite : reconstruction 3D d'une partie de la région encadrée en pointillés jaunes. La membrane du réticulum endoplasmique est indiquée en bleu clair, les vésicules de réplication sont représentées en bleu foncé, les virions en blanc et les filaments intermédiaires en rouge [14]. **D) Image de tomographie électronique d'organelles de réplication induites par le virus de l'hépatite C (HCV) dans des cellules Huh7.5.** Gauche : tomogramme montrant diverses altérations membranaires induites par HCV (ER : réticulum endoplasmique ; DMV : vésicules à double membrane ; i.f. : filaments intermédiaires). L'astérisque et les encadrés en pointillés jaunes indiquent des vésicules à double membrane. Droite : reconstruction 3D du tomogramme complet. Le réticulum endoplasmique est représenté en marron foncé, la membrane interne des vésicules à double membrane est indiquée en jaune ocre, leur membrane externe en marron clair. Les vésicules à simple membrane sont colorisées en rose, les filaments intermédiaires en bleu foncé et l'appareil de Golgi en vert [9].

Les figures ont été reproduites et adaptées avec la permission des éditeurs correspondants.

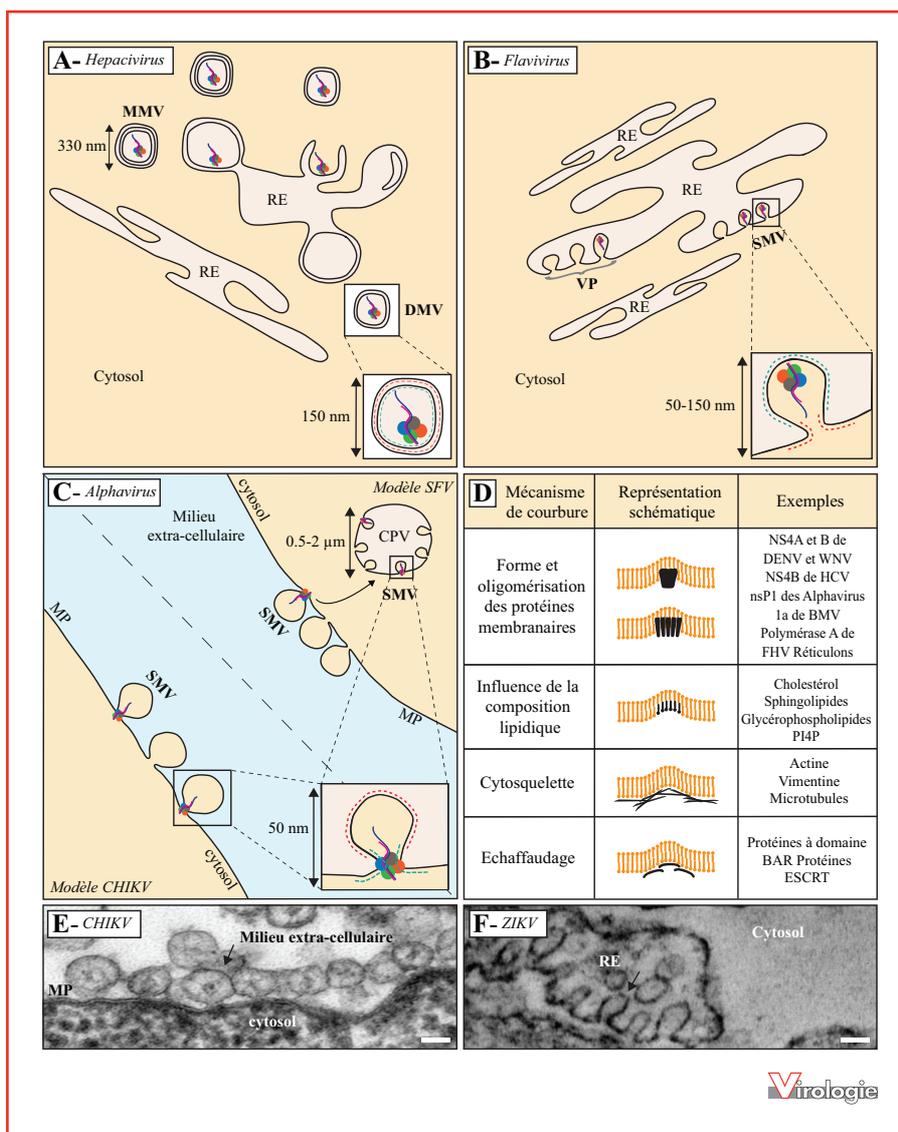


Figure 3. Compartiments cellulaires supportant la formation des organelles de réplication de différents virus à ARN de polarité positive. A-C) Représentation schématique des compartiments de réplication induits par différentes familles virales. A) Les *Hepacivirus* induisent des compartiments de réplication de type vésicules à double membrane (DMV) dont la membrane externe dérive du réticulum endoplasmique (RE). Ces structures sont associées à la présence de vésicules multi-membranaires (MMV). B) Les *Flavivirus* forment des sphérules à simple membrane (SMV) ainsi que des ensembles de sphérules appelées *vesicle packets* (VP) par invagination du réticulum endoplasmique (RE). C) Les *Alphavirus* génèrent des sphérules à simple membrane (SMV) par évagination de la membrane plasmique (MP) pouvant être endocytés dans des vacuoles cytopathiques (CPV) dans le cas d'une infection par le virus de la forêt de Semliki (SFV) par exemple, ou persister à la membrane plasmique lors de l'infection par le virus chikungunya (CHIKV). Les zones de courbure négative (pointillé vert) et positive (pointillé rouge) de la membrane sont indiquées pour chaque type de compartiment. D) Mécanismes de courbure membranaire impliqués dans la formation des compartiments de réplication viraux. E, F) Observations en microscopie électronique des sphérules induites lors d'une infection de cellules HEK293T (E) et Vero (F) par le virus chikungunya (E) et le virus Zika (F). Flèche noire : sphérule ; barre d'échelle : 50 nm.

réplication sur la face externe de ces structures [9]. En l'absence de technique permettant la détection des ARN viraux dans les préparations observées en microscopie électronique, la localisation exacte du complexe de réplication associé aux DMV reste donc débattue. L'observation

des régions avoisinant les DMV produites par différents virus permet généralement de retrouver, à proximité de ces compartiments, une variété de structures membranaires plus ou moins complexes (vésicules à simple membrane, vésicules multi-membranaires, tubules, membranes

zippées) susceptibles de représenter des états intermédiaires de la biogenèse de ces organelles [11, 12]. Les étapes exactes qui conduisent à la production finale des DMV sont encore sujettes à spéculations. Enfin, dans ce modèle, les organelles de réplication jouxtent les événements de bourgeonnement supportés par les membranes en continuité avec les vésicules de réplication. Cela implique l'existence d'un continuum entre les différents événements du cycle infectieux [7] ;

– les compartiments résultant d'une courbure négative des membranes correspondent à des projections de membranes préexistantes vers la lumière d'une organelle ou vers le milieu extracellulaire. Ces compartiments de réplication sont délimités par la continuité des membranes cellulaires et reliés au cytoplasme par un pore de 8 à 11 nm supposé permettre l'accès aux métabolites et aux cofacteurs cellulaires nécessaires à la réplication et l'export des ARN néosynthétisés. Ces structures, appelées sphérules et décrites pour la première fois dans les années 1960 à partir de cellules infectées par l'*Alphavirus* SFV [13], sont également observées dans un contexte d'infection par les *Tombusviridae*, les *Bromoviridae*, les *Nodaviridae* et les *Flaviviridae*. Pour cette dernière famille qui inclut notamment le DENV et le ZIKV, la reconstruction 3D de ces organelles étudiées par tomographie électronique a établi que ces compartiments à simple membrane, produits par déformation de la membrane du RE, s'organisent en un réseau complexe de vésicules interconnectées dont la taille peut atteindre 80 à 150 nm de diamètre (*figure 2B-C*) [12, 14]. Dans le cas des *Alphavirus* (SFV et SINV), ces compartiments, formés initialement à la membrane plasmique de la cellule infectée, sont rapidement internalisés suite à l'activation de la voie phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-Akt-mTOR (*mammalian target of rapamycin*)-dépendante [15], donnant naissance aux vacuoles cytopathiques (CPV), visualisées sous la forme de larges compartiments cytoplasmiques (de diamètre de 600 à 2000 nm) portant des sphérules sur leurs membranes limitantes et dont la nature correspond à des endosomes/lysosomes modifiés [16]. L'importance fonctionnelle de cette internalisation reste mal comprise, dans la mesure où son inhibition n'a que peu d'impact sur la réplication virale et où ce processus d'internalisation n'est que très marginal pour certains *Alphavirus* comme CHIKV [17, 18]. Dans ce modèle de vésicules, une attention particulière a été portée à l'organisation des pores qui connectent l'organelle de réplication avec le cytosol. De récents travaux réalisés sur le modèle du FHV ont démontré que cette zone est composée d'un assemblage en couronne formé par 12 copies de la réplicase virale A, une structure qui semble assurer le maintien du pore de connexion avec le cytoplasme [19]. Comme pour les DMV, ces vésicules avoisinent généralement les sites d'assemblage de particules virales néoformées [14]. Ces

réseaux membranaires sont donc susceptibles de constituer des plateformes assurant la coordination des étapes de réplication de l'ARN, de traduction et d'assemblage viral.

Protéines virales, déformations membranaires et compartiments de réplication viraux

La formation de ces compartiments repose en tout premier lieu sur l'interaction des protéines non structurales des virus à ARN(+) avec les feuillettes lipidiques des membranes cellulaires. Un grand nombre de ces protéines, dotées de domaines transmembranaires ou d'hélices amphipathiques capables de s'insérer dans les feuillettes lipidiques, remodelent les membranes de la cellule hôte, y compris lorsqu'elles sont exprimées hors contexte d'infection. Cette situation est tout particulièrement illustrée par la protéine 1a du virus de la mosaïque du brome (BMV, appartenant à la famille des *Bromoviridae*), dont la surexpression dans la levure ou la cellule végétale génère des invaginations vers la lumière du RE très similaires aux sphérules observées dans un contexte d'infection [20]. Cette protéine, responsable du transfert de la coiffe des ARN viraux et assurant également les fonctions NTPase et hélicase essentielles à la réplication virale, se structure en hélice amphipathique dans sa partie centrale (a.a. 392-405) [21]. Son affinité membranaire permet l'adressage et l'ancrage du complexe de réplication aux membranes du RE grâce aux interactions qu'elle engage directement avec les ARN viraux et avec les autres protéines du complexe de réplication. Dans la cellule infectée, la protéine 1a se localise à la face interne des sphérules formées pour la réplication de ce virus. Les déformations cellulaires générées sont associées à la capacité de cette protéine à s'oligomériser. L'analyse par microscopie électronique combinée à l'immunomarquage a défini que chacun des compartiments membranaires formés par le BMV contient 200 à 400 protéines 1a pour seulement une ou deux copies d'ARN et dix à 20 copies de polymérase [22]. Ces caractéristiques signent la capacité de la protéine 1a à former un manteau rigide tapissant la membrane du RE et essentiel à la déformation membranaire et au maintien de la morphologie des compartiments de réplication viraux. Un scénario identique a été établi pour la polymérase A des *Nodavirus*, dont plus de 100 copies sont retrouvées dans les sphérules produites par déformation des membranes mitochondriales [23]. La fonction de ces protéines virales serait ainsi à rapprocher de celle des capsides virales au cours du bourgeonnement.

Cette situation n'est cependant pas systématiquement retrouvée pour les virus produisant des compartiments à simple membrane. En effet, dans le cas des *Alphavirus*, l'ancrage membranaire du complexe de réplication

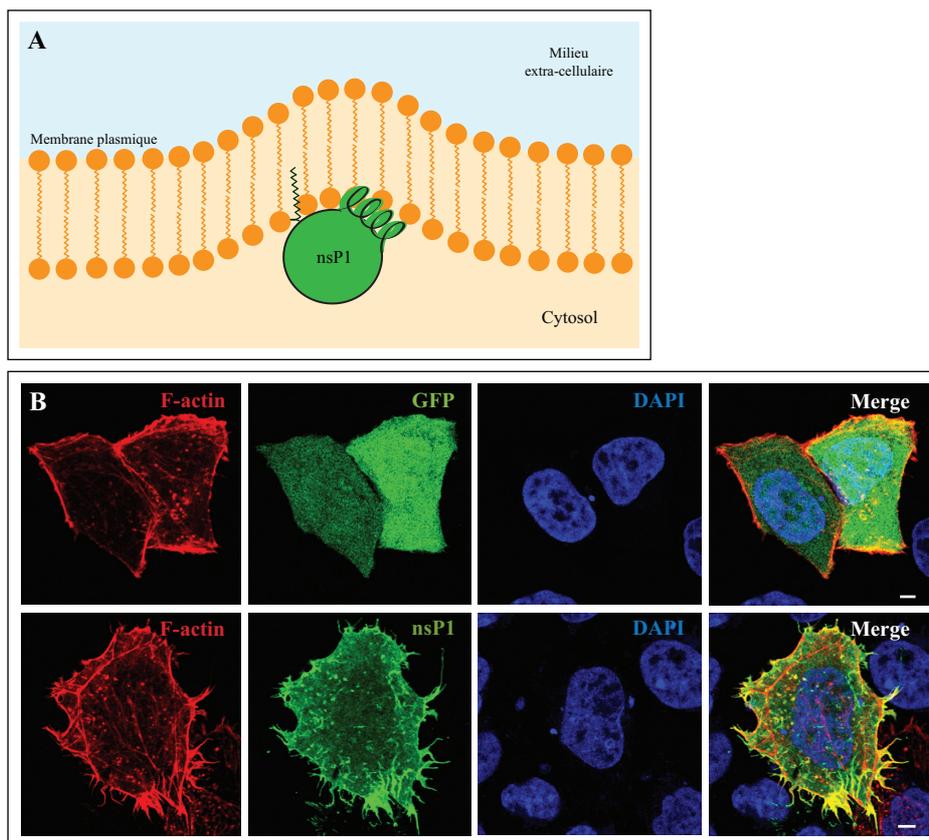


Figure 4. Protéines non structurales et déformations membranaires : exemple de la protéine nsP1 des *Alphavirus*. A) Représentation schématique de l'interaction de nsP1 avec la membrane plasmique. Cette association est conditionnée notamment par l'interaction d'une hélice alpha amphipathique avec la bicouche lipidique et par la présence d'une ou de plusieurs cystéines palmitoylées [27, 29]. B) Observations en immunofluorescence de cellules HeLa transfectées avec la protéine virale nsP1 du virus chikungunya fusionnée à la GFP. L'expression isolée de la protéine de fusion GFP-nsP1 induit la formation de filopodes riches en filaments d'actine. Les filaments d'actine (F-actin) sont marqués par coexpression du plasmide LifeAct. Barre d'échelle : 5 μ m.

est assuré par la protéine méthyl/guanylyltransférase nsP1 [24]. Comme les protéines 1a du BMV [21] et polA de FHV [25, 26], nsP1 contient une séquence centrale enrichie en acides aminés chargés positivement et hydrophobes qui se structure en hélice amphipathique au contact de membranes artificielles [27] (figure 4A). Les interactions polaires engagées avec les phospholipides membranaires gouvernent l'interaction de nsP1 avec les membranes cellulaires [28]. Celle-ci est renforcée par un motif de N-acétylation, également situé dans la partie centrale de la protéine [29]. Hors contexte d'infection, l'expression isolée de nsP1 induit des déformations significatives de la membrane plasmique et génère des structures de types filopodes et lamellipodes dynamiques au niveau desquelles la protéine nsP1 est détectée [30] (figure 4B). La morphologie de ces structures diffère cependant significativement de celle des sphérules qui hébergent la réplication des alphavirus [13], suggérant l'action coordonnée de nsP1 avec d'autres protéines non structurales et des cofacteurs cellulaires dans la production

des sphérules nécessaires à la réplication virale. Ce type de mécanisme complexe impliquant l'action synchronisée de plusieurs protéines non structurales semble également contribuer à la formation des vésicules à double membrane. Ainsi, dans le cas du HCV, chacune des protéines non structurales remanie les membranes auxquelles elles s'associent. Parmi celles-ci, NS4B, dotée de quatre domaines transmembranaires et d'hélices amphipathiques, génère une courbure positive des membranes dans lesquelles elle s'insère, aboutissant à la production de vésicules à simple membrane [31]. NS5A, quant à elle, suffit à produire des déformations à double membrane semblables à celles observées au cours d'une infection lorsqu'elle est exprimée isolément [9, 32]. Bien que cette dernière semble jouer un rôle prépondérant dans la formation des réseaux complexes qui hébergent la réplication de HCV, aucune de ces protéines ne suffit à elle seule à créer des compartiments membranaires identiques en taille ou en morphologie à ceux observés au cours d'une infection. Ceux-ci nécessitent, en revanche,

la coopération des protéines NS3, NS3-4A et NS4B-5B [8, 9, 31, 33]. Dans ce contexte, l'association de NS4B et de NS5A sous forme d'homodimères ou d'oligomères, notamment grâce à la présence de motifs de type « glycine zipper » dans les hélices transmembranaires de NS4B, serait requise pour induire des déformations membranaires similaires à celles observées dans les cellules infectées [34, 35].

Interactions hôte-pathogène impliquées dans la formation des organelles de réplication des virus à ARN(+)

Si la contribution des protéines virales est essentielle à la formation des compartiments de réplication des virus à ARN(+) à l'interface avec les membranes cellulaires, de nombreuses observations indiquent clairement la contribution de machineries cellulaires. La connaissance des cofacteurs nécessaires à la réplication des virus à ARN(+) a bénéficié de l'avènement des stratégies de criblage à l'échelle génomique (interférence ARN [RNAi], CRISPR/Cas9, mutagenèse insertionnelle) [36-39]. En combinaison avec les études biochimiques et fonctionnelles, le développement des techniques de génétique inverse et d'imagerie cellulaire, ces approches ont été appliquées avec succès à l'étude des *Flaviviridae* HCV, WNV (virus du Nil occidental), DENV et aux virus de plantes TBSV, BMV, permettant d'identifier les premiers facteurs cellulaires nécessaires à la biogenèse des compartiments de réplication de ces pathogènes. Ces résultats ont ainsi mis en évidence la nécessité, pour les virus à ARN(+), qu'ils se répliquent dans les cellules de vertébrés, chez l'insecte ou chez la plante, d'usurper des fonctions communes de leur hôte, ayant le plus souvent une fonction physiologique dans l'extension, le remaniement des membranes ou le transport vésiculaire. Ce paragraphe résume les connaissances relatives aux principaux acteurs cellulaires qui participent à la création des organelles de réplication chez différentes familles virales.

Lipides membranaires et organelles de réplication

La recherche des facteurs de l'hôte participant à la biogenèse des compartiments de réplication viraux a conduit à s'intéresser en tout premier lieu au métabolisme lipidique de l'hôte. La création de ces organelles repose en effet souvent sur l'expansion très significative des membranes cellulaires, suggérant une activation des voies qui contrôlent la lipogenèse. La caractérisation des profils lipidiques des cellules infectées a confirmé l'impact des virus à ARN(+) sur l'homéostasie lipidique de leur hôte. Celle-ci est le plus souvent signée par une augmentation de la synthèse de phospholipides, de sphingolipides et de stérols

[40, 41]. La ségrégation des ARNdb et des protéines non structurales avec des microdomaines membranaires enrichis en ces mêmes espèces lipidiques renforce l'hypothèse d'une accumulation spécifique de lipides sur les sites de réplication de nombreux virus [42]. Il apparaît désormais que les virus à ARN(+) modifient au moins localement la composition des membranes afin de créer un environnement favorable à l'assemblage et à l'activité de leur complexe de réplication [37, 43-45]. Ces modifications peuvent tout d'abord résulter d'une captation accrue de lipides extracellulaires [46] et de leur acheminement vers le site de réplication par des transporteurs spécifiques tels que l'*oxysterol-binding protein* (OSBP), responsable de l'enrichissement en cholestérol des organelles de réplication des *Enterovirus* et des *Hepacivirus* [47, 48]. Les modifications membranaires observées reposent également sur la stimulation et le détournement des enzymes du métabolisme lipidique. Ainsi, dans les cellules infectées par le *Flavivirus* WNV, la 3-hydroxy-méthylglutaryl-CoA réductase (HMGR), enzyme clé de la synthèse du cholestérol, est surexprimée [49]. Sa relocalisation vers les réseaux membranaires dérivés du RE, où elle s'associe à la machinerie de réplication virale, permettrait l'enrichissement en cholestérol des membranes servant de plateforme à la réplication virale. Un scénario analogue a été décrit pour l'acide gras synthase (*fatty acid synthase* [FASN]) qui assure la synthèse du palmitate, précurseur des phospholipides membranaires, dont l'activité est indispensable à la réplication des *Flavivirus* [50, 51]. Dans le cas de HCV, l'expression de FASN est fortement stimulée par l'action de la protéine virale NS4B sur le facteur de transcription SREBP (*sterol-regulatory element-binding protein*) qui régule l'expression des enzymes de la lipogenèse [52]. Le recrutement de FASN vers les organelles de réplication des *Flaviviridae* par les protéines non structurales (NS5B [53] pour HCV, NS3 pour DENV [51, 54]) est supposé assurer l'accumulation locale d'acides gras nécessaire à l'expansion des membranes du RE.

Récemment, cette enzyme a également été détectée sur le site de réplication de l'*Alphavirus* CHIKV [55]. Bien que son activité soit essentielle à la réplication virale, son éventuelle implication dans la création des sphérules membranaires formées par ce pathogène reste inconnue à cette heure. Les phosphatidylinositol-4-kinases de type III (PI4KIII) constituent un autre exemple d'enzyme lipogénique contribuant à la réplication de nombreux virus à ARN(+). Les PI4KIII existent sous la forme de deux isoformes (α et β) situées dans des organites distincts. Le produit de ces enzymes, le PI4P, joue un rôle de précurseur dans la synthèse d'autres espèces de phosphoinositides. L'isoforme PI4KIII α , présente dans le RE, constitue un facteur essentiel à la réplication de HCV recruté vers les sites de réplication et activé par la protéine virale NS5A [43].

L'inactivation de cette enzyme modifie significativement la morphologie des réseaux membranaires qui abritent les organelles de réplication de HCV, reliant ainsi directement la PI4KIII et la formation des compartiments de réplication de ce virus. De façon similaire, le recrutement de la CTP-phosphocholine cytidyl transférase α (CCT α) sur les sites de réplication des *Picornavirus* pourrait favoriser la production locale de phosphatidylcholine nécessaire à la production d'organelles de réplication fonctionnelles [56]. Outre leur rôle fondamental dans la production de nouvelles membranes intracellulaires, ces enzymes, en favorisant la concentration d'espèces lipidiques dont les caractéristiques biochimiques (composition de leur tête polaire, longueur ou saturation de la chaîne acyle) influent sur la plasticité membranaire, sont susceptibles de participer à la courbure des membranes nécessaire à la formation des compartiments de réplication des virus à ARN(+). Les conséquences des modifications lipidiques rencontrées au cours de ces infections dépassent cependant largement le simple remodelage membranaire. L'accumulation locale de lipides spécifiques est, en effet, indispensable à la localisation et à l'activité optimale des enzymes virales participant au complexe de réplication. À titre d'exemple, l'activité de la méthyl/guanylyltransférase nsP1 des *Alphavirus* est fortement dépendante de la présence de phospholipides anioniques, en particulier la phosphatidylsérine, dans les membranes cellulaires [28]. De façon similaire, l'accumulation membranaire de PI4P joue un rôle essentiel dans l'ancrage et l'activité de la polymérase 3D du PV au sein du complexe de réplication [44]. Enfin, la concentration locale de sphingolipides stimule également l'activité de la polymérase de HCV de manière spécifique au génotype [57]. Pour finir, ces variations lipidiques, comme la création de microdomaines membranaires riches en cholestérol, sont susceptibles de favoriser le recrutement local des cofacteurs cellulaires nécessaires à la réplication virale. L'accumulation locale de PI4P est en effet responsable de la relocalisation vers les sites de réplication des transporteurs de lipides FAPP2 (*four-phosphate adaptor protein 2*) et OSBP (*Oxysterol-binding protein 1*) permettant respectivement l'enrichissement local en glycosphingolipides et en cholestérol [48, 58]. Ainsi, le détournement du métabolisme lipidique constitue non seulement une stratégie visant à augmenter la surface des membranes disponibles pour la création d'organelles de réplication, mais permettrait aussi de créer un environnement favorable au fonctionnement optimal de la machinerie de réplication virale.

Le cytosquelette

La fonction physiologique du cytosquelette dans le transport intracellulaire et dans la dynamique des membranes

cellulaires laisse entrevoir son importance dans la formation des organelles membranaires de réplication virale. De nombreuses études ont permis de localiser les complexes de réplication des virus à ARN(+) à proximité immédiate des réseaux de microfilaments formés par l'actine, des microtubules ou des filaments intermédiaires riches en vimentine [17, 59]. Les structures caractéristiques composées de filaments intermédiaires et de microtubules, formant de véritables cages englobant les organelles de réplication du ZIKV, représentent l'exemple le plus caractéristique de cette association [14]. De façon générale, les virus à ARN(+) remanient le cytosquelette d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires de leur hôte à des fins de réplication [60-62]. Dans le cas du DENV, ce remaniement met en jeu l'interaction directe des protéines NS5A [63] et NS4A [60] avec la vimentine, conduisant à la concentration de cette dernière vers les sites de réplication virale où elle s'associe à la protéine NS1 [64]. Bien que la vimentine se soit révélée essentielle pour la localisation des complexes de réplication dans la cellule infectée [60], son rôle et celui des filaments intermédiaires dans la formation et/ou le maintien de l'organisation des complexes de réplication des *Flavivirus* reste encore mal compris. Dans le cas des *Alphavirus*, il est également clairement établi que la réplication virale nécessite l'intégrité du cytosquelette cellulaire [17]. Dans ce modèle, la capacité de la méthyl/guanylyltransférase nsP1 à stimuler la formation de filopodes et de lamellipodes suggère son action sur le cytosquelette. Ainsi l'expression de nsP1 génère le remaniement des fibres de stress sans qu'un effet de cette protéine sur les réseaux d'actine et les microtubules ait pu être observé [30]. Des interactions directes ont été décrites entre la protéine nsP3 de cette famille de virus et les protéines du cytosquelette (actine, tubuline, myosine) et des filaments intermédiaires (vimentine) [59, 65]. Les données les plus récentes acquises sur cette famille virale décrivent les interactions du domaine C-terminal de la protéine nsP3 des *Alphavirus* CHIKV et SFV avec plusieurs protéines du cytosquelette dont CD2AP (*CD2-associated protein*) et SH3KBP1, impliquées dans l'organisation des fibres d'actine lors de l'endocytose et qui colocalisent avec les compartiments de réplication viraux [66]. La contribution précise de chacun de ces phénomènes dans la formation des organelles de réplication reste donc à déterminer.

Les régulateurs du trafic vésiculaire

Les facteurs cellulaires naturellement impliqués dans les remaniements membranaires et jouant un rôle essentiel dans le transport vésiculaire apparaissent comme des partenaires privilégiés de la formation des organelles de réplication. En tout premier lieu, ce sont les composants de la voie de sécrétion COPI qui ont été décrits comme acteurs essen-

tiels de la formation des organelles de réplication des virus à ARN(+). Parmi ceux-ci, la GTPase Arf1 (*ADP Ribosylation Factor 1*) et son facteur d'échange nucléotidique GBF1 (*Golgi Brefeldin A Resistant Guanine Nucleotide Exchange Factor 1*), impliqués dans le bourgeonnement des vésicules de sécrétion précoce Golgi/ER, sont recrutés par les protéines non structurales 3A et 3CD du poliovirus et relocalisés à proximité des complexes de réplication de ce virus [67]. La sensibilité de la réplication virale à la bréfeldine A, un inhibiteur de GBF1, suggère l'importance fonctionnelle de ce recrutement. Il existe désormais de nombreuses preuves du rôle de cette voie dans la réplication des virus à ARN(+) (*Coronavirus/MHV*, *Enterovirus/CBV3*, *Hepacivirus/HCV*, *Flavivirus/DENV*, *YFV* [virus de la fièvre jaune]) [68-72]. Toutefois, bien que la structuration du domaine N-terminal de Arf1 en hélice amphipathique, capable de courber les membranes, soit compatible avec un rôle dans la formation des organelles membranaires de réplication, sa fonction directe dans la biogenèse des compartiments de réplication de ces virus reste très débattue. L'absence de modification morphologique des organelles de réplication en présence de Bréfeldine A ou lors d'une inactivation de GBF1 ou Arf1 [73] et l'incapacité du PV à stimuler Arf1 orientent désormais vers un rôle de ces protéines dans la maturation ou le fonctionnement des organelles de réplication virales plutôt que dans leur biogenèse précoce. Un rôle indirect de Arf1 et GBF1 basé sur le recrutement de la PI4KIII β et la régulation du contenu membranaire en PI4P a également été proposé [74, 75]. Les protéines du complexe ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*) sont d'autres exemples de régulateurs du trafic vésiculaires participant à la biogenèse des compartiments de réplication des virus à ARN(+). Ces protéines capables d'induire des courbures négatives des membranes endosomales nécessaires au bourgeonnement des corps multivésiculaires dans la lumière des endosomes tardifs participent à la biogenèse des organelles de réplication générées par les virus de plante BMV [76] et TBSV [77, 78]. Dans le cas du TBSV, la protéine Vps23p (homologue de Tsg101 des mammifères) participant au complexe ESCRT-I, est recrutée par la protéine virale p33 ubiquitinylée vers les membranes péroxysomales où elle initie les déformations nécessaires à la création des organelles de réplication [78]. Le recrutement successif des facteurs Snf7, Vps20p, Vps24p et de l'ATPase Vps4p composant le complexe ESCRT-III permet les déformations membranaires nécessaires à la biogenèse des sphérules de réplication. Ce complexe participe aussi possiblement au maintien de ces structures par la stabilisation des pores de connexion de ces organelles. L'inactivation des protéines ESCRT a, en effet, comme conséquence d'inhiber la réplication de l'ARN viral en favorisant son accessibilité par les ribonucléases [77]. Ce partenariat lors de la biogenèse

des compartiments de réplication fait écho aux événements de bourgeonnement de certains virus dans lesquels les protéines ESCRT jouent un rôle prépondérant.

Les facteurs de remodelage membranaire

Les protéines de la famille réticulon ont également été identifiées comme partenaires privilégiés de la formation des compartiments de réplication des virus à ARN(+). Ces protéines naturellement impliquées dans la morphogénèse membranaire sont présentes dans les zones du RE de forte courbure et permettent la transition de la structure en feuillet vers les structures tubulaires de cet organelle [79]. Elles possèdent deux domaines hydrophobes qui s'organisent en épingle à cheveux. Leur insertion dans la membrane induit une asymétrie entre les deux feuillets de la bicouche lipidique, aboutissant à une courbure positive des membranes. Les réticulons ont initialement été identifiés comme cofacteurs de la réplication des *Enterovirus* et partenaires de la protéine virale 2C [80]. Ils interagissent également avec la protéine 1a du BMV [81] et sont recrutés vers les compartiments viraux [82]. Étant donné leur capacité à générer des courbures membranaires positives incompatibles avec la morphologie des organelles de réplication de ces virus, leur contribution a été essentiellement proposée dans la formation et le maintien des zones de connexion des compartiments de réplication au cytoplasme. L'incorporation de ces protéines dans les sphérules produites par le BMV pourrait par ailleurs contrebalancer les courbures négatives générées par la protéine 1a et ainsi permettre l'expansion de ces compartiments. Dans tous les cas, la déplétion de ces protéines altère la morphologie des compartiments de réplication dont la taille est significativement réduite [81]. La contribution des réticulons à la réplication virale a ensuite été étendue aux *Flaviviridae*. Ils ont été identifiés comme des partenaires de la protéine NS4B du HCV [83, 84]. Leur inactivation réduit significativement les remodelages membranaires observés au cours de l'infection et rend la machinerie de réplication sensible à l'action des protéases cellulaires, avec pour effet de diminuer drastiquement la réplication de ces virus [85]. Ces interactions ont été récemment confirmées pour les *Flavivirus* WNV, DENV et ZIKV [85], soulignant la conservation des interactions virus-hôte requises pour la formation des compartiments de réplication au sein de cette famille virale. Chez les *Alphavirus*, la protéine BIN1/amphiphysine-2 est proposée comme partenaire lors de la formation des organelles de réplication [86]. Cette protéine, caractérisée par la présence d'un domaine N-BAR (BIN/amphiphysin/Rvs) structurellement courbé, s'associe par liaison électrostatique aux phospholipides chargés négativement. Elle s'insère dans les membranes grâce à sa structure en hélice amphipathique afin de favoriser et stabiliser les courbures

positives de la bicouche lipidique, notamment au cours du processus d'endocytose [87]. BIN1/amphiphysine-2 ainsi que son homologue BIN2/amphiphysine-1 sont recrutées vers les sites de réplication des *Alphavirus* SFV, CHIKV, SINV par une interaction avec le domaine C-terminal hypervariable de la protéine nsP3 [86, 88]. Cette interaction est essentielle à la synthèse de l'ARN(-) et de l'ARN(+) subgénomique, sans que la démonstration directe de son rôle dans la formation des sphérules des *Alphavirus* ait pu être faite. BIN1/amphiphysine-2 a, par ailleurs, été identifiée comme un partenaire de la protéine NS5A du HCV [89]. Dans ce cas, cependant, l'amphiphysine ne participe pas directement au remodelage des membranes du RE, mais régule la phosphorylation de NS5A nécessaire au recrutement de son partenaire cellulaire hVAP-A (*vesicle-associated-membrane protein A*) [90], lui-même impliqué dans le trafic vésiculaire. Ce même virus, par ailleurs, détourne la proline sérine thréonine phosphatase PST-PIP2, également membre de la superfamille des protéines à domaine BAR, pour la formation des compartiments membranaires de réplication [91]. Recrutée par les protéines virales NS4B et NS5A, PSTPIP2, dont la surexpression induit des structures membranaires tubulaires, participerait à l'induction et/ou à la stabilisation des compartiments de réplication de HCV.

La machinerie autophagique

La morphologie des compartiments de réplication à double membrane et leur connexion étroite au RE ont rapidement suggéré l'implication de la voie autophagique dans la formation de ces organelles. Dans un contexte physiologique, les compartiments à double membrane sont des événements rares, associés à la séquestration de grosses portions cytoplasmiques en vue de leur dégradation après fusion avec le compartiment lysosomal. Ce processus catabolique, appelé autophagie et permettant, en général, l'élimination d'organelles endommagées ou d'agrégats protéiques, est déclenché par des stress environnementaux incluant les stress trophiques et l'hypoxie. Il implique plus de 35 protéines d'autophagie (Atg) et se caractérise par la lipidation de la protéine LC3, un événement clé dans l'induction du processus autophagique [90]. Ce marqueur, parfois associé à des protéines lysosomales, est détecté à la surface des compartiments de réplication à double membrane induits par le HCV [92], les *Enterovirus* [93] ou encore les *Coronavirus* (MHV) [93]. Cette caractéristique, comme la capacité de ces virus à stimuler les voies autophagiques dans les cellules qu'ils infectent, ont suggéré une contribution de la machinerie autophagique dans la formation des compartiments de réplication de ces pathogènes [93, 94]. La capacité des protéines non structurales nsP6 des *Coronavirus* MHV, IBV (virus de la bronchite infectieuse), SARS

et de nsP5-7 de l'artérovirus PRRSV (virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcin) à générer des structures vacuolaires Atg5⁺/LC3-II⁺ similaires aux autophagosomes précoces a renforcé l'hypothèse du rôle de la machinerie autophagique dans la formation des compartiments de réplication de ces virus [95]. Malgré ces observations et bien que l'autophagie puisse favoriser diverses étapes du cycle infectieux, l'inactivation du processus autophagique à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques ou *via* l'inactivation des gènes d'autophagie Atg5 et/ou Atg7 a produit des résultats contradictoires, voire négatifs, qui ne permettent pas de valider définitivement cette contribution [93, 96-98]. Les travaux récents d'Abernathy *et al.* démontrant la capacité de ces pathogènes à mobiliser des voies non canoniques de l'autophagie permettent d'expliquer certains résultats contradictoires obtenus jusqu'ici [99].

En résumé, le détournement de facteurs cellulaires naturellement impliqués dans le remodelage membranaire est un trait commun des virus à ARN(+), quelle que soit la morphologie des compartiments membranaires qu'ils produisent pour assurer la réplication de leur génome. La nature des facteurs recrutés diffère cependant. Ces différences pourraient être en relation avec la disponibilité de chacun de ces cofacteurs dans les différents compartiments membranaires usurpés lors de la réplication virale. L'usurpation des amphiphysines localisées à la membrane plasmique, des réticulons dans le réticulum endoplasmique, des protéines Arf/GBF1 dans le Golgi par les *Alphavirus*, *Enterovirus*, *Flaviviridae* est en effet en accord avec la localisation des compartiments de réplication créés par ces différentes familles virales.

Organelles de réplication et réponse immune

Si la fonction des réseaux et compartiments membranaires semble être de concentrer la machinerie de réplication, les cofacteurs et métabolites cellulaires nécessaires à son fonctionnement optimal, l'organisation de ces compartiments quasi clos permet aussi d'envisager un rôle de protection vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte. Le système immunitaire inné constitue la première ligne de défense contre les agents infectieux. Sa fonction initiale est de reconnaître les déterminants moléculaires associés aux pathogènes (*pathogen-associated molecular patterns* [PAMP]) afin de stimuler la production d'effecteurs capables d'interférer efficacement avec la propagation de l'infection. Les ARN viraux, en particulier les duplex d'ARN servant d'intermédiaires à la réplication virale, sont des inducteurs puissants de la signalisation antivirale innée qui conduisent à la production rapide et

massive d'interférons et de cytokines pro-inflammatoires. Leur reconnaissance met en jeu les récepteurs cytosoliques de la famille des RLR (*RIG-I-like receptors*) et les récepteurs membranaires de la famille Toll (*Toll-like receptors* [TLR]) [100]. On retrouve tout particulièrement ces récepteurs sur les membranes péroxysomales, mitochondriales et du RE également impliquées dans la formation des organelles de réplication des virus à ARN(+). Bien qu'il n'y ait pas de démonstration formelle, la fonction des organelles de réplication virale dans la protection vis-à-vis des acteurs de l'immunité innée est notamment étayée par les expériences de déstabilisation membranaire. Ainsi, la synthèse des ARN des *Coronavirus* [101] et des *Flavivirus* WNV, JEV (virus de l'encéphalite japonaise) et DENV [102, 103] est rendue sensible à l'action des protéases et des nucléases par les détergents non ioniques déstabilisant les membranes. Cette hypothèse est également renforcée par la comparaison des réponses immunes générées par les virus JEV et DENV, qui démontre une corrélation entre la capacité de ces virus à ségréguer plus ou moins efficacement leurs ARN dans des organelles de réplication et l'induction d'interférons [104]. Enfin, la détection des RLRs dans un contexte d'infection par les virus HCV et HAV a clairement démontré que les senseurs RIG-I et MDA5 sont exclus des compartiments de réplication de ces virus [103]. En revanche, les mécanismes permettant de limiter l'accès à ces compartiments restent inconnus. La présence de nucléoporines et de facteurs d'import nucléaire dans les organelles de réplication du HCV pourrait cependant permettre de contrôler les échanges entre ces compartiments et le cytosol [10]. Enfin, comme l'ensemble des étapes de la réplication virale, la formation des organelles membranaires de réplication des virus à ARN(+) est la cible des effecteurs de la réponse immune. La capacité des interférons à empêcher la formation des compartiments à double membrane dérivés du RE hébergeant la réplication des *Arterivirus* et à favoriser l'accumulation de structures membranaires aberrantes suggère fortement l'existence de mécanismes antiviraux ciblant spécifiquement la biogenèse de ces organelles [105]. Cette hypothèse est également étayée par les observations réalisées dans le contexte de l'infection par HCV qui démontrent que l'effet principal de la cholestérol 25-hydroxylase (CH25H), un facteur antiviral contrôlé par l'interféron, repose sur sa capacité à inhiber la formation du tissu vésiculaire contenant les organelles de réplication, indépendamment de tout effet sur la réplication de l'ARN [106]. Le constat additionnel que l'action antivirale de la vipérine, un autre facteur antiviral stimulé par l'interféron capable de limiter la réplication de HCV, repose sur son association avec les compartiments de réplication formés par ce virus sur la face cytosolique du RE est un argument supplémentaire en faveur de ce modèle [107].

Conclusions et perspectives

L'élucidation des mécanismes impliqués dans la biogenèse des compartiments membranaires de réplication est essentielle à la connaissance des virus à ARN(+). Au cours des dernières années, les avancées technologiques relevant du domaine de l'imagerie cellulaire et des cribles à l'échelle du génome entier ont permis non seulement d'accéder à l'architecture tridimensionnelle des compartiments de réplication de nombreux virus à ARN(+), mais également de définir les premières interactions virus-hôte nécessaires à leur biogenèse. De nombreuses questions demeurent cependant. La dynamique des interactions hôte-virus permettant la production de tels compartiments reste le plus souvent inconnue. Le rôle fonctionnel des différentes structures membranaires complexes (paquets vésiculaires, réseaux membranaires complexes...) observées en association avec les compartiments de réplication est incompris. De plus, les connexions spatiales et temporelles existant entre ces compartiments de réplication et les étapes ultérieures du cycle infectieux (assemblage et bourgeonnement viraux) restent encore à élucider. Ces questions pourraient bénéficier par exemple de l'application de techniques d'imagerie dynamique.

Les connaissances actuelles ont toutefois mis en lumière une communauté de mécanismes gouvernant la création des organelles de réplication de virus taxonomiquement éloignés. À titre d'exemple, les *Flaviviridae* comme le HCV, DENV, WNV et ZIKV sont sensibles aux inhibiteurs de la synthèse et du transport lipidiques tels que l'imipramine [37, 108], un antidépresseur tricyclique qui empêche la redistribution du cholestérol vers la membrane plasmique. Leur réplication est également sensible à la céruléine et l'orlistat [55, 109] qui inhibent l'activité de synthèse des acides gras de la FASN, ou encore à la tyrphostine AG1478, un anticancéreux bloquant l'activité de la PI4KIII [110]. Si ces molécules, interférant avec le métabolisme lipidique, ont fait la preuve de leur activité antivirale, leur capacité à inhiber la formation des organelles de réplication reste cependant à démontrer. La poursuite des efforts relatifs à l'étude de ces compartiments membranaires constitue donc une opportunité de définir des cibles thérapeutiques attractives et de développer des stratégies antivirales à large spectre d'efficacité.

Liens d'intérêt : les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec l'article.

Références

1. den Boon JA, Diaz A, Ahlquist P. Cytoplasmic viral replication complexes. *Cell Host Microbe* 2010; 8(1): 77-85.

2. Paul D, Bartenschlager R. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World J Virol* 2013 ; 2(2) : 32-48.
3. van der Hoeven B, Oudshoorn D, Koster AJ, Snijder EJ, Kikkert M, Bárcena M. Biogenesis and architecture of arterivirus replication organelles. *Virus Res* 2016 ; 220 : 70-90.
4. Lucic V, Rigort A, Baumeister W. Cryo-electron tomography: the challenge of doing structural biology *in situ*. *J Cell Biol* 2013 ; 202(3) : 407-19.
5. Sartori A, Gatz R, Beck F, Rigort A, Baumeister W, Plitzko JM. Correlative microscopy: bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography. *J Struct Biol* 2007 ; 160(2) : 135-45.
6. Knoops K, Kikkert M, Worm SH, *et al*. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol* 2008 ; 6(9) : pe226.
7. Ulasli M, Verheije MH, de Haan CA, Reggiori F. Qualitative and quantitative ultrastructural analysis of the membrane rearrangements induced by coronavirus. *Cell Microbiol* 2010 ; 12(6) : 844-61.
8. Ferraris P, Beaumont E, Uzbekov R, *et al*. Sequential biogenesis of host cell membrane rearrangements induced by hepatitis C virus infection. *Cell Mol Life Sci* 2013 ; 70(7) : 1297-306.
9. Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, *et al*. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog* 2012 ; 8(12) : e1003056.
10. Neufeldt CJ, Joyce MA, Levin D A. MA, *et al*. Hepatitis C virus-induced cytoplasmic organelles use the nuclear transport machinery to establish an environment conducive to virus replication. *PLoS Pathog* 2013 ; 9(10) : e1003744.
11. Belov GA, Nair V, Hansen BT, Hoyt FH, Fischer ER, Ehrenfeld E. Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes. *J Virol* 2012 ; 86(1) : 302-12.
12. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, *et al*. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* 2009 ; 5(4) : 365-75.
13. Grimley PM, Berezsky IK, Friedman RM. Cytoplasmic structures associated with an arbovirus infection: loci of viral ribonucleic acid synthesis. *J Virol* 1968 ; 2(11) : 1326-38.
14. Cortese M, Goellner S, Acosta EG, *et al*. Ultrastructural characterization of Zika virus replication factories. *Cell Rep* 2017 ; 18(9) : 2113-23.
15. Thaa B, Biasiotto R, Eng K, *et al*. Correction for Thaa *et al*. Differential phosphatidylinositol-3-kinase-Akt-mTOR activation by Semliki forest and chikungunya viruses is dependent on nsP3 and connected to replication complex internalization. *J Virol* 2016 ; 90(8) : 4256.
16. Froshauer S, Kartenbeck J, Helenius A. Alphavirus RNA replicase is located on the cytoplasmic surface of endosomes and lysosomes. *J Cell Biol* 1988 ; 107(6 Pt 1) : 2075-86.
17. Spuul P, Balistreri G, Kaariainen L, Ahola T. Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki forest virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. *J Virol* 2010 ; 84(15) : 7543-57.
18. Thaa B, Biasiotto R, Eng K, *et al*. Differential phosphatidylinositol-3-kinase-Akt-mTOR activation by Semliki forest and chikungunya viruses is dependent on nsP3 and connected to replication complex internalization. *J Virol* 2015 ; 89(22) : 11420-37.
19. Ertel KJ, Benefield D, Castaño-Diez D, *et al*. Cryo-electron tomography reveals novel features of a viral RNA replication compartment. *Elife* 2017 ; 6 : pii : e25940.
20. Schwartz M, Chen J, Janda M, Sullivan M, den Boon J, Ahlquist P. A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Mol Cell* 2002 ; 9(3) : 505-14.
21. Liu L, Westler WM, den Boon JA, *et al*. An amphipathic alpha-helix controls multiple roles of brome mosaic virus protein 1a in RNA replication complex assembly and function. *PLoS Pathog* 2009 ; 5(3) : e1000351.
22. O'Reilly EK, Tang N, Ahlquist P, Kao CC. Biochemical and genetic analyses of the interaction between the helicase-like and polymerase-like proteins of the brome mosaic virus. *Virology* 1995 ; 214(1) : 59-71.
23. Dye BT, Miller DJ, Ahlquist P. *In vivo* self-interaction of nodavirus RNA replicase protein revealed by fluorescence resonance energy transfer. *J Virol* 2005 ; 79(14) : 8909-19.
24. Peranen J, Laakkonen P, Hyvonen M, Kaariainen L. The alphavirus replicase protein nsP1 is membrane-associated and has affinity to endocytic organelles. *Virology* 1995 ; 208(2) : 610-20.
25. Miller DJ, Ahlquist P. Flock house virus RNA polymerase is a transmembrane protein with amino-terminal sequences sufficient for mitochondrial localization and membrane insertion. *J Virol* 2002 ; 76(19) : 9856-67.
26. Kopek BG, Perkins G, Miller DJ, Ellisman MH, Ahlquist P. Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. *PLoS Biol* 2007 ; 5(vv) : e220.
27. Lampio A, Kilpeläinen I, Pesonen S, *et al*. Membrane binding mechanism of an RNA virus-capping enzyme. *J Biol Chem* 2000 ; 275(48) : 37853-9.
28. Ahola T, Lampio A, Auvinen P, Kaariainen L. Semliki forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. *EMBO J* 1999 ; 18(11) : 3164-72.
29. Laakkonen P, Ahola T, Kaariainen L. The effects of palmitoylation on membrane association of Semliki forest virus RNA capping enzyme. *J Biol Chem* 1996 ; 271(45) : 28567-71.
30. Laakkonen P, Auvinen P, Kujala P, Kaariainen L. Alphavirus replicase protein NSP1 induces filopodia and rearrangement of actin filaments. *J Virol* 1998 ; 72(12) : 10265-9.
31. Egger D, Wölk B, Gosert R, *et al*. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002 ; 76(12) : 5974-84.
32. Romero-Brey I, Berger C, Kallis S, *et al*. NS5A domain 1 and polyprotein cleavage kinetics are critical for induction of double-membrane vesicles associated with hepatitis C virus replication. *MBio* 2015 ; 6(4) : e00759.
33. Gouttenoire J, Montserret R, Paul D, *et al*. Aminoterminal amphipathic alpha-helix AH1 of hepatitis C virus nonstructural protein 4B possesses a dual role in RNA replication and virus production. *PLoS Pathog* 2014 ; 10(10) : e1004501.
34. Paul D, Madan V, Ramirez O, *et al*. Glycine zipper motifs in hepatitis C virus nonstructural protein 4B are required for the establishment of viral replication organelles. *J Virol* 2018 ; 92(4) : 15.
35. Love RA, Brodsky O, Hickey MJ, Wells PA, Cronin CN. Crystal structure of a novel dimeric form of NS5A domain I protein from hepatitis C virus. *J Virol* 2009 ; 83(9) : 4395-403.
36. Tai AW, Benita Y, Peng LF, *et al*. A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host Microbe* 2009 ; 5(3) : 298-307.
37. Stoeck IK, Lee JY, Tabata K, *et al*. Hepatitis C Virus Replication Depends on Endosomal Cholesterol Homeostasis. *J Virol* 2017 ; 92(1) : pii : e01196-17.
38. Marceau CD, Puschnik AS, Majzoub K, *et al*. Genetic dissection of Flaviviridae host factors through genome-scale CRISPR screens. *Nature* 2016 ; 535(7610) : 159-63.
39. Savidis G, McDougall WM, Meraner P, *et al*. Identification of Zika virus and dengue virus dependency factors using functional genomics. *Cell Rep* 2016 ; 16(1) : 232-46.
40. Diamond DL, Syder AJ, Jacobs JM, *et al*. Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics. *PLoS Pathog* 2010 ; 6(1) : e1000719.
41. Perera R, Riley C, Isaac G, *et al*. Dengue virus infection perturbs lipid homeostasis in infected mosquito cells. *PLoS Pathog* 2012 ; 8(3) : e1002584.

42. Aizaki H, Lee K-J, Sung VM-H, Ishiko H, Lai MMC. Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts. *Virology* 2004; 324(2): 450-61.
43. Reiss S, Rebhan I, Backes P, *et al.* Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NSSA is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* 2011; 9(1): 32-45.
44. Hsu NY, Ilnytska O, Belov G, *et al.* Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* 2010; 141(5): 799-811.
45. Roulin PS, Lötzerich M, Torta F, *et al.* Rhinovirus uses a phosphatidylinositol 4-phosphate/cholesterol counter-current for the formation of replication compartments at the ER-Golgi interface. *Cell Host Microbe* 2014; 16(5): 677-90.
46. Nchoutmboube JA, Viktorova EG, Scott AJ, *et al.* Increased long chain acyl-Coa synthetase activity and fatty acid import is linked to membrane synthesis for development of picornavirus replication organelles. *PLoS Pathog* 2013; 9(6): e1003401.
47. Ilnytska O, Santiana M, Hsu NY, *et al.* Enteroviruses harness the cellular endocytic machinery to remodel the host cell cholesterol landscape for effective viral replication. *Cell Host Microbe* 2013; 14(3): 281-93.
48. Wang H, Perry JW, Lauring AS, Neddermann P, De Francesco R, Tai AW. Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking. *Gastroenterology* 2014; 146(5): 1373-85 e1-11.
49. Mackenzie JM, Khromykh AA, Parton RG. Cholesterol manipulation by West Nile virus perturbs the cellular immune response. *Cell Host Microbe* 2007; 2(4): 229-39.
50. Martin-Acebes MA, Blazquez AB, Jimenez de Oya N, Escribano-Romero E, Saiz JC. West Nile virus replication requires fatty acid synthesis but is independent on phosphatidylinositol-4-phosphate lipids. *PLoS One* 2011; 6(9): e24970.
51. Heaton NS, Perera R, Berger KL, *et al.* Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(40): 17345-50.
52. Park C-Y, Jun H-J, Wakita T, Cheong JH, Hwang SB. Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway. *J Biol Chem* 2009; 284(14): 9237-46.
53. Huang J-T, Tseng CP, Liao MH, *et al.* Hepatitis C virus replication is modulated by the interaction of nonstructural protein NSSB and fatty acid synthase. *J Virol* 2013; 87(9): 4994-5004.
54. Tang WC, Lin RJ, Liao CL, Lin YL. Rab18 facilitates dengue virus infection by targeting fatty acid synthase to sites of viral replication. *J Virol* 2014; 88(12): 6793-804.
55. Karlas A, Berre S, Couderc T, *et al.* A human genome-wide loss-of-function screen identifies effective chikungunya antiviral drugs. *Nat Commun* 2016; 7: 11320.
56. Viktorova EG, Nchoutmboube JA, Ford-Siltz LA, Iverson E, Belov GA. Phospholipid synthesis fueled by lipid droplets drives the structural development of poliovirus replication organelles. *PLoS Pathog* 2018; 14(8): e1007280.
57. Weng L, Hirata Y, Arai M, *et al.* Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype-specific manner. *J Virol* 2010; 84(22): 11761-70.
58. Khan I, Katikaneni DS, Han Q, *et al.* Modulation of hepatitis C virus genome replication by glycosphingolipids and four-phosphate adaptor protein 2. *J Virol* 2014; 88(21): 12276-95.
59. Frolova E, Gorchakov R, Garmashova N, Atasheva S, Vergara LA, Frolov I. Formation of nsP3-specific protein complexes during Sindbis virus replication. *J Virol* 2006; 80(8): 4122-34.
60. Teo CS, Chu JJ. Cellular vimentin regulates construction of dengue virus replication complexes through interaction with NS4A protein. *J Virol* 2014; 88(4): 1897-913.
61. Ruzek D, Vancova M, Tesarova M, Ahantari A, Kopecky J, Grubhoffer L. Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection. *J Gen Virol* 2009; 90(Pt 7): 1649-58.
62. Ng ML, Hong SS. Flavivirus infection: essential ultrastructural changes and association of Kunjin virus NS3 protein with microtubules. *Arch Virol* 1989; 106(1-2): 103-20.
63. Le Breton M, Meyniel-Schicklin L, Deloire A, *et al.* Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen. *BMC Microbiol* 2011; 11: 234.
64. Kanlaya R, Pattanakitsakul S, Sinchaikul S, Chen S-T, Thongboonkerd V. Vimentin interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and dengue nonstructural protein 1 and is important for viral replication and release. *Mol Biosyst* 2010; 6(5): 795-806.
65. Cristea IM, Carroll JW, Rout MP, Rice CM, Chait BT, MacDonald MR. Tracking and elucidating alphavirus-host protein interactions. *J Biol Chem* 2006; 281(40): 30269-78.
66. Mutso M, Morro AM, Smedberg C, *et al.* Mutation of CD2AP and SH3KBP1 binding motif in alphavirus nsP3 hypervariable domain results in attenuated virus. *Viruses* 2018; 10(5): 27.
67. Belov GA, Feng Q, Nikovics K, Jackson CL, Ehrenfeld E. A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication. *PLoS Pathog* 2008; 4(11): e1000216.
68. Ferlin J, Farhat R, Belouzard S, *et al.* Investigation of the role of GBF1 in the replication of positive-sense single-stranded RNA viruses. *J Gen Virol* 2018; 99(8): 1086-96.
69. Goueslain L, Alsaleh K, Horellou P, *et al.* Identification of GBF1 as a cellular factor required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2010; 84(2): 773-87.
70. Kudelko M, Braut JB, Kwok K, *et al.* Class II ADP-ribosylation factors are required for efficient secretion of dengue viruses. *J Biol Chem* 2012; 287(1): 767-77.
71. Lanke KHW, van der Schaar HM, Belov GA, *et al.* GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for Arf, is crucial for coxsackievirus B3 RNA replication. *J Virol* 2009; 83(22): 11940-9.
72. Verheije MH, Raaben M, Mari M, *et al.* Mouse hepatitis coronavirus RNA replication depends on GBF1-mediated ARF1 activation. *PLoS Pathog* 2008; 4(6): e1000088.
73. Belov GA, Kovtunovych G, Jackson CL, Ehrenfeld E. Poliovirus replication requires the N-terminus but not the catalytic Sec7 domain of ArfGEF GBF1. *Cell Microbiol* 2010; 12(10): 1463-79.
74. Altan-Bonnet N, Balla T. Phosphatidylinositol 4-kinases: hostages harnessed to build panviral replication platforms. *Trends Biochem Sci* 2012; 37(7): 293-302.
75. Zhang L, Hong Z, Lin W, *et al.* ARF1 and GBF1 generate a PI4P-enriched environment supportive of hepatitis C virus replication. *PLoS One* 2012; 7(2): e32135.
76. Diaz A, Zhang J, Ollwerther A, Wang X, Ahlquist P. Host ESCRT proteins are required for bromovirus RNA replication compartment assembly and function. *PLoS Pathog* 2015; 11(3): e1004742.
77. Barajas D, Jiang Y, Nagy PD. A unique role for the host ESCRT proteins in replication of Tomato bushy stunt virus. *PLoS Pathog* 2009; 5(12): e1000705.
78. Kovalev N, de Castro Martín IF, Pogany J, *et al.* Role of viral RNA and co-opted cellular ESCRT-I and ESCRT-III factors in formation of tombusvirus spherules harboring the tombusvirus replicase. *J Virol* 2016; 90(7): 3611-26.
79. Tolley N, Sparkes IA, Hunter PR, *et al.* Overexpression of a plant reticulum remodels the lumen of the cortical endoplasmic reticulum but does not perturb protein transport. *Traffic* 2008; 9(1): 94-102.
80. Tang WF, Yang SY, Wu BW, *et al.* Reticulon 3 binds the 2C protein of enterovirus 71 and is required for viral replication. *J Biol Chem* 2007; 282(8): 5888-98.

81. Diaz A, Ahlquist P. Role of host reticulon proteins in rearranging membranes for positive-strand RNA virus replication. *Curr Opin Microbiol* 2012; 15(4): 519-24.
82. Diaz A, Wang X, Ahlquist P. Membrane-shaping host reticulon proteins play crucial roles in viral RNA replication compartment formation and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(37): 16291-6.
83. Wu MJ, Ke PY, Hsu JT, Yeh CT, Horng JT. Reticulon 3 interacts with NS4B of the hepatitis C virus and negatively regulates viral replication by disrupting NS4B self-interaction. *Cell Microbiol* 2014; 16(11): 1603-18.
84. Liu Y, Cheng J, Bai GQ, *et al.* Screening and cloning of hepatitis C virus non-structural protein 4B interacting protein gene in hepatocytes. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2005; 19(3): 248-51.
85. Aktepe TE, Liebscher S, Prier JE, Simmons CP, Mackenzie JM. The host protein reticulon 3.1A is utilized by flaviviruses to facilitate membrane remodelling. *Cell Rep* 2017; 21(6): 1639-54.
86. Neuvonen M, Kazlauskas A, Martikainen M, Hinkkanen A, Ahola T, Saksela K. SH3 domain-mediated recruitment of host cell amphiphysins by alphavirus nsP3 promotes viral RNA replication. *PLoS Pathog* 2011; 7(11): e1002383.
87. Mim C, Unger VM. Membrane curvature and its generation by BAR proteins. *Trends Biochem Sci* 2012; 37(12): 526-33.
88. Tossavainen H, Aitio O, Hellman M, Saksela K, Permi P. Structural basis of the high affinity interaction between the alphavirus nonstructural protein-3 (nsP3) and the SH3 domain of amphiphysin-2. *J Biol Chem* 2016; 291(31): 16307-17.
89. Zech B, Kurtenbach A, Krieger N, *et al.* Identification and characterization of amphiphysin II as a novel cellular interaction partner of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Gen Virol* 2003; 84(Pt 3): 555-60.
90. Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol* 2012; 22(1): R29-34.
91. Chao T-C, *et al.* Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2 (PSTPIP2), a host membrane-deforming protein, is critical for membranous web formation in hepatitis C virus replication. *J Virol* 2012; 86(3): 1739-49.
92. Ferraris P, Blanchard E, Roingard P. Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes. *J Gen Virol* 2010; 91(Pt 9): 2230-7.
93. Suhy DA, Giddings TG, Kirkegaard. Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J Virol* 2000; 74(19): 8953-65.
94. Dreux M, Gastaminza P, Wieland SF, Chisari FV. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(33): 14046-51.
95. Cottam EM, Maier HJ, Manifava M, *et al.* Coronavirus nsp6 proteins generate autophagosomes from the endoplasmic reticulum via an omegasome intermediate. *Autophagy* 2011; 7(11): 1335-47.
96. Mohl B-P, Tedbury PR, Griffin S, Harris M. Hepatitis C virus-induced autophagy is independent of the unfolded protein response. *J Virol* 2012; 86(19): 10724-32.
97. Zhao Z, Thackray LB, Miller BC, *et al.* Coronavirus replication does not require the autophagy gene ATG5. *Autophagy* 2007; 3(6): 581-5.
98. Tanida I, Fukasawa M, Ueno T, Kominami E, Wakita T, Hanada K. Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles. *Autophagy* 2009; 5(7): 937-45.
99. Abernathy E, Mateo R, Majzoub K, *et al.* Differential and convergent utilization of autophagy components by positive-strand RNA viruses. *PLoS Biol* 2019; 17(1): e2006926.
100. Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 2006; 7(2): 131-7.
101. van Hemert MJ, van den Worm SH, Knoops K, Mommaas AM, Gorbalenya AE, Snijder EJ. SARS-coronavirus replication/transcription complexes are membrane-protected and need a host factor for activity *in vitro*. *PLoS Pathog* 2008; 4(5): e1000054.
102. Uchil PD, Satchidanandam V. Architecture of the flaviviral replication complex. Protease, nuclease, and detergents reveal encasement within double-layered membrane compartments. *J Biol Chem* 2003; 278(27): 24388-98.
103. Neufeldt CJ, Joyce MA, Van Buuren N, *et al.* The hepatitis C virus-induced membranous web and associated nuclear transport machinery limit access of pattern recognition receptors to viral replication sites. *PLoS Pathog* 2016; 12(2): e1005428.
104. Uchida L, Espada-Murao LA, Takamatsu Y, *et al.* The dengue virus conceals double-stranded RNA in the intracellular membrane to escape from an interferon response. *Sci Rep* 2014; 4: 7395.
105. Oudshoorn D, van der Hoeven B, Limpens RW, *et al.* Antiviral Innate Immune Response Interferes with the Formation of Replication-Associated Membrane Structures Induced by a Positive-Strand RNA Virus. *MBio* 2016; 7(6): pii : e01991-16.
106. Anggakusuma, Romero-Brey I, Berger C, *et al.* Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase restricts hepatitis C virus replication through blockage of membranous web formation. *Hepatology* 2015; 62(3): 702-14.
107. Helbig KJ, Eyre NS, Yip E, *et al.* The antiviral protein viperin inhibits hepatitis C virus replication via interaction with nonstructural protein 5A. *Hepatology* 2011; 54(5): 1506-17.
108. Wichit S, Hamel R, Bernard E, *et al.* Imipramine inhibits chikungunya virus replication in human skin fibroblasts through interference with intracellular cholesterol trafficking. *Sci Rep* 2017; 7(1): 3145.
109. Tongluan N, Ramphan S, Wintachai P, *et al.* Involvement of fatty acid synthase in dengue virus infection. *Virol J* 2017; 14(1): 28.
110. van der Schaar HM, Leyssen P, Thibaut HJ, *et al.* A novel, broad-spectrum inhibitor of enterovirus replication that targets host cell factor phosphatidylinositol 4-kinase IIIbeta. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(10): 4971-81.
111. Reggiori F, Monastyrska I, Verheije MH, *et al.* Coronaviruses hijack the LC3-I-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication. *Cell Host Microbe* 2010; 7(6): 500-8.
112. Romero-Brey I, Bartenschlager R. Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses. *Viruses* 2014; 6(7): 2826-57.
113. Lee WM, Ishikawa M, Ahlquist P. Mutation of host delta9 fatty acid desaturase inhibits brome mosaic virus RNA replication between template recognition and RNA synthesis. *J Virol* 2001; 75(5): 2097-106.
114. Taylor MP, Kirkegaard K. Modification of cellular autophagy protein LC3 by poliovirus. *J Virol* 2007; 81(22): 12543-53.
115. Evans MJ, Rice CM, Goff SP. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(35): 13038-43.