



HAL
open science

Implication de l'appareil de Golgi et de l'ubiquitination dans l'activation de TBK1 après détection des ARNs viraux

Marie Pourcelot

► **To cite this version:**

Marie Pourcelot. Implication de l'appareil de Golgi et de l'ubiquitination dans l'activation de TBK1 après détection des ARNs viraux. Immunologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS230 . tel-01444893

HAL Id: tel-01444893

<https://theses.hal.science/tel-01444893>

Submitted on 30 Jan 2017

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

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

NTT : 2016SACLS230

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'HOPITAL PAUL BROUSSE, VILLEJUIF

ECOLE DOCTORALE N° 582
Cancérologie : Biologie-Médecine-Santé

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

Mlle POURCELOT Marie

**Implication de l'ubiquitination et de l'appareil de Golgi dans
l'activation de TBK1 après détection des ARNs viraux**

Thèse présentée et soutenue à l'Hôpital Paul Brousse, le 21/09/16 :

Composition du Jury :

Mr BENIHOUD Karim	PR, Institut Gustave Roussy	Président
Mr LE GOFFIC Ronan	CR, INRA	Rapporteur
Mr VIDALAIN Pierre-Olivier	DR2, Université Paris-Descartes	Rapporteur
Mme JOUVENET Nolwenn	CR1, Institut Pasteur	Examinatrice
Mr BENIHOUD Karim	PR, Institut Gustave Roussy	Examineur
Mr ARNOULT Damien	DR2, Hôpital Paul Brousse	Directeur de thèse

A tout ceux qui comptent pour moi ...

Remerciements

Bien plus qu'un projet d'étude, cette thèse a été pour moi une belle expérience humaine et personnelle. Et comme un projet de thèse ne se construit pas seul, j'aimerai exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation et au bon déroulement de cette thèse.

Je souhaite tout d'abord remercier l'ensemble des membres du jury à commencer par Ronan LE GOFFIC et Pierre-Olivier VIDALAIN pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit et qui ont ainsi contribué à l'amélioration de celui-ci. Je remercie également Nolwenn JOUVENET et Karim BENIHOUD pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse en tant qu'examinateur.

L'ensemble de mes travaux de recherche ont été réalisés au sein de l'unité INSERM U1014, nouvellement INSERM U1197, à l'hôpital Paul Brousse à Villejuif. J'aimerai, tout naturellement remercier le Dr. Aimé VAZQUEZ pour m'avoir accueilli dans son unité, pour sa gentillesse et sa sympathie. Je souhaite ensuite remercier chaleureusement mon directeur de thèse Damien ARNOULT. Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée, pour ta présence et ta disponibilité tout au long de ces 3 années de thèse. Merci, également pour ta patience, ton optimisme et tes encouragements lorsque les expériences ne fonctionnaient pas et pour m'avoir appris à avoir confiance en moi et mes capacités. Un énorme merci à toutes les personnes passées et présentes du laboratoire qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation et au bon déroulement de cette thèse : Alain, Cathy, Nélia, Neslihan, Mélissa, Claire, Emilie, Charlotte, Chus, Ahmed, Sonia, Nicolas, Roxanne et Jessica ; ainsi que l'équipe du bâtiment Lavoisier. Je ne peux oublier dans ces remerciements, Naima qui m'a pris sous son aile, qui m'a formé et qui est devenue ma partenaire de manip, ce duo qui nous a d'ailleurs valu le surnom de « NaiMarie ». Merci pour tout et pour les conseils que tu continues de me donner. N'échapperont pas à ces remerciements Kostas-Emeline-Naima-Gorba-Nathalie pour l'ambiance qu'ils ont apportés au sein de cette équipe, ce petit groupe de thésards qui m'a accompagné pendant mes stages de master et mes premières années de thèse, qui ont été là et le sont toujours pour partager de merveilleux moments au laboratoire comme ailleurs. J'aimerai aussi remercier Léo, pour ton expertise en virologie et toutes les discussions sérieuses ou non que l'on a pu avoir sur nos sujets de recherche. Un grand merci à Florence qui se rend toujours disponible pour nous, pour nous conseiller, nous encourager et qui m'a permis de vivre ma 3^{ème} année de thèse avec plus de sérénité.

Pour finir, je tiens à remercier mon entourage. Pour commencer, tous mes ami(e)s badistes qui ont partagé avec moi ce sport qui a été un exutoire tout au long de ma thèse. Les meilleurs pour la fin, ma famille, un grand merci à ma sœur et mes parents pour m'avoir toujours encouragés dans toutes les démarches que j'entreprenais, de m'avoir soutenu dans les bons comme dans les mauvais moments, d'avoir toujours cru en moi et surtout d'avoir supporté la

boule de nerfs et de stress que j'ai pu être. J'espère vous rendre fier, je vous aime très fort. Un merci tout particulier à ma sœur, Camille, pour avoir pris le temps de relire ce pavé qu'est ma thèse afin de corriger les fautes d'orthographe. Merci aussi à ma famille d'Auvergne, du Doubs et à mon papy, qui bien que l'on soit éloigné, ont toujours suivi mon parcours et m'ont encouragé. Merci à ma filleule Eva et ma cousine Méline, qui du haut de leur 8 et 4 ans, m'ont permis d'échapper à tous les soucis de la thèse avec leur innocence et leur joie de vivre.

Et enfin, merci à toi, Mickael qui partage ma vie, de m'avoir soutenue, aidée, rassurée et supportée au quotidien. Tout simplement, merci d'être présent à mes cotés chaque jour qui passe, je t'aime.

Pour finir, je souhaite dédier ce travail de thèse à une personne qui était très importante pour moi, ma grand-mère, sans elle je ne pense pas que je serais là où je suis. J'espère que de là où tu es, j'ai pu te rendre fier.

Table des matières

Résumé	1
Liste des abréviations	2
Table des illustrations	5
Introduction	6
I. Immunité innée antivirale	7
1. Vue d'ensemble de l'immunité innée	7
2. La réponse antivirale	12
1. Les facteurs de transcriptions clés	12
1) Les facteurs IRFs, clés des interférons	12
2) Le facteur de transcription NF- κ B	13
2. Les Interférons	15
1) Les interférons de type I	15
2) Les interférons de type II	16
3) Les interférons de type III	17
3. Les cytokines pro-inflammatoires	18
3. Reconnaissance des motifs viraux et voies de synthèse des IFNs	19
1. Les acides nucléiques, signature d'une infection virale	19
2. TLRs, sentinelles du réseau endosomal	21
1) Les TLRs antiviraux	21
2) Voies de signalisation en aval des TLRs	24
a) Voie de signalisation dépendante de Myd88	24
b) Voie de signalisation dépendante de TRIF	25
3. Détection des acides nucléiques viraux dans le cytosol	27
1) Reconnaissance des ARNs viraux par les RLRs	27
a) RIG-5 et MDA5 : spécificité de ligands	27
b) Le cas particulier de LGP2	29
c) Activation et signalisation en aval des RLRs	30
2) Reconnaissance des ADNs viraux	33
a) Rôle central de STING dans le contrôle de la détection d'ADN	33
b) De multiples senseurs d'ADN putatifs	34
c) cGas, le senseur clé d'ADN exogène	36
d) Les inflammasomes	38
II. Organites et immunité innée	41
1. Les organites comme plateforme de signalisation cellulaire	41
1. La mitochondrie	41
2. Le réticulum endoplasmique	45
2. La cellule et ses constituants, source de signaux de danger	47
1. Les signaux de danger d'origine cytoplasmique	47
2. Les signaux de danger et organites cellulaires	48
1) Le noyau	48
2) Le réticulum endoplasmique	50
a) Le stress du réticulum endoplasmique favorise l'inflammation	50
b) Diaphonie entre stress du RE et mitochondrie	52
3) La mitochondrie	54
a) ADN mitochondrial	54
b) Voies métaboliques de la mitochondrie	56

III. Ubiquitination et Immunité	58
1. Le système ubiquitine	58
1. Ubiquitine et cascade enzymatique.....	58
2. Les différents type d'ubiquitination.....	61
3. Réversibilité de l'ubiquitination : la déubiquitination	63
2. L'ubiquitination comme régulateur de l'immunité	65
1. Régulation des différents PRRs et de leur adaptateur moléculaire.....	65
1) Les TLRs et leurs adaptateurs Myd88 et TRIF	65
2) les RLRs et l'adaptateur MAVS.....	67
a) Activation via l'ubiquitination de type K63	67
b) Ubiquitination dégradative de type K48.....	69
3) Ubiquitination de STING	70
2. Régulation par l'ubiquitination de la signalisation en aval des PRRs	72
1) Ubiquitination de type K63 et activation des protéines kinases.....	72
2) Ubiquitination de type K48 et modulation de la transcription des gènes antiviraux	74
3) Régulation de la protéine NEMO.....	75
3. Régulation de l'immunité innée antivirale par les DUBs	76
Description du projet	79
Résultats	82
Discussion et perspectives	110
Annexes	130
Annexe 1	131
Mitochondrial hyperfusion promotes NF-kappaB activation via the mitochondrial E3 ligase Mulan	
Annexe 2	150
The E3 ubiquitin ligase RNF121 is a positive regulator of NF-kappaB activation	
Annexe 3	158
The TBK1-binding domain of optineurin promotes type I interferon responses	
Annexe 4	170
Mitochondrial dynamics and the innate antiviral immune	
Références bibliographiques	183

Implication de l'ubiquitination et de l'appareil de Golgi dans l'activation de TBK1 après détection des ARNs viraux

Mots clés : Immunité Innée Antivirale, Interférons, PRR (Pattern Recognition Receptors), TBK1 (TANK-Binding kinase), Ubiquitination, Optineurine.

L'immunité innée antivirale repose en grande partie sur la production des interférons de type I (IFN- α/β) par les cellules infectées et les cellules immunitaires. Cette synthèse résulte de la reconnaissance de motifs viraux caractéristiques par des récepteurs cellulaires, parmi lesquels les RIG-I-Like Récepteurs (RLR) et le Toll-Like Récepteur 3 (TLR3) détectent l'ARN viral respectivement au niveau du cytosol et des endosomes. La signalisation induite par les RLRs et TLR3 conduit à l'activation d'IRF3 et de NF- κ B, deux facteurs de transcription impliqués respectivement dans la production d'IFN- α/β et de cytokines pro-inflammatoires. TBK1 (TANK-Binding Kinase 1) joue un rôle essentiel dans l'immunité innée antivirale, de par la phosphorylation du facteur de transcription IRF3, nécessaire à la production des IFNs de type I. Bien que de nombreuses études aient montré le rôle crucial de cette kinase dans la signalisation antivirale, le processus entraînant son activation est encore mal déterminé à ce jour. Lors de cette étude nous avons démontré que suite à la stimulation du TLR3 et des RLRs, la forme active, ubiquitinylée et phosphorylée, de TBK1 se relocalise au niveau de l'appareil de Golgi, grâce à son ubiquitination sur les résidus K30 et K401. Ce mécanisme implique la reconnaissance des chaînes d'ubiquitines associées à TBK1 par l'Optineurine (OPTN), permettant la formation d'un complexe autorisant le rapprochement des molécules de TBK1 puis la trans-autophosphorylation au niveau de l'appareil de Golgi. Au cours de ce travail nous avons également découvert qu'OPTN est la cible d'une protéine virale, la protéine NS3 du BTV (Bluetongue Virus), qui neutralise son activité et diminue ainsi l'activation de TBK1 et la signalisation responsable de la sécrétion de cytokines antivirales.

Ubiquitination and Golgi apparatus involvement in TBK1 activation after viral RNAs detection

Keywords : Antiviral Innate Immunity, Interferons, PRR (Pattern Recognition Receptors), TBK1 (TANK-Binding kinase), Ubiquitination, Optineurin.

Type-I interferons (IFN- α/β) production and release is a major event in innate antiviral immunity. IFN production depends on the interaction between viral structures and their corresponding cellular sensors. RIG-I-Like Receptors (RLRs) and Toll-Like Receptor 3 (TLR3) sense dsRNAs in the cytosol and endosomes respectively. Stimulation of these receptors by their ligands promotes a signal transduction leading to the activation of the transcription factors NF- κ B and IRF3, and consequently to the production of proinflammatory cytokines and Type I Interferons (IFN-I). TBK1 (TANK-Binding Kinase 1), plays a crucial role in antiviral innate immunity, by phosphorylating the transcription factor IRF3, required for the production of type I IFNs. Although many studies have shown the critical role of this kinase in antiviral signaling, the molecular mechanism of its activation are largely unknown. We report here the localization of the ubiquitinated and phosphorylated active form of TBK1 to the Golgi apparatus after the stimulation of RLRs or TLR3, due to TBK1 ubiquitination on lysine residues 30 and 401. The ubiquitin-binding protein optineurin (OPTN) recruits ubiquitinated TBK1 to the Golgi apparatus, leading to the formation of complexes in which TBK1 is activated by trans-autophosphorylation. We also found that a viral protein binds OPTN at the Golgi apparatus, neutralizing its activity and thereby decreasing TBK1 activation and downstream signaling.

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADNmt: ADN mitochondrial
ADP : Adénosine DiPhosphate
AMP : Adénosine MonoPhosphate
AIM2 : Absent In Melona 2
AIP4 : Atrophin-1-Interacting Protein 4
ALR : AIM2-Like Receptor
ARN : Acide RiboNucléique
ARN/ADNdb : ARN/ADN double brin
ARN/ADNsb : ARN/ADN simple brin
ASC : Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD
ATD : Acidic Transactivation Domain
ATF6 : Activating Transcription Factor 6
ATG5 : Autophagy protein 5
ATP : Adénosine Tri-Phosphate

B

Bak : BCL2-Antagonist/Killer
Bax : Bcl-2-Associated X protein
Bcl-2 : B Cell Lymphoma 2
BCR : B cell Receptor
Bid : BH3 Interacting Domain Death
BIR : Baculovirus Inhibitor of apoptosis Repeat
BMDM : Bone-Marrow-Derived Macrophage
BTV : BlueTongue Virus
β-TRCP : β- Transducin Repeats-containing Proteins

C

Ca²⁺ : Calcium
CARD : Caspase Recruitment Domain
CBP : CREB-binding protein
CDN : Cyclic dinucleotides
CDS : Cytosolic DNA Sensors
cGAS : cyclic GMP-AMP Synthase
cGAMP : cyclic GMP-AMP
cIAP : Cellular Inhibitor of Apoptosis
CLR : C-Type Lectin Receptor
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CRD : carbohydrate recognition domain
C-Ter : Carboxy-Terminal
CTLD : C-type lectin-like domains
CTT : Carboxy-Terminal Tail domains
CUL1 : Cullin-1
CYLD : Cyldromatosis

D

DAI : DNA-dependent Activator of INF regulatory factors
DAMPs : Damaged Associated Molecular Pattern
DBD : DNA Binding Domain
DC : Dendritic Cell
DD : Death Domain
DHX : DEAH-box helicase
DUB : Déubiquitine ou Déubiquitine Ligase
DUBA : Déubiquitine A

E

EBV : Epstein-barr virus
EMCV : Encephalomyocarditis Virus
ER : Endoplasmic reticulum
ERAD : Endoplasmic Reticulum Associated Degradation

F

FOXO1 : Forkhead Box O1

G

G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor
GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GMP : Guanosine MonoPhosphate
GSSG : disulfure de glutathion

H

HECT : Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
HEK : Human Embryonic Kidney
HIN-200 : Hematopoietic Interferon-inducible Nuclear proteins with a 200-amino-acid repeat
HMGB1 : High Mobility Group Box 1
HOIL-1L : Heme-oxidized IRP2 ligase-1
HOIP : *HOIL-1L* interacting protein
HSP : Heat Shock Protein
HSV : Herpes Simplex Virus

I

IAD : IRF Association Domain
IAP : Inhibitor of Apoptosis
iE-DAP : D-glutamyl-meso-DiAminoPimelic acid
IFI16 : gamma-Interferon-inducible-protein 16
IFN : Interferon

IFNAR : IFN α -Receptor
I κ B : Inhibitor of NF- κ B
IKK : Inducible I κ B Kinase
IL: Interleukine
Insig1 : Insulin Induced Gene 1
IRAK : IL-1R Associated Kinase
IRE1 α : Inositol Requiring Enzyme 1 α
IRF : Interferon regulatory Factor
ISG : Interferon Stimulated-Gene
ISGF : Interferon Stimulated-Gene Factor
ISRE : IFN-Stimulated Response Element

J

JAK : Janus Kinase
JAMM : JAB1/MPN/Mov37 metalloproteases
JNK : JUN N-terminal kinase

K

K : Lysine
K⁺ : Potassium
KD : Kinase Domain
KO : KnockOut
KSHV : Kaposi Sarcoma-associated HerpesVirus

L

LB/LT : Lymphocyte B/T
LC3 : Light Chain 3
LGP2 : Laboratory of Genetics and Physiology 2
LRR : Leucin Rich Repeat
LUBAC : Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex

M

M : Méthionine
MAL : MyD88 adaptor-like
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MARCH5 : membrane associated ring-CH-type finger 5
MAVS : Mitochondrial AntiViral Signaling Protein
MCMV : Mouse CytoMegalovirus
MCPIP : Monocyte Chemotactic Protein-Induced Protein
MDA5 : Melona Differentiation –Associated gene 5
MDP : muramyl dipeptide
MEF : Mouse embryonic fibroblast
MEX3C : mex-3 RNA binding family member C
Mfn : Mitofusine
MH2 : Mad-Homology 2
MHV : Murine Hepatitis Virus
MIB1/2 : MIB1 mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1/2
MJD : Machado Joseph Disease proteases
MKK : MAP Kinase Kinase

MMLV : Moloney murine leukemia virus
MMTV : Mouse mammary tumor virus
MTDH : Metadherin
Myd88 : Myeloid Differentiation primary response protein
MYPT1 : Myosin Phosphatase Target subunit 1

N

NACHT: Neuronal Apoptosis inhibitor protein CIITA, HET-E and TP1 domain
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NAP1 : NAK-Associated Protein 1
Ndfip1 : Nedd4 Family Interacting Protein 1
NEMO : NF- κ B-Essential Modulator
NF- κ B : Nuclear Factor- Kappa B
NK : Natural Killer
NLR : NOD-Like Receptor
NLRP : NACHT, LRR and PYD domain-containing Potein
NOD : Nucleotide-binding Oligomerization Domain
Nrdp1 : Neuregulin Receptor Degradation protein 1
NRP : NEMO-Related Protein
NS3/4 : NonStructural viral protein 3/4
NZF : Npl4 zinc finger

O

OAS : Oligo Adénylate Synthétase
OPA1 : Optic atrophy-1
OPTN : Optineurin
OTU : Otubain protease

P

PAMPs : Pathogen Associated Molecular Pattern
PANX1 : Pannexin 1
pDC : Plasmacytoïd Dendritic Cell
PDI : Protein Disulphide Isomerase
PERK : Protein kinase RNA (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase
Pin1 : Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1
PIP2 : PhosphatidylInositol biPhosphate
PLK1 : Polo-Like Kinase 1
Poly(dA-dT) : ADN synthétique riche en AT
Poly(I :C) : polyinosinic-polycytidylic acid
PRRs : Pattern Recognition Receptors
PTM : Post-translational modification
PTP : Permeability Transition Pore
PYD : Pysin Domain

Q

R

RAGE : récepteur pour les produits finaux de glycation avancée
RANKL : Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand
RBCK1: RBCC protein interacting with PKC1
RD : Repressor Domain
REL : Réticulum Endoplasmique Lisse
RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux
RHD : REL-homology domain
RIG-I : retinoic acid-inducible gene I
RING : Really interesting new gene
RIP : Receptor-interacting protein kinase
RIRR : ROS-induced ROS release
RLR : RIG-I-Like Receptor
RNF : RING-finger protein
ROC1 : Regulator of cullins 1
ROS : Reactiv Oxygen Species
RSV : respiratory syncytial virus

S

SeV : Sendai virus
SKP1 : S-phase kinase-associated protein 1
SINTBAD : Similar to NAP1 TBK1 Adaptor
SLA : Sclérose Amyotrophique Latérale
STAT : signal transducer and activator of transcription
STING : Stimulator of IFN genes

T

TAB : TAK-1 Binding domain
TAD : Transactivation Domain
TAK1 : TGF- β Activated Kinase 1
TANK : TRAF family member associated NF- κ B activator
TBK1 : TANK-Binding Kinase 1
TCR : T-cell receptor
TFAM : Mitochondrial transcription factor A
TGF β : Transforming Growth Factor β
TIAC : TBK1/IKK ϵ activating complex
TIR : Toll/IL-1 Receptor homology
TLR : Toll-Like Receptor
TM : TransMembranaire
TNF : Tumor Necrosis Factor

TRAF : TNF-receptor-associated factor
TRAM : TRIF-related adaptor molecule
Triad3A : Triad domain-containing protein 3
TRIF : TIR domain-containing adaptor inducing IFN β
TRIM : TRIPartite Motif
TRIP : TRAF-Interacting Protein
TUCAN : Transmetteurs ubiquitinyllées conduisant à l'activation de NF- κ B
TXNIP : Thioredoxin interacting protein

U

Ub : Ubiquitine
UBA6 : Ubiquitin-like modifier activating enzyme 6
UBAN : Ubiquitin-Binding regions of ABIN proteins and NEMO
UBD : Ubiquitin-Binding Domain
UBE1 : Ubiquitin-activating enzyme 1
UCH : Ubiquitin C-terminal hydrolases
ULD : Ubiquitin-Like Domain
UPR : Unfolded Protein Response
USP : Ubiquitin-specific protease

V

VHC : Virus de l'Hépatite C
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VSV : virus de la stomatite vésiculaire

W

WT : Wild type
WWP2 : WW domain containing E3 ubiquitin Protein ligase 2

X

Y

Z

ZF : Zinc finger

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Les récepteurs de l'immunité innée (PRRs)

Figure 2 : Structure et classification des NLRs

Figure 3 : Les interférons et leur signalisation

Figure 4 : Voies de signalisation des TLRs antiviraux

Figure 5 : Hypothèses de régulation de la signalisation des RLRs par LGP2

Figure 6 : Structure et mécanisme d'activation des RLRs

Figure 7 : Voies de signalisation des RLRs

Figure 8 : Voies de signalisation des senseurs d'ADN cytosoliques

Figure 9 : Voies de signalisation des inflammasomes après infection par les virus

Figure 10 : Dynamique mitochondriale et immunité innée antivirale

Figure 11 : Stress du réticulum endoplasmique et inflammation

Figure 12 : La mitochondrie comme activateur de la réponse immune

Figure 13 : Cascade de liaison de l'ubiquitine

Figure 14 : Mono-, multimono- ou poly-ubiquitination

Figure 15 : Les types d'ubiquitination et leurs fonctions

Figure 16 : Classification des DUBs humaines

Figure 17 : Régulation par ubiquitination des différents PRRs et leurs adaptateurs

Figure 18 : Régulation par ubiquitination de la signalisation en aval des PRRs

Figure 19 : Structure de TBK1

Figure 20 : Structure d'OPTN et de NEMO

Figure 21 : Modèle d'activation de TBK1

Figure 22 : OPTN, senseur des chaînes d'ubiquitine de TBK1

Figure 23 : Mécanisme d'activation de TBK1 suite à l'activation des RLRs et du TLR3

Introduction

I. Immunité innée antivirale

1. Vue d'ensemble de l'immunité innée

Toutes les espèces animales sont confrontées quotidiennement à un grand nombre de micro-organismes potentiellement dangereux. Notre capacité à éviter l'infection repose en partie sur le système immunitaire adaptatif, qui se souvient de précédentes rencontres avec des agents pathogènes spécifiques et les détruit lors d'un nouveau contact. Cependant, lors d'une première exposition, l'amplification clonale des lymphocytes naïfs et leur différenciation en cellules effectrices prennent plusieurs jours (3 à 5), alors que de nombreux agents infectieux ont des temps de génération qui peuvent n'être que de quelques dizaines de minutes. Par conséquent nous nous appuyons sur notre système immunitaire inné, qui intervient dans les heures, voire les minutes suivant l'infection^{1,2}.

Les macrophages, cellules dendritiques (DC), cellules NK qui opèrent en première ligne de la réponse innée sont activés par des motifs moléculaires conservés au sein de différents types de micro-organismes baptisés PAMP (*pathogen associated molecular pattern*) par Charlie Janeway³. Ces PAMPs sont caractérisés par trois propriétés : ils sont absents des cellules de l'hôte ; ils sont communs à de nombreuses espèces de micro-organismes ce qui permet de reconnaître l'énorme diversité des microbes par un nombre restreint de récepteurs ; ils sont essentiels à la survie des pathogènes, ce qui limite l'apparition de mutants échappant à la reconnaissance. Dès 1989, C. Janeway a postulé l'existence de récepteurs, les *pattern recognition receptors* ou PRRs reconnaissant ces structures et activant la réponse immunitaire³. Il est maintenant établi que ces récepteurs sont également impliqués dans la reconnaissance de molécules endogènes libérées par les cellules endommagées ou stressées, appelées DAMPs pour Damaged associated molecular pattern. La liste de ces composants est en constante augmentation. Ils comprennent notamment des acides nucléiques, des protéines intracellulaires, composants de matrice extracellulaire et des lipides oxydés^{1,2,4}.

Les vertébrés ont développé un grand nombre de PRRs intra et extra cellulaires capables de détecter la présence d'organismes pathogènes (Figure 1). A ce jour, cinq grandes familles de récepteurs ont été identifiées : les récepteurs transmembranaires Toll-Like (TLRs) et Lectine de type C (CLRs), les récepteurs cytoplasmiques de type NOD (NLRs), les récepteurs RIG-I like (RLRs) et une grande famille de senseurs d'ADN (CDS) incluant les récepteurs AIM2-like (ALRs)^{1,2,5}.

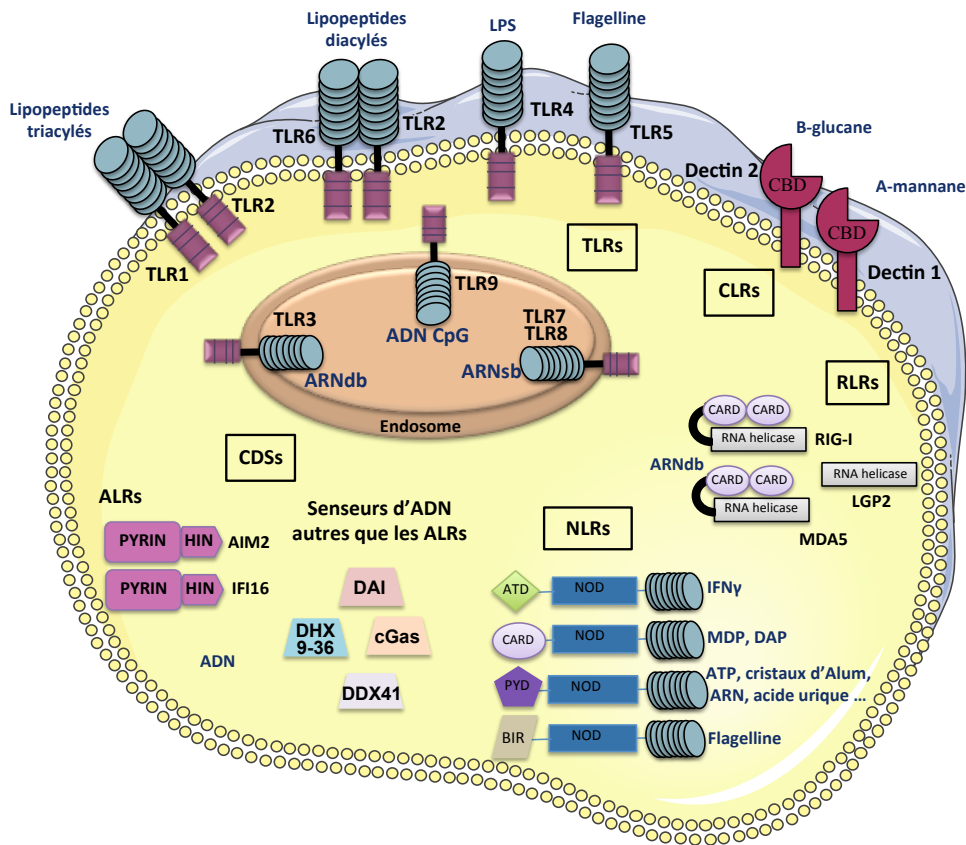


Figure 1 : Les récepteurs de l'immunité innée (PRRs)

➤ **Les TLRs**

C'est vers la fin des années 90 que le premier récepteur Toll fut découvert chez la mouche à fruits *Drosophila*, comme étant un récepteur de l'immunité permettant de lutter contre les infections fongiques⁶. Des travaux ont ensuite mis en évidence chez les mammifères, une famille de récepteurs apparentés à Toll, les Toll Like Receptors (TLRs), essentiels à l'immunité innée⁷. Les TLRs sont des protéines transmembranaires caractérisées par des domaines extracellulaires contenant un nombre variable de répétitions riches en leucine (LRR) pour la reconnaissance des ligands, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique homologue à celui du récepteur de l'IL-1 (IL-1R), appelé Toll/IL-1R ou domaine TIR permettant la transduction du signal⁸. Les TLRs sont exprimés majoritairement sur les cellules immunes incluant les macrophages, les CD, les lymphocytes B et certains types de lymphocytes T, mais ils sont également présents sur des cellules non-immunes comme les fibroblastes et les cellules épithéliales. A ce jour, 12 membres de la famille des TLRs ont été identifiés chez les mammifères (10 chez l'homme et 12 chez la souris)^{1,5,9}. Chaque TLR est capable de reconnaître des PAMPs distincts ce qui leur confère

un large spectre de détection des pathogènes et fait de ces PRRs une barrière redoutable aux infections¹. La localisation cellulaire des TLRs est alors associée à la nature des ligands qu'ils reconnaissent : ainsi, les récepteurs TLR 1, 2, 4, 5 et 6, exprimés à la surface des cellules, reconnaissent des composés microbiens protéiques ou lipidiques. A l'inverse, les TLR 3, 7, 8 et 9 reconnaissent des acides nucléiques viraux à la surface des compartiments endosomaux^{1, 5, 9}.

➤ Les CLR

Les CLR (C-type lectin-like receptors) sont des récepteurs transmembranaires exprimés, mais non restreints, sur les cellules myéloïdes incluant les macrophages et les cellules dendritiques. La caractéristique commune de ces récepteurs est de posséder au moins un CTLD (C-type lectin-like domains). Pour la majorité des CLR fonctionnant comme des récepteurs immuns, le CTLD lie des carbohydrates de manière dépendante du calcium. Par conséquent, ce domaine est plus communément appelé CRD (carbohydrate recognition domain) plutôt que CTLD¹⁰. Ces récepteurs jouent un rôle critique dans l'immunité antifongique¹¹. La reconnaissance des PAMPs exprimés en surface tels que les β -glucane et α -Mannan, par les Dectin-1 et 2 respectivement, initie des réponses inflammatoires qui à leur tour polarisent une réponse adaptative Th17, bénéfique pour la lutte et la clearance antifongique¹². De plus, certains CLR sont capables de détecter des ligands exposés ou alors libérés par des cellules mourantes. Par exemple, Mincle et DGNR-1 sont impliqués respectivement dans la reconnaissance de la SAP-130 et des filaments d'actine-F des cellules nécrotiques^{13, 14}.

➤ Les NLR

La famille des NLRs est constituée de récepteurs intracellulaires caractérisés par leur structure tripartite. Leur organisation générale comprend 1) une région C-terminale riche en LRR responsable de la reconnaissance du ligand; 2) un domaine central NOD/NACHT permettant l'oligomérisation de la molécule; et 3) un domaine effecteur N-terminal impliqué dans l'initiation de la signalisation et constitué de domaines d'interaction protéine-protéine. Ces récepteurs sont classés en quatre sous-groupes NLRA, NLRB, NLRC et NLRP selon la nature de leur domaine N-terminal correspondant respectivement à un domaine ATD (Acidic Transactivation Domain), un domaine BIR (Baculovirus Inhibitor of apoptosis Repeat), un

domaine CARD (CAspase Recruitment Domaine) ou encore un domaine PYD (PYrin Domain)^{15, 16} (Figure 2). Les NLRs sont capables d'orchestrer des réponses immunitaires et inflammatoires suite à la reconnaissance de motifs microbiens (flagelline, peptidoglycane bactérien...), et de signaux de danger (cristaux moléculaires, efflux de potassium, ATP, ROS ...)¹⁷. Une fois activés ils exercent différentes fonctions qui peuvent être divisées en 4 catégories :

- L'autophagie : NOD2 induit l'autophagie en recrutant ATG16L1 à la membrane plasmique, afin d'éliminer les agents pathogènes¹⁸.
- La transduction du signal : La reconnaissance de l'IE-DAP et le MDP, par NOD1 et NOD2 respectivement, entraîne l'activation de la voie de signalisation NF- κ B et MAPK¹⁹.²⁰ NLRP2 et NLRP4 agissent quant à eux comme des régulateurs négatifs de ces voies de signalisation.
- L'activation transcriptionnelle : CIITA et NLRC5 sont des transactivateurs de l'expression des CMHs^{21, 22}.
- La formation d'inflammasomes : NLRP1, 2, 3, 6, 7, 12, NLRC4, et NAIP entrent dans la composition de l'inflammasome. L'activation de celui-ci par différents stimuli conduit au clivage de la caspase 1, autorisant la maturation de l'IL-1 β ²³.

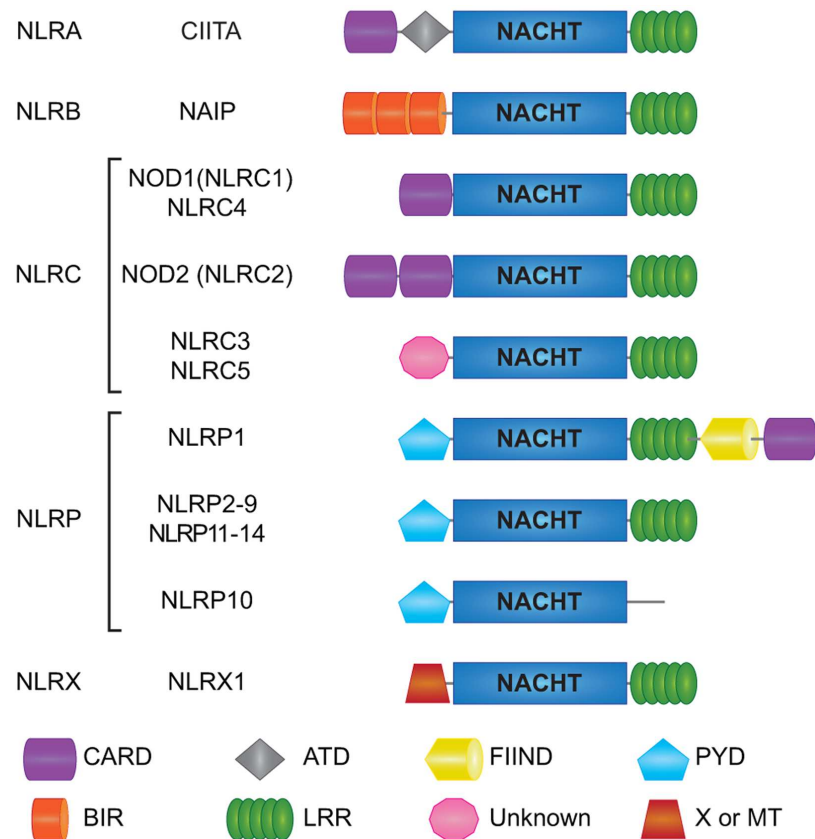


Figure 2 : Structure et classification des NLRs¹⁶

➤ Les **RLRs** et les **CDS**, senseurs d'ARN et d'ADN respectivement, feront l'objet d'une description détaillée dans la suite de ce mémoire (partie I-3-3).

La stimulation de l'ensemble de ces récepteurs active alors des cascades de signalisation qui induisent rapidement l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse immune et pro-inflammatoire. Ces voies de signalisation aboutissent notamment à l'activation des facteurs de transcription IRFs et NF- κ B, à l'origine de la production des IFNs de type I, et de cytokines pro-inflammatoires, respectivement^{1, 2, 24}. La synthèse de ces différentes cytokines orchestre alors la mise en place d'une réponse immune innée rapide mais également une maturation des cellules immunitaires responsable de la réponse adaptative spécifique^{2, 24, 25}.

2. La réponse antivirale

Une fois l'invasion virale détectée dans la cellule par les différents PRRs impliqués dans la reconnaissance des virus, la cellule répond à l'infection par le biais des différentes voies de signalisation mises en place. Cette réponse antivirale est le résultat de l'activation de quatre facteurs de transcription, les IRFs (IRF3, IRF7, IRF9) et NF- κ B, aboutissant à la synthèse des IFNs et de cytokines pro-inflammatoires respectivement^{1, 2, 24}.

1. Les facteurs de transcriptions clés

1) Les facteurs IRFs, clés des interférons

Les IRFs sont une famille de facteurs de transcription constitués de 9 membres : IRF-1, -2, -3, -4 (également appelé PIP, LSIRF, ou ICSAT), -5, -6, -7, -8 (ou ICSBP), et -9 (ISGF3 γ). Chaque membre comprend un domaine de liaison à l'ADN (DBD) situé en N-terminal, conservé au sein de la famille et comprenant 5 répétitions de l'acide aminé tryptophane. Ce domaine reconnaît des séquences d'ADN similaires, les ISREs contenant la séquence consensus « 5'-AANNGAAA-3' ». L'extrémité C-terminale, quant à elle, contient des domaines d'activation et d'interaction avec d'autres facteurs de transcription et cofacteurs : les domaines d'association aux IRFs IAD 1 et 2. Tous les IRFs, à l'exception des IRF-1 et -2, possèdent le domaine IAD1, présentant une homologie de structure avec le domaine Mad-hology 2 (MH2) de la famille des Smad^{26, 27}.

Les membres de cette famille ont initialement été identifiés dans le cadre de la recherche sur les IFNs de type 1, dont je parlerai plus amplement dans la partie suivante. Depuis, de nombreux travaux ont permis de démontrer leur rôle dans la régulation de la réponse immunitaire innée, du développement des différentes cellules du système immunitaire et de l'oncogenèse.

Cependant, de nombreuses études ont été réalisées sur les IRF3 et IRF7 étant donné que ceux-ci sont des régulateurs clés de l'induction de la transcription des IFNs de type I au cours d'une infection virale^{28, 29}. IRF3 est constitutivement exprimé, sous une forme latente, dans le cytosol des cellules³⁰. Les voies de signalisation activées suite à une infection virale, aboutissent à la phosphorylation d'IRF3, au niveau de sa région C-terminale, puis à sa dimérisation et enfin sa translocation dans le noyau^{30, 31, 32}. IRF7 est quant à lui, faiblement exprimé dans les cellules mais rapidement induit après la première vague d'IFNs de type I induite par l'infection virale^{33, 34, 35}. Des études de son promoteur, ont révélé la présence d'un motif ISRE capable de lier le complexe ISGF3. La liaison des IFNs de type I à leur récepteur

spécifique conduit à l'activation de ce complexe ISGF3, composé de IRF9, STAT-1 et -2, responsable alors de l'induction du gène IRF7^{33, 34, 35}. Tout comme l'IRF3, il réside sous forme inactive dans le cytosol, et suite à une infection virale, est la cible de phosphorylation sur des résidus sérine en position C-terminale, conduisant à sa dimérisation et translocation dans le noyau. IRF3 et IRF7 peuvent former des homo- ou hétérodimères et chacun d'eux agit différemment sur les gènes codant pour les IFNs de type I. Ainsi, IRF3 serait impliqué préférentiellement dans l'activation du gène de l'IFN β et celui de l'IFN α 1, tandis que l'IRF7 active efficacement à la fois les IFN α et β ^{33, 34, 35}. Dans tous les cas, les homo- et hétérodimères migrent jusqu'au noyau où ils forment un complexe avec les coactivateurs CBP/p300 et lient leur séquence d'ADN cible codant pour les IFN de type I.

Concernant les autres membres de cette famille, dans des conditions physiologiques les IRF1 et -2 sont exprimés à faible niveau dans divers types cellulaires. Cependant après stimulation par une infection virale ou des facteurs immuns (TNF α , IL-6, IFNs), l'expression d'IRF1 est considérablement augmentée. L'IRF1 et -2 agissent comme activateur et répresseur de la transcription des gènes des IFNs, respectivement^{27, 36}. Contrairement à ces deux facteurs de transcription, l'IRF4 et -8 sont exprimés préférentiellement dans les cellules hématopoïétiques. En présence d'IFN α , l'expression d'IRF4 est fortement accrue alors que celle de l'IRF8 est induite par l'IFN γ plutôt que par les IFNs de type I. Ces deux facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation de l'immunité cellulaire³⁷.

2) Le facteur de transcription NF- κ B

Chez les mammifères, la famille des facteurs de transcription NF- κ B est constituée de cinq membres: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- κ B1) et p100/52 (NF- κ B2). Ces protéines partagent en N terminal, un domaine conservé de 300 acides aminés appelé « Rel homology domain » (RHD). Ce domaine contient des séquences nécessaires à la dimérisation, la fixation à l'ADN, l'interaction avec les protéines I κ B (Inhibitors of κ B) ainsi qu'à la translocation nucléaire des protéines NF- κ B grâce à une séquence signal spécifique NLS (Nuclear Localisation Sequence)³⁸.

Les membres de la famille NF- κ B ne sont transcriptionnellement actifs que sous forme d'homo ou d'hétéro-dimères. Le complexe p50/p65 est l'hétérodimère le plus abondant, il est retrouvé au niveau de presque tous les types cellulaires³⁹.

Les protéines NF- κ B peuvent être divisées en 2 classes, différant par la séquence C-

terminale en aval du domaine RHD. Les sous-unités RelA, RelB et c-Rel possèdent un domaine de transactivation « TAD » dont sont dépourvus les isoformes p50 et p52. Cette différence structurale explique pourquoi les hétéro-ou homodimères contenant RelA, RelB et c-Rel sont généralement des activateurs transcriptionnels, tandis que les complexes homodimériques p50 et p52 se comportent le plus souvent comme des répresseurs de la transcription des gènes cibles⁴⁰.

NF- κ B joue son plus important rôle dans le système immunitaire en régulant l'expression d'inducteurs et d'effecteurs agissant à différents stades des réponses immunes inées et adaptatives⁴¹. L'implication de NF- κ B ne se limite pas au système immunitaire, il intervient également dans le contrôle de la transcription de certains gènes impliqués dans divers processus cellulaires fondamentaux tels que la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire.

Etant donné sa grande capacité à influencer l'expression de nombreux gènes, l'activation de NF- κ B est finement régulée et cela à de multiples niveaux. D'une part, l'activation de NF- κ B est contrôlée par son interaction avec ses inhibiteurs de la famille des I κ Bs ainsi que par les kinases spécifiques de ces protéines (IKKs). D'une autre part, un certain nombre de modifications post-traductionnelles (phosphorylation, ubiquitination, etc...) modulent également cette activité.

En l'absence de signaux extracellulaires spécifiques, les dimères NF- κ B potentiellement actifs sont séquestrés dans le cytoplasme suite à leur interaction avec les protéines de la famille I κ B, qui masquent leurs motifs NLS empêchant ainsi leur translocation nucléaire et leur fixation à l'ADN^{42, 43}. Suite à un stress cellulaire ou à l'engagement d'immunorécepteurs, deux voies de signalisation peuvent conduire à la libération et à l'activation de ce facteur de transcription, appelées les voies canonique/classique et non canonique/alternative respectivement. Cette dernière, moins fréquemment observée et activée par un nombre restreint de stimuli, joue néanmoins un rôle crucial dans le développement des organes lymphoïdes responsables de la génération des lymphocytes T et B. Ces deux voies, de manières distinctes, aboutissent à une étape commune avec l'activation d'un complexe de kinase IKK, permettant l'activation du dimère RelA/p50 dans le cas de la voie canonique et généralement du dimère p52/RelB pour la voie non canonique.

2. Les interférons

Le phénomène d'interférence viral est connu depuis 1935. Cependant, l'explication n'est survenue qu'en 1957, quand Alick Isaacs et Jean Lindenmann ont démontré que les cellules en contact avec un virus inactivé libéraient une substance soluble qui protégeait les cellules saines d'une infection ultérieure. Ils découvrent alors la première cytokine, qu'ils appelleront Interféron⁴⁴.

C'est un groupe de cytokines inductibles et sécrétées en réponse à divers stimuli, ayant un rôle central au cours des réponses immunitaires antivirales. Ils induisent en effet, un état antiviral dans les cellules infectées et avoisinantes limitant ainsi la propagation du virus. De plus, ils modulent les réponses immunitaires innées favorisant la présentation antigénique et l'action des cellules NK, tout en limitant les voies pro-inflammatoires et la production de cytokines. Enfin, ils participent à la mise en place d'une réponse immune adaptative en stimulant la maturation des lymphocytes B et T et le développement d'une mémoire immunologique^{24, 25}.

Les IFNs sont divisés en trois groupes sur la base de leurs propriétés physicochimiques et biologiques, de leur séquence primaire, de leur localisation chromosomique et des récepteurs membranaires spécifiques : les IFNs de type I (comprenant les IFN α , β , ω , ϵ , κ), l'IFN de type II ou l'IFN- γ et les IFN- λ au nombre de trois appelés les IFN-like cytokines ou IFN de type III⁴⁵.

La signalisation engendrée par les différents IFNs fait intervenir les protéines JAK et STAT. Il existe 7 protéines STAT différentes (STAT 1,2,3,4,5a,5b,6) et 4 protéines JAK (JAK 1,2,3 et Tyk-2), les différents membres de ces familles présentant des fonctions distinctes en fonction du stimulus. Suite à la stimulation par les IFNs, les facteurs de transcription cytoplasmiques STAT (STAT 1 et 2), sont phosphorylés sur un résidu tyrosine par les JAKs kinases (Notamment JAK 1, 2 et Tyk-2). Cette cascade de signalisation aboutit alors à la transcription de nombreux gènes inductibles par les IFNs, les ISGs, impliqués dans de nombreux processus biologiques incluant la mise en place d'un état antiviral (Figure 3).

1) Les interférons de type I

Les interférons de type I regroupent 5 classes différentes, exprimées chez l'homme sur le locus du chromosome 9 : l'IFN- α (lui-même divisé en 13 sous-types), $-\beta$, $-\omega$, $-\epsilon$, $-\kappa$. Ils forment une grande famille de cytokines qui contrôle le développement précoce des infections

virales^{46, 47}. La plupart des types cellulaires suite à une infection produisent de l'IFN- β , tandis que les cellules hématopoïétiques, en particulier les cellules dendritiques plasmacytoïdes, sont spécialisées dans la sécrétion de l'IFN- α . En revanche, les IFN- ϵ et - κ ne sont pas induits suite à la stimulation de PRRs. Ils sont cependant exprimés de façon constitutive par les cellules épithéliales du tractus génital féminin et par les kératynocytes, respectivement^{48, 49}. L'IFN- κ ne présente qu'une faible activité antivirale, l'IFN- ϵ contribue quant à lui à la protection contre les infections sexuellement transmissibles par le HSV-2 et *Chlamydia muridarum*.

Les IFNs de type I classique (α et β) exercent leur fonction via des récepteurs hétérodimériques se composant de deux sous-unités : IFNAR1 et IFNAR2. L'activation de ceux-ci par les interférons induit la voie de signalisation JAKs/STATs. Une fois activées par phosphorylation, les facteurs de transcription STAT1 et STAT2 forment un hétérodimère qui s'associe ensuite avec le facteur IRF9 pour former un complexe tripartite appelé ISGF3. Ce complexe pénètre dans le noyau où il se fixe sur la séquence ISRE présente dans les promoteurs de transcription d'une série de gènes appelés ISG (IFN stimulated genes) (Figure 3).

2) Les interférons de type II

La famille des IFNs de type II est représentée par l'IFN- γ , codé par un unique gène sur le chromosome 12. Il est synthétisé par les lymphocytes T de la sous population Th1, les lymphocytes T CD8 et les cellules NK en réponse à la présentation d'agents microbiens et la stimulation par l'IL-12. L'IFN- γ est biologiquement actif sous forme d'homodimère et se fixe sur son récepteur tétraédrique composé de deux chaînes d'IFN γ -R1 et de deux chaînes d'IFN γ -R2. Ce complexe active alors la voie de signalisation JAK/STAT. Dans le noyau, STAT1 se fixe sur les sites GAS au niveau des promoteurs des gènes inductibles par l'IFN- γ ⁵⁰ (Figure 3). Bien qu'il inhibe aussi la réplication virale, le mode d'action de l'IFN- γ diffère des autres types d'interférons. Il est un composant essentiel de l'immunité cellulaire car il stimule la différenciation des macrophages. C'est un important immunomodulateur, étant responsable de l'augmentation de la phagocytose, il active aussi les neutrophiles, il augmente l'effet cytotoxique des cellules NK et il stimule l'expression des molécules du CMH des classes I et II ainsi que des molécules co-stimulatrices⁵¹.

3) Les interférons de type III

Il y a une dizaine d'années, l'IFN- λ est découvert par deux groupes indépendants^{52, 53}. Il forme la famille des interférons de type III, composée de 3 membres l'IFN- λ 1, - λ 2, - λ 3 également appelés IL-29, IL-28A et IL-28B respectivement^{52, 53}. Récemment un quatrième sous groupe, l'IFN- λ 4, a été décrit chez l'homme⁵⁴. Il est exprimé par une petite fraction de la population en conséquence d'une mutation modifiant le cadre de lecture de la séquence codante en amont du gène IFNL3. Celui-ci ne partageant que 29% d'homologie avec l'IFN- λ 3, agit cependant par l'intermédiaire du même récepteur afin d'établir une réponse antivirale⁵⁵. Le récepteur de cette famille est un récepteur hétérodimérique constitué de deux chaînes : IFNLR1, spécifique des IFN- λ et IL10RB, partagée avec d'autres cytokines de la famille IL-10. Bien qu'ils agissent avec un récepteur différent de celui des IFNs de type I, ils induisent une cascade de signalisations semblables et stimulent l'expression des mêmes ISGs (Figure 3). La spécificité de la réponse aux IFNs- λ proviendrait de l'expression différentielle de leur récepteur. Alors que la quasi-totalité des cellules expriment le récepteur des IFNs de type I, l'expression du récepteur à l'IFN- λ semble principalement restreinte aux cellules épithéliales de l'organisme. L'IFN- λ serait donc essentiellement impliqué dans la défense des épithéliums contre l'entrée des virus^{52, 53, 56}.

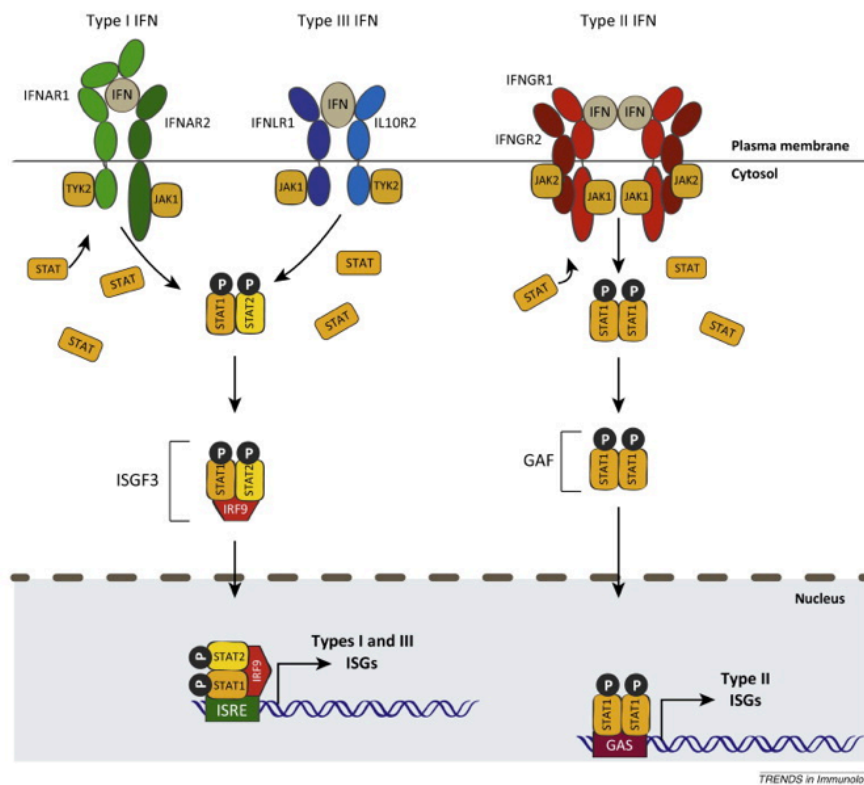


Figure 3 : Les interférons et leur signalisation⁵⁷

3. Les cytokines pro-inflammatoires

L'une des conséquences de l'activation des PRRs antiviraux est la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-18, l'IL-6, le TNF α et l'IL-12.

Le gène codant pour l'IL-1 β n'est pas exprimé constitutivement. En réponse aux agents inflammatoires endogènes ou exogènes, l'IL-1 β est synthétisée en tant que pro-cytokine (pro-IL-1 β). L'IL18, appartenant à la famille de IL-1, est quant à elle constitutivement exprimée par les cellules saines. Produites sous forme de précurseur inactif, ces deux cytokines sont ensuite clivées par la caspase 1, au sein d'un complexe protéique nommé inflammasome⁵⁸.

L'IL-1 est l'une des premières cytokines à être secrétée pendant les phases initiales de l'inflammation. Générée au niveau des sites de lésion, cette cytokine intervient dans la progression de l'inflammation et l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales vasculaires. Elle provoque ainsi l'infiltration de cellules inflammatoires et immunocompétentes dans l'espace extravasculaire. Elle stimule également la libération d'autres cytokines (IL-6, TNF- α , IL-1 α et IL-1 β elle-même), ainsi que d'autres facteurs importants responsables de la croissance et la différenciation des cellules immunitaires (GM-CSF et G-CSF). Elle favorise notamment l'activation des lymphocytes, la différenciation des lymphocytes Th17 et l'activation des cellules dendritiques^{58, 59, 60}.

L'IL-18 quant à elle joue un rôle clé dans la stimulation des lymphocytes T et la libération d'IFN- γ . Elle est impliquée dans la polarisation des lymphocytes Th1 et l'activation des cellules NK^{58, 59, 60}.

L'activation de NF- κ B, suite à l'engagement des PRRs lors d'une infection virale, conduit à la transcription de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF α et l'IL-12. L'IL-6 est une cytokine pléiotropique, possédant de multiples activités biologiques : elle stimule notamment la différenciation des cellules myéloïdes et des lymphocytes T, elle permet également la production de protéines de la phase aiguë de l'inflammation dans le foie^{61, 62}. Le TNF α exerce de multiples effets mais sa fonction principale est de stimuler l'expression de nombreuses molécules pro-inflammatoires incluant les cytokines, les chimiokines, les molécules d'adhésion et les facteurs de croissance⁶². Tout comme l'IL-1 β et l'IL-6, il est responsable de l'élévation de la température corporelle⁶³.

Enfin, l'IL-12 stimule la production d'IFN- γ et induit la différenciation des LT en Th1. En outre, elle améliore les fonctions cytolytiques des cellules NK et T cytotoxiques⁶⁴.

3. Reconnaissance des motifs viraux et voies de synthèse des IFNs

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires et donc dépendent étroitement de la machinerie de biosynthèse de l'hôte afin de se reproduire et se propager. La lutte pour la survie entre le virus et l'hôte est ancienne et par conséquent les deux ont développé de multiples stratégies pour antagoniser l'autre. Les mammifères ont développé des mécanismes de défense sophistiqués : la réponse immunitaire innée antivirale, possible grâce à la détection des PAMPs viraux par les récepteurs de l'immunité innée antivirale. Les virus ont quant à eux acquis des stratégies pour échapper à cette réponse.

1. Les acides nucléiques, signature d'une infection virale

La détection de ces pathogènes pose un réel défi pour l'hôte, dans le sens où à quelques exceptions près, les protéines virales sont très variables, sans être fonctionnellement compromise par des mutations. La solution évolutive est alors que le système immunitaire détecte souvent la partie la plus intrinsèque d'un virus : l'acide nucléique formant son génome. Ces génomes viraux existent sous forme d'ARN ou d'ADN, peuvent être simple brin ou double brin, et peuvent être divisés en un ou plusieurs segments. Les acides nucléiques sont essentiels à toute vie cellulaire et ne sont donc pas uniques aux virus. C'est pourquoi les PRRs se basent sur deux critères pour reconnaître spécifiquement les acides nucléiques viraux et non ceux de l'hôte.

Le premier, est basé sur la capacité intrinsèque des senseurs d'ADN et/ou d'ARN à reconnaître non seulement la structure des acides nucléiques mais également des caractéristiques biochimiques inhabituelles telles que des groupements fonctionnels, des modifications post-transcriptionnelles, ou encore la longueur et dans certains cas la séquence, qui sont divergentes entre les ARN viraux et cellulaires⁶⁵.

En effet, les senseurs d'ARN sont capables de distinguer des molécules d'ARNdb ayant une extrémité 5' triphosphorylée non coiffée, modification spécifique des ARNs viraux, induisant une réponse immune⁶⁶. Un motif triphosphate, généré par des polymérases à ARN, est initialement présent au niveau de l'extrémité 5' de toutes molécules d'ARN, cependant

chez les eucaryotes, suite à leur synthèse, les molécules d'ARN sont modifiées par clivage, coiffage ou modifications nucléosidiques, avant d'être relâchées dans le cytoplasme, ne pouvant ainsi être reconnues par les senseurs d'ARNs viraux. Une récente publication indique que les senseurs d'ARN sont également capables de reconnaître des molécules d'ARNdb ayant une extrémité 5'diphosphorylée, représentant alors le déterminant minimal de reconnaissance de ses récepteurs⁶⁷. Ces ARNs sont présents chez certains virus, mais absents des cellules non infectées, indiquant que la reconnaissance des 5'pp-ARN, comme celle des 5'ppp-ARN, agit comme un puissant moyen de discrimination entre le soi et non soi par le système immunitaire inné.

Le mécanisme de méthylation joue également un rôle clé dans cette discrimination. Le TLR9 reconnaît les ADNs possédant des motifs CpG non-méthylés⁶⁸. Or, le contenu en dinucléotides CpG est plus élevé chez les microorganismes que chez l'ADN des vertébrés et ces motifs sont hautement méthylés chez ces derniers en comparaison aux ADN bactériens ou viraux. De plus, certaines molécules d'ARNsb du soi sont rendues non immunogènes par l'ajout d'un groupe 5-méthylcytidine et 2'-O-méthyl⁶⁹, ou encore les molécules d'ARNm sont coiffées en 5' de methylguanosine, minimisant ainsi leur détection par les récepteurs de l'immunité innée.

Le second critère utilisé par les PRRs pour reconnaître spécifiquement certains acides nucléiques est basé sur la double capacité de l'hôte à limiter ses propres acides nucléiques à des emplacements spécifiques dans la cellule et à compartimentaliser la réponse immune. De nombreux virus utilisent la voie endosomale comme porte d'entrée dans la cellule, conditionnant ainsi l'activation des TLRs endosomaux par les ARNs viraux alors exposés, suite à la dégradation des particules virales par acidification^{1,5,9}. Les ARNs cellulaires alors présents dans le cytoplasme ne seront donc pas détectés par les TLRs ; les senseurs cytosoliques utilisent quant à eux les propriétés biochimiques particulières des acides nucléiques, pour les différencier. Les senseurs d'ADN, répondent aux génomes de particules virales entrant, localisés en particulier au niveau des endosomes ou dans le cytoplasme, l'ADN cellulaire étant normalement limité au noyau ou encore aux mitochondries.

2. TLRs, sentinelles du réseau endosomal

1) Les TLRs antiviraux

➤ TLR2 et TLR4

Bien que connus pour reconnaître des composants de la paroi et de la membrane bactérienne, les TLRs présents à la surface cellulaire tels que le TLR2 et 4 sont également capables de monter des réponses immunes contre certains agents pathogènes viraux. Cependant, en raison de leur localisation cellulaire, ils reconnaissent essentiellement des protéines d'enveloppe virale ou des protéines virales libérées dans le milieu extracellulaire, contrairement aux TLRs intracellulaires qui répondent aux acides nucléiques viraux. Toutefois l'activation de ces TLRs, aboutit uniquement à la production de cytokine pro-inflammatoires et non d'IFNs de type I, impliquant une réponse inflammatoire plutôt que la mise en place d'une réponse antivirale spécifique.

Le TLR2 est impliqué dans la reconnaissance des glycoprotéines B et H du cytomégalovirus humain⁷⁰, les glycoprotéines gH / GL et gB du HSV⁷¹, l'UTPase de l'EBV⁷², la protéine hémagglutinine du virus de la rougeole⁷³, la protéine nsp4 du rotavirus⁷⁴, et les protéines NS3 du virus de l'Hépatite C (VHC)⁷³. En outre, le TLR2 est également impliqué dans la réponse aux infections par le virus de la vaccine, de la chorioméningite lymphocytaire, de la varicelle et du zona, et le RSV (Respiratory Syncytial Virus), bien que les PAMPs viraux reconnus par celui-ci n'ont pas été exactement identifiés⁹. Longtemps considéré comme n'étant pas lié à la production d'IFNs de type I, une étude a découvert que le TLR2 contribuait à la production de ces cytokines dans les rates de souris infectées par le cytomégalovirus⁷⁵. En effet, une équipe a trouvé qu'une lignée de monocytes spécifiques appelés monocytes inflammatoires était capable de détecter le virus de la vaccine et le cytomégalovirus via le TLR2, conduisant à la synthèse des IFNs de type I. Ces auteurs ont surtout montré que les souris déplétées en monocytes inflammatoires avant l'infection par le virus de la vaccine, se retrouvaient avec des titres élevés de virus dans le foie et les ovaires, ce qui démontre le rôle essentiel de cette voie de signalisation inhabituelle du TLR2 dans ce type cellulaire spécifique. Bien que le mécanisme précis ne soit pas défini, la production des IFNs nécessite l'internalisation du TLR2, l'engagement de l'adaptateur moléculaire Myd88 et l'activation des facteurs de transcription IRF3 et 7.

Depuis l'étude décrivant le rôle du TLR4 comme senseur de la protéine de fusion F du virus respiratoire syncytial, d'autres ont élargi la liste des virus pouvant être reconnus par ce récepteur. Ainsi un certain nombre de glycoprotéines virales se sont avérées agir comme des

PAMPs : Celles du VSV (vesicular stomatitis virus)⁷⁶, du virus Ebola⁷⁷, les protéines d'enveloppe des rétrovirus murins MMTV (Mouse mammary tumor virus) et MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus)⁷⁸, et ainsi de suite. Le prétraitement avec des ligands du TLR4 protège les souris contre les infections par le virus influenza, le SRAS et le HSV-2, suggérant que la signalisation du TLR4 peut induire une immunité protectrice antivirale⁹. Cependant, dans le contexte d'une infection virale, les données quant au rôle bénéfique pour l'hôte ou le virus de la signalisation TLR4 sont contradictoires et dépendent du virus étudié. Ainsi, le TLR4 a un rôle protecteur contre les infections par le virus de la vaccine⁷⁹ et du RSV. En revanche, la signalisation médiée par le TLR4 semble favoriser la réplication du MMTV chez la souris, la synthèse d'IL-10 permettant au virus de persister indéfiniment⁸⁰. Une autre étude a suggéré qu'après un challenge avec le virus inactivé de la grippe aviaire H5N1, l'axe TLR4-TRIF-TRAF6 contribue au stress oxydatif et à une inflammation préjudiciable du poumon. En conséquence du knock-down du TLR4 ou de TRIF, les souris ne présentent pas de lésion pulmonaire aiguë⁸¹. Conformément à ce rapport, une étude a constaté que les souris déficientes pour le TLR4 sont protégées contre l'infection létale du virus de la grippe H1N1 par rapport aux témoins⁸².

➤ TLR7/8

Ces TLRs sont membres de la famille des récepteurs intracellulaires, reconnaissant les ARNs simple brin viraux (ARNsb). Le TLR7 et 8 sont notamment capables de détecter les ARNs riches en guanine et uridine du génome du virus d'immunodéficience humaine (HIV), du virus de la grippe, du virus de Sendai, du VSV, des coronavirus et flavivirus (HCV et virus de la Dengue).

L'engagement du TLR7 en réponse aux ARNs, est critique pour la production des IFNs de type I dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs), où il s'exprime de façon prédominante. Le TLR8 quant à lui entrainera principalement l'activation de NF-κB et par conséquent l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques myéloïdes (mDCs).

Résident des endosomes, l'engagement de ces récepteurs nécessite que les ARNs soient délivrés au niveau du compartiment endosomal. Trois voies ont été décrites. La voie exogène, dépendante de l'endocytose et de la dégradation des virions médiée par les protéases⁸³. Cependant, pour les virus qui pénètrent par fusion membranaire, une seconde voie existe. Les ARNs cytoplasmiques sont alors transportés aux endosomes via le lysosome lors de l'autophagie. Des chercheurs ont récemment décrit une troisième voie, en démontrant

que les cellules infectées par le VHC secrètent des exosomes contenant l'ARN de ce virus, lesquels transfèrent cet ARN immunostimulateur à des cellules spécialisées pour la production d'IFN, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) qui, en réponse, produisent de l'IFN⁸⁴.

➤ TLR9

Le TLR9 reconnaît les ADNs possédant des motifs CpG non-méthylés⁶⁸. Ces caractéristiques bien spécifiques sont déterminantes pour la dissociation entre l'ADN de l'hôte et celui étranger. En effet, le contenu en dinucléotides CpG est plus élevé chez les microorganismes que chez l'ADN des vertébrés et ces motifs sont hautement méthylés chez ces derniers en comparaison aux ADN bactériens ou viraux. De plus, la compartimentalisation du TLR9 au niveau des endosomes facilite l'interaction avec les ADNs étrangers et diminue donc le risque de rencontre avec l'ADN du « soi » empêchant ainsi le développement de maladies auto-immunes.

Ce récepteur est principalement exprimé par les pDCs, et son engagement conduit à la production des IFNs de type I et des cytokines pro-inflammatoires, de façon identique aux TLR7 et 8.

Des études ont démontré l'importance du TLR9 dans la reconnaissance de certains virus à ADN double brin tels que le MCMV, le HSV-1 et -2 et les poxvirus. Des mutations dans le domaine extracellulaire du TLR9 abolissent sa capacité à reconnaître les motifs cCpG après infection par le MCMV. En outre, en réponse à ce même virus, les pDC provenant de souris knock-out pour le TLR9 sont incapables de monter une réponse IFN- α robuste⁸⁵. De même, les souris présentant des altérations génétiques dans le gène du TLR9, ont perdu la capacité à sécréter les IFN de type I, d'activer les cellules NK, et sont très sensibles à l'infection⁸⁵. La reconnaissance, par le TLR9, des ARNs est quant à elle moins certaine, seulement quelques études ont suggéré un rôle de ce TLR dans la détection des parvovirus.

➤ TLR3

Exprimé au niveau de la membrane des endosomes des DCs conventionnelles, des macrophages mais également en surface de certains fibroblastes et cellules épithéliales, ce récepteur est impliqué dans la reconnaissance des ARNs bicaténaires (ARNdb)⁸⁶. Ces ARNs, véritable signature moléculaire, peuvent constituer le génome de virus ou sont produits en tant qu'intermédiaire répliatif au cours de leur cycle de vie. En tant que tel, le TLR3 est capable de détecter les infections par des virus à ARNdb, à ARNs et à ADN. La voie de

signalisation du TLR3 est également stimulée par un analogue synthétique des ARNdb, le Poly(I :C), utilisé dans la plupart des études comme agoniste de TLR3⁸⁶. Des souris knock-out pour le TLR3 ont ainsi montré une hypersensibilité aux infections du MCMV et HSV-2, avec une forte réplication virale concomitante avec une incapacité à produire les IFNs de type I^{85, 87}. Des études similaires ont été réalisées avec des virus à ARN, démontrant ainsi l'implication de ce récepteur dans la lutte contre l'EMCV⁸⁸, le Coxsackie B3 ou B4⁸⁹. Par ailleurs, l'activation du récepteur TLR3 peut parfois conférer un effet adverse pour l'hôte et participer à la pathogenèse virale en provoquant notamment une réponse inflammatoire exacerbée⁹.

2) Voies de signalisation en aval des TLRs

Les voies de signalisation activées par les TLRs suite à la liaison d'un PAMP sont généralement déterminées par le TLR et la protéine adaptatrice qui se lie au domaine cytoplasmique du récepteur. Les deux adaptateurs clés sont Myd88 et TRIF⁹⁰. La plupart des TLRs, qu'ils soient à la surface de la cellule ou dans les endosomes se lient à Myd88. Par contraste, le TLR3 lie l'adaptateur alternatif TRIF. Le TLR4 est quant à lui unique, car il peut aussi bien lier Myd88 (quand il est dans la membrane plasmique, provoquant son endocytose) que TRIF (quand il est dans les endosomes après internalisation). Trois autres adaptateurs, MAL (ou TIRAP), TRAM et SARM participent également à la signalisation en aval de ces récepteurs⁹⁰. Contrairement aux autres adaptateurs, SARM fonctionne comme un régulateur négatif spécifique des voies de signalisation en aval du TLR3 et 4, en liant TRIF et inhibant ainsi sa fonction⁹¹. L'engagement de ces récepteurs initie des voies de signalisation activant les voies NF- κ B, MAPK et dans certains cas celle des IRFs (Figure 4).

a) Voie de signalisation dépendante de Myd88

Après activation, Myd88 est recruté via son domaine de transduction TIR au niveau des dimères de TLRs ou dans la cas du TLR2 et 4, par l'intermédiaire de l'adaptateur MAL⁹². En effet, contrairement à MyD88, MAL possède un domaine de liaison pour un composé de la membrane plasmique, le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2). C'est via ce domaine que MAL interagit avec PIP2, ce qui facilite le recrutement de MyD88 à la membrane⁹³. Via son domaine de mort (Death Domain, DD), Myd88 recrute alors la kinase associée au récepteur de l'IL-1 (IRAK)-4⁹⁴. IRAK4 quant à elle active d'autres kinases de la famille

IRAK : IRAK1 et 2^{95, 96}. Ce complexe ainsi formé se dissocie alors de Myd88 et interagit dans le cytoplasme avec l'E3 ubiquitine ligase TRAF6. Après sa dimérisation, TRAF6 va catalyser la formation de chaînes de poly-ubiquitine de type K63 sur elle-même et sur IRAK1, et c'est au niveau de ces chaînes que se fera le recrutement des complexes kinase TAK (constitué des kinases TAK1 (*TGF-β*-activated kinase 1), ainsi que des protéines TAB 1/2/3 (TAK1 binding 1/2/3)) et IKK^{96, 97, 98}. Cet ancrage permet l'activation enzymatique du complexe TAK par autophosphorylation⁹⁹. Parallèlement, un autre complexe kinase IKK est recruté au niveau de ces chaînes d'ubiquitine via sa sous-unité NEMO¹⁰⁰. L'activation de ce complexe nécessite la phosphorylation de sa sous-unité catalytique *IKKβ* par le complexe TAK ou par trans-autophosphorylation. Le complexe IKK ainsi activé peut phosphoryler l'inhibiteur de NF-κB IκBα permettant son ubiquitination de type K48 puis sa dégradation par le protéasome. Les sous-unités NF-κB sont libérées et transloquent dans le noyau afin d'activer la transcription de leurs gènes cibles¹⁰¹. TAK1 est également responsable de la phosphorylation de la MAP kinase kinase 6 (MKK6), conduisant ainsi à l'activation d'un autre facteur de transcription AP-1 (dimère de Fos et Jun), permettant la synthèse de cytokines^{1, 9, 90}.

En plus d'activer les voies NF-κB et MAPK par la voie dépendante de Myd88, les TLRs endosomaux 7,8 et 9 déclenchent une voie activant les IRFs^{1, 9, 90}. Une fois engagé par les TLRs, le complexe Myd88/IRAK4/TRAF6 active un complexe contenant TRAF6/IRAK1/IKKα conduisant à la phosphorylation, dimerisation et la localisation nucléaire d'IRF7^{102, 103}. Ce facteur de transcription pourra alors activer la transcription des gènes codant pour les IFNs de type I.

b) Voie de signalisation dépendante de TRIF

Suite à la détection de l'ARNdb, le TLR3 recrute une autre molécule adaptatrice : TRIF via une interaction homotypique de leur domaine TIR respectif⁹⁰. Le TLR4, quant à lui est également capable d'initier la voie de signalisation TRIF-dépendante, en plus de celle dépendant de Myd88^{1, 9, 90}. Alors que le TLR3 peut s'associer directement avec TRIF, le TLR4 requiert la présence de TRAM afin d'engager TRIF⁹⁰. Comme c'est le cas pour MAL, TRAM s'associe également à la membrane plasmique. Cependant, contrairement à MAL, cette interaction dépend de la myristoylation de son extrémité N-terminale¹⁰⁴. De plus, son

activation est dépendante de sa phosphorylation par la protéine kinase $C\epsilon^{105}$.

TRIF interagit directement, par son domaine C-terminal, avec la protéine TRAF6¹⁰⁶ et via son domaine N-terminal, avec la kinase RIP1 (receptor interacting protein 1). Cette protéine, également impliquée dans l'activation de NF- κ B par les récepteurs au TNF, forme un complexe avec TRAF6. Le complexe RIP1/TRAF6 ainsi formé active la kinase TAK1 et par conséquent l'activation de NF- κ B via une signalisation identique à MyD88.

Par ailleurs, TRIF interagit avec TRAF3, pour activer les kinases TBK1 et IKK ϵ ^{106, 107}. L'activation de ces kinases nécessiterait l'assemblage d'un imposant complexe, nommé ici TIAC (TBK1/IKK ϵ activating complex), comprenant les protéines TANK, NAP1, NEMO/IKK γ et SINTBAD^{108, 109}. TBK1 et IKK ϵ activées, phosphorylent alors les facteurs de transcription IRF-3 et IRF-7 qui vont ainsi se dimériser et migrer dans le noyau pour activer la transcription d'IFN- α/β en se fixant sur des séquences IRE/ISRE.

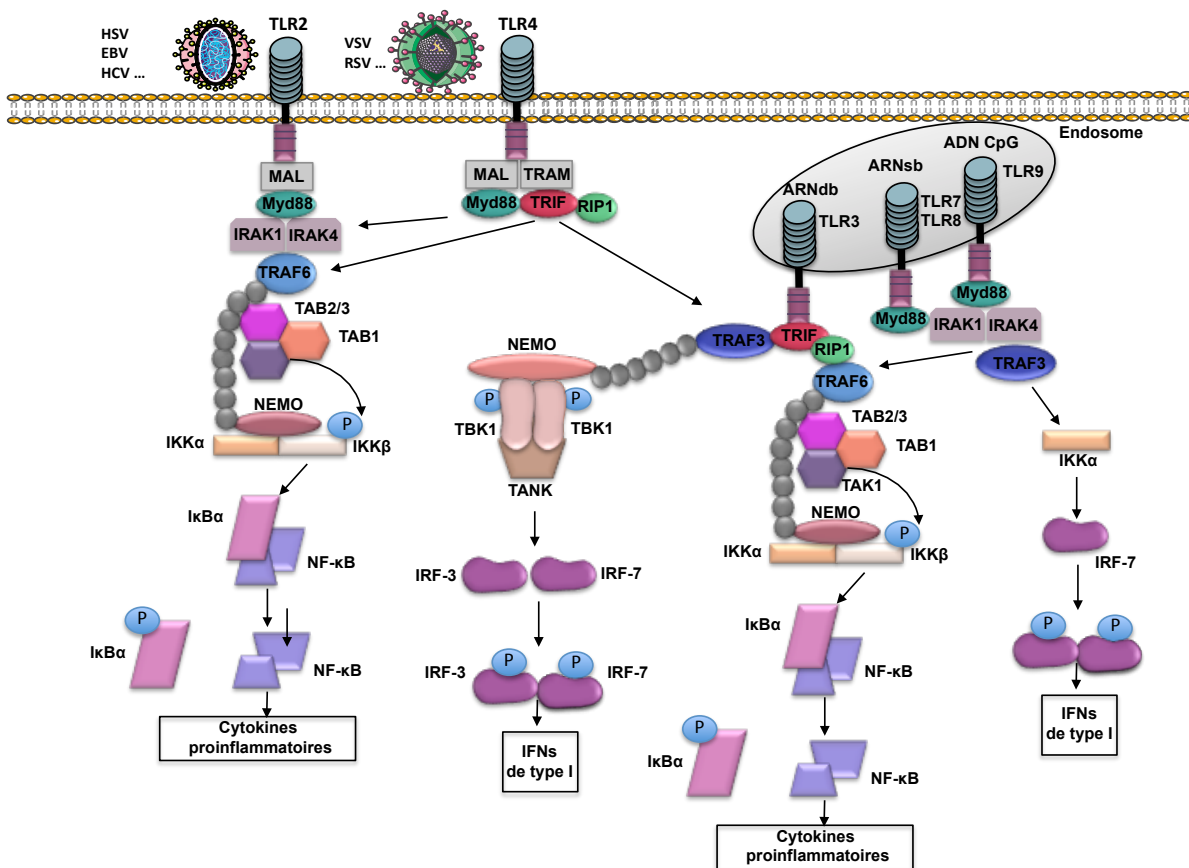


Figure 4 : Voies de signalisation des TLRs antiviraux

3. Détection des acides nucléiques viraux dans le cytosol

La stimulation des TLRs n'explique pas toutes les réponses antivirales innées. En effet, une induction des molécules de costimulation CD80 et CD86 à la surface des DCs a été observée en réponse au Poly(I:C) chez des doubles mutants MyD88 et TRIF KO pour lesquels toute stimulation via les TLRs était abolie. De plus, le domaine des TLRs permettant la reconnaissance des ligands est tourné vers le lumen des endosomes, les rendant « aveugles » aux pathogènes ayant envahi le cytoplasme des cellules. En outre, la plupart des cellules n'appartenant pas au système immunitaire, telles que les cellules épithéliales et les fibroblastes qui tapissent la surface des muqueuses, zones sensibles aux infections, n'expriment pas de TLRs mais peuvent néanmoins activer des réponses immunitaires innées efficaces. Ces données ont permis de suggérer l'existence de senseurs intracellulaires d'acides nucléiques dont l'activation, indépendante des TLRs, aboutit également à la production d'IFN de type 1 et de cytokines.

1) Reconnaissance des ARNs viraux par les RLRs

C'est par une approche fonctionnelle, via la recherche d'ADNc (ADN complémentaire) capable d'activer un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un promoteur inductible par les IFNs de type I, que la protéine RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene I, ou DDX58) a été identifiée¹¹⁰. La recherche, dans les banques de données, d'autres protéines possédant un domaine hélicase semblable à celui de RIG-I a permis d'identifier MDA-5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5, également nommé helicard ou IFIH1) et LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2), comme des PRRs cytoplasmiques d'acides nucléiques et plus précisément des ARNs viraux, appartenant à la famille des RLRs¹¹¹.

Ces ARN hélicases partagent une forte homologie de séquence et de structure, incluant un domaine central hélicase à ARN, ATP-dépendant (DEAD box hélicase/ATPase) et un domaine régulateur en C-terminal (CTD)¹¹¹. En position N-terminal de RIG-I et MDA5, mais pas celle de LGP2, on retrouve deux domaines CARD, domaines effecteurs traduisant le signal lorsque la molécule est activée¹¹¹.

a) RIG-5 et MDA5 : spécificité de ligands

Les deux hélicases, RIG-I et MDA5, répondent à l'analogue synthétique des ARNdb, le Poly(I:C), mais avec des tailles différentes. MDA5 reconnaît de longs fragments (> 4kb)

alors que RIG-I détecte préférentiellement de petits fragments (~300 bp), générés par digestion enzymatique¹¹². Du fait de cette spécificité, ces deux senseurs, sont impliqués dans la détection de virus différents¹¹³. RIG-I est ainsi connu pour reconnaître des virus de la famille des Paramyxoviridae (virus de Sendai et virus de la maladie de Newcastle), des Flaviridae (Virus de l'encéphalite japonaise et HCV) et la famille des Rhabdoviridae (VSV)^{112, 113, 114}. En effet, la surexpression de RIG-I permet aux cellules infectées par le VSV de résister à des doses plus élevées de virus. Ces résultats ont été confirmés en utilisant des fibroblastes isolés de souris dans lesquels le gène RIG-I était inactivé : ces cellules deviennent plus susceptibles à une infection par le VSV et ne produisent pas d'IFN de type I après infection au virus de Sendai¹¹⁰. MDA5 reconnaît quant à lui des virus de la famille des Picornaviridae (Virus de la polio, EMCV)^{113, 115}.

En utilisant différentes approches, plusieurs groupes ont découvert que la caractéristique moléculaire la plus importante pour la reconnaissance de l'ARN par RIG-I est un groupe triphosphate à l'extrémité 5'^{166, 116}. De plus, cette extrémité 5'ppp doit être adjacente à une région d'ARN double brin pour activer ce récepteur^{117, 118}. Enfin, RIG-I est capable de détecter de petits ARNs aux extrémités 3' phosphorylées (3'p) et 5' hydroxylées (5'OH), produit du clivage d'ARNsb par l'endonucléase RNase L¹¹⁹. En effet, lorsque la 2'-5'-oligo adénylate synthétase (OAS), protéine induite par l'interféron α/β , est activée par des ARNdb d'origine virale, elle polymérise l'ATP pour synthétiser des oligomères appelés 2-5A. Les molécules 2-5A activent une forme latente de l'endoribonucléase RNase L qui, une fois active, va dégrader les molécules d'ARNsb viraux. Lors d'une infection virale, les agonistes physiologiques de ce récepteur peuvent être donc le génome viral, des intermédiaires de réplication, des transcripts viraux et des produits de clivage de la RNase L.

Contrairement à RIG-I, les ligands de MDA5 sont moins bien caractérisés. MDA5 fonctionnerait comme un senseur des longs ARNdb, tel qu'il peut être activé par de longs Poly(I:C)¹¹². Supportant cette notion, une étude a identifié l'intermédiaire répliatif du picornavirus, un ARNdb de 7,5 kb, comme un ligand physiologique de MDA5¹²⁰. Toutefois une étude antérieure a montré que l'EMCV et le virus de la vaccine, étaient capables de produire des ARNs de haut poids moléculaire durant la réplication/transcription. Ces ARNs composés à la fois d'ARNsb et db, activeraient la production d'IFNs médiée par MDA5¹²¹.

b) Le cas particulier de LGP2

LGP2 est une hélicase cytoplasmique capable de reconnaître les ARNdb, indépendamment de leur longueur et de la présence d'une extrémité 5'ppp¹²². Malgré une haute affinité de liaison à l'ARN, l'absence d'un domaine CARD, essentiel à la transduction du signal, implique une certaine controverse sur la fonction de ce récepteur. D'après les premières études réalisées, la surexpression de LGP2 régule négativement l'activation des IFNs médiée par RIG-I suite à une infection par le virus de Sendai, et inversement son inactivation chez des souris invalidées semble améliorer l'expression des IFNs¹²³. Sur la base de ces résultats, et en l'absence d'un domaine CARD, LGP2 a été initialement décrit comme un régulateur négatif pour la signalisation RIG-I/MDA5. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette inhibition (Figure 5). Grâce à sa capacité de liaison à l'ARN, LGP2 pourrait entrer en compétition avec RIG-I et/ou MDA5 pour la reconnaissance de leurs ligands¹¹¹ (Figure 5A). Toutefois, des protéines LGP2 défectueuses pour la liaison à l'ARN peuvent toujours inhiber la signalisation RLR¹²². La compétition pour la reconnaissance du ligand n'explique donc pas l'effet inhibiteur de cette hélicase. Par ailleurs, LGP2 est capable de s'associer à RIG-I, via une interaction homotypique de leur domaine RD, et d'inhiber son homodimérisation nécessaire à la transduction du signal¹²⁴ (Figure 5B). Une étude indique également que LGP2 peut inhiber les réponses antivirales, indépendamment des ARNs ou intermédiaires viraux, en interagissant, de manière CARD-indépendante, avec MAVS (Figure 5C). En effet, LGP2 entre en compétition avec une kinase pour la liaison avec MAVS, inhibant ainsi la signalisation en aval de cet adaptateur moléculaire¹²⁵. Contrairement à ces exemples de régulation négative par LGP2, un autre modèle de souris transgéniques ayant le gène LGP2 inactivé, a indiqué un rôle positif de cette hélicase pour la signalisation antivirale. Ces souris sont en effet plus sensibles aux infections des Picoravirus (notamment l'EMCV et le poliovirus), deux virus supposés être reconnus par MDA5 contrairement à RIG-I¹²⁶. Un nombre croissant d'études soutient l'idée d'une synergie entre le senseur LGP2 et la protéine de signalisation MDA5¹²⁷. Une étude en particulier, montre qu'à des concentrations relativement faibles, LGP2 participe à l'activation de MDA5. Toutefois, à dose élevée, cette même hélicase présente un rôle inhibiteur vis à vis de cette même protéine (Figure 5D). Ainsi, au début d'une infection, LGP2, présent en faible quantité, améliore la signalisation antivirale médiée par MDA5, en facilitant et modulant les interactions MDA5/ARN. La progression de l'infection et par conséquent la production d'IFN de type I, active l'expression de LGP2

provoquant son accumulation dans la cellule. Ceci entraîne une inhibition de la signalisation activée par MDA5, fournissant une boucle de rétrocontrôle négative¹²⁸.

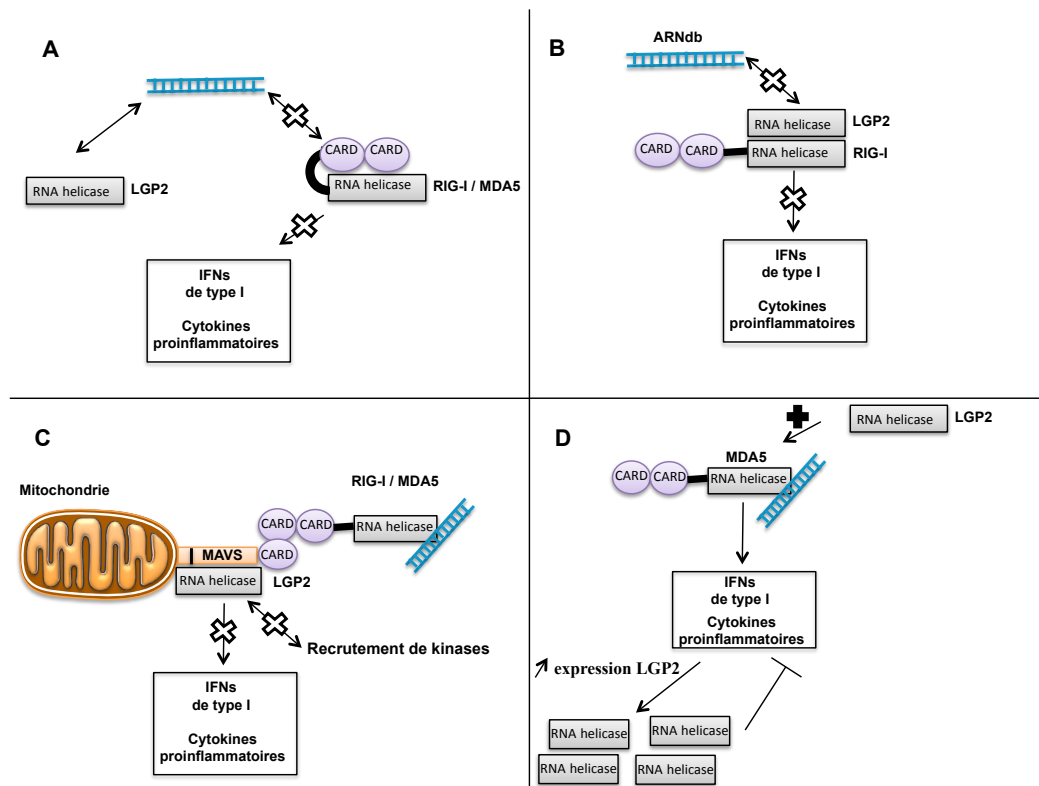


Figure 5 : Hypothèses de régulation de la signalisation des RLRs par LGP2

c) Activation et signalisation en aval des RLRs

La surexpression du domaine N-terminal de RIG-I, contenant seulement les domaines CARDS, induit constitutivement la production d'IFN- β . L'hypothèse émise est donc que ces domaines sont séquestrés par des interactions intramoléculaires jusqu'à ce que le ligand l'active, entraînant un changement de conformation, libérant ainsi les domaines de signalisation. À partir d'études fonctionnelles et structurales, un modèle d'activation a alors été proposé (Figure 6). En l'absence de ligand, ce capteur adopte une conformation auto-inhibitrice, où l'interaction intramoléculaire entre CARD2 et le domaine hélicase empêche tout signal d'être transmis¹²⁹. La reconnaissance du motif 5'ppp d'un ARNdb par le CTD de RIG-I induit un changement de conformation ATP-dépendant, permettant la liaison du ligand au domaine hélicase et la libération des domaines CARDS¹³⁰.

D'importants progrès ont également été réalisés quant à la compréhension du mécanisme structural de reconnaissance des ARNs par MDA5. Ce récepteur forme des filaments en tête à queue sur les ARNdb, en utilisant des contacts protéine-protéine, lui permettant de s'accumuler le long de cet acide nucléique, et ainsi former ces structures particulières (Figure 6). La stabilité de ce filament est régulée par l'hydrolyse de l'ATP, qui déclenche la dissociation de MDA5 de l'ARNdb. Les domaines CARDS, se trouvant à l'extérieur de ces filaments, peuvent s'oligomériser en une structure permettant l'activation de la signalisation en aval¹³¹.

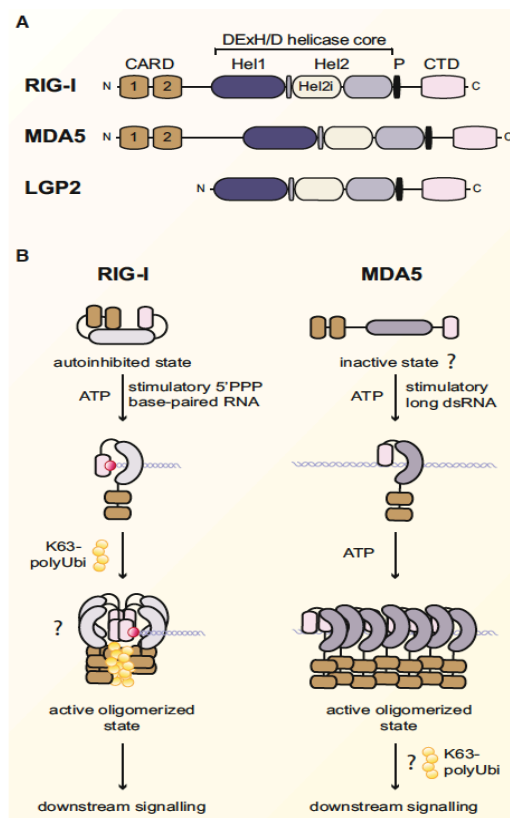


Figure 6 : Structure et mécanisme d'activation des RLRs¹³²

Une fois activés, les RLRs se lient à une molécule mitochondriale adaptatrice, appelée MAVS, via une interaction homotypique des domaines CARDS^{133, 134, 135, 136}. Cette interaction conduit à la formation de larges agrégats de MAVS, agissant comme des Prions, capables de produire des protéines MAVS endogènes en agrégat fonctionnel¹³⁷. Cette protéine peut alors recruter via son domaine C-terminal, certains membres de la famille TRAF¹³⁸. D'une part, l'engagement de TRAF3 va permettre d'activer la protéine kinase TBK1 et son homologue

IKK ϵ . L'activation de ces kinases se fait par transphosphorylation et nécessite l'implication de l'ubiquitination non dégradative dite K63 ainsi que l'assemblage d'un complexe comprenant les protéines NEMO, TANK, NAP1 et SINTBAD^{108, 109}. Le complexe de kinases TBK1/IKK ϵ , phosphoryle alors IRF3 et IRF7 induisant un changement de conformation, la dimérisation et par la suite la translocation de ces facteurs de transcription dans le noyau permettant la transcription des gènes codant les IFN α/β ^{132, 139} (Figure 7). Il est cependant important de noter que désormais l'implication de TRAF3 dans la signalisation en aval de MAVS est remise en cause, notamment par l'équipe de ZJ Chen¹³⁸. D'autre part, l'engagement de TRAF6, qui complexé à la kinase TAK1 et aux protéines associées TAB2 et 3, conduit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B responsable de la production de cytokines pro-inflammatoires^{132, 139} (Figure 7).

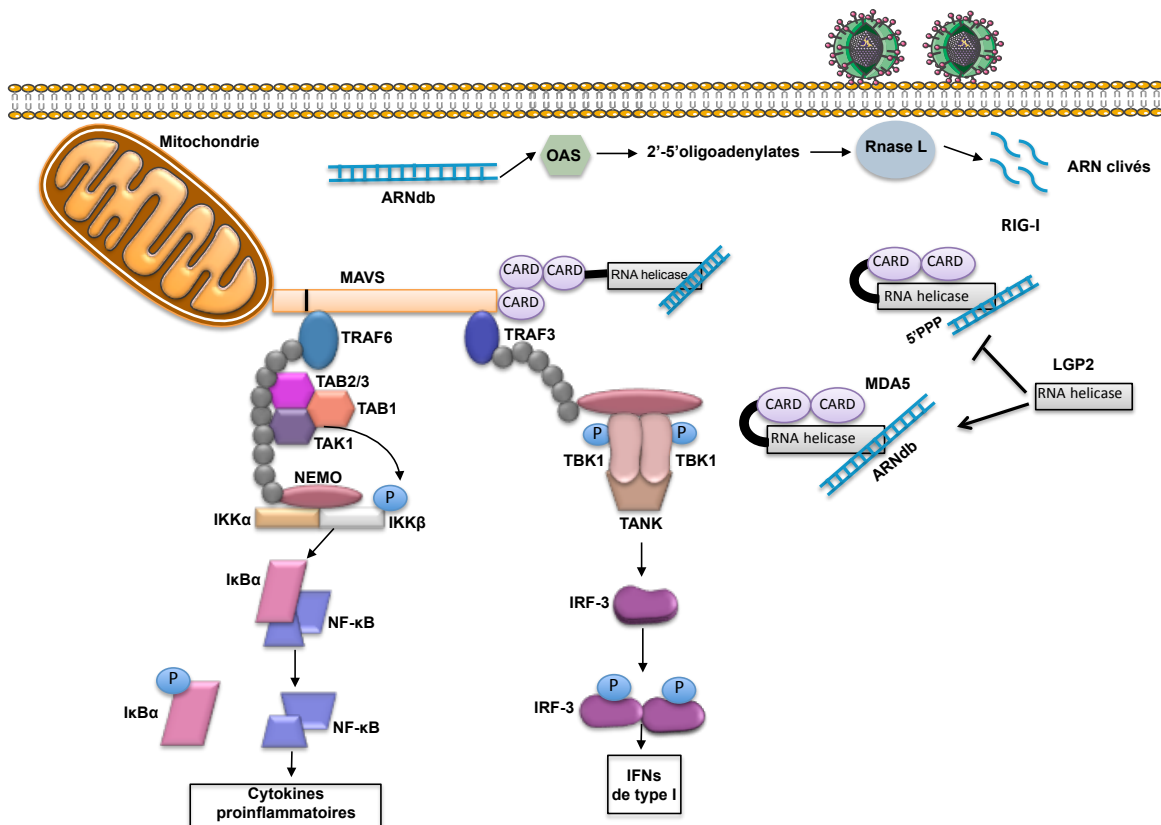


Figure 7 : Voies de signalisation des RLRs

2) Reconnaissance des ADNs viraux

De nombreuses études ont montré que l'introduction d'ARNdb dans le cytosol des cellules induit la production d'IFNs de type I indépendamment des TLRs, suggérant ainsi l'existence de senseurs cytosoliques de ces acides nucléiques. C'est en 2007 qu'une équipe de chercheurs décrit DAI (DNA-dependent activator of IRFs) comme le premier senseur capable d'induire une réponse IFNs suite au recrutement et à l'activation de TBK1 et IRF3¹⁴⁰. Bien que le recrutement et l'activation d'IRF3, conduisant à l'activation des IFNs, soit un fait avéré, les voies de signalisation en amont sont restées méconnues jusqu'à la découverte de l'adaptateur moléculaire STING.

a) Rôle central de STING dans le contrôle de la détection d'ADN

En parallèle des études qui ont conduit à la caractérisation des premiers senseurs d'ADN putatifs, un nouvel adaptateur moléculaire, appelé STING, a été découvert en 2008¹⁴¹. Cette protéine est ancrée, via 4 régions transmembranaires résidant dans sa région N-terminale, dans le réticulum endoplasmique (RE) de cellules non stimulées¹⁴¹.

Mise à part l'activation du TLR9 par les CpG, peu de choses étaient connues quant à la production des IFN de type I et des autres cytokines par les ADNs viraux et bactériens. Une avancée importante est survenue quand il a été observé que les cellules dépourvues de STING, étaient insensibles à la production de cytokines après une exposition à un large éventail d'ADN (viral, plasmidique, génomique, apoptotique et nécrotique) ou à des agents pathogènes tels que l'HSV-1 et *listeria monocytogenes*. Inversement, la surexpression de STING, conduit à l'activation des facteurs de transcription IRF3 et NF- κ B et par conséquent à la production des IFN de type I et de nombreuses cytokines, respectivement^{141, 142}.

Le mécanisme par lequel cette protéine recrute TBK1 afin d'activer IRF3 a été déterminé bien que la façon précise dont STING active NF- κ B (probablement par IKK β), reste à ce jour une question ouverte. La reconnaissance d'ARNdb, possible par un certain nombre de senseurs, conduit à l'activation de STING. Une fois activée, elle va alors subir une relocalisation du réticulum endoplasmique (RE) à l'appareil de Golgi, où elle s'assemble en structure ponctuée contenant la protéine kinase TBK1^{142, 143} (Figure 8). L'extrémité carboxyle de STING (CTT), contenant seulement 39 acides aminés, est nécessaire et suffisante pour activer TBK1 et pour recruter IRF3 à TBK1¹⁴⁴.

En plus de sa fonction de molécule signalisatrice, STING est capable de senser certaines structures et d'induire une réponse IFNs. Ainsi, cette protéine s'associe avec des seconds messagers dénommés, dinucléotides cycliques (CDNs), sécrétés par des bactéries intracellulaires telle que *Listeria Monocytogenes*¹⁴⁵ (Figure 8). Ces activateurs peuvent prendre la forme de la Guanosine 3'5' monophosphate cyclique (c-di-GMP) et de l'adénosine 3'5'monophosphate cyclique (c-di-AMP). De plus, une étude récente suggère que STING peut fonctionner directement comme un senseur d'ADN, avec une affinité moindre comparée à cGas¹⁴⁶. En outre, la reconstitution de cellules n'exprimant pas de façon endogène cette protéine, restaure la production d'IFN- β en réponse aux CDNs mais non aux ADNdb, suggérant ainsi que STING à elle seule ne permet pas la détection de l'ADN.

b) De multiples senseurs d'ADN putatifs

Depuis la découverte que l'ADN pouvait induire une réponse immunitaire via le recrutement de STING, TBK1 et IRF3, en l'espace de quelques années, un nombre croissant de récepteurs a été proposé comme participant à ce processus.

De manière surprenante l'une des premières voies de détection d'ADN décrite impliquait RIG-I et MAVS. En effet, l'ARN polymérase III (ARN Pol III) est capable de transcrire des ADNdb riches en AT, tel que le Poly(dA:dT), en petits ARNs avec une extrémité 5' triphosphate, connus pour être les ligands de RIG-I. Une fois ces ARNs détectés par RIG-I, celui-ci active sa voie de signalisation, impliquant MAVS, et conduisant notamment à la production des IFNs de type I^{147, 148} (Figure 8).

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs hélicases telles que RIG-I et MDA5, ont été identifiées comme des senseurs d'acides nucléiques, mais DHX9 et DHX36 ont été les premières impliquées dans la reconnaissance des ADNs cytoplasmiques dans les cellules dendritiques plasmacytoides. DHX36 est ainsi associée à la production d'IFN α , via la translocation nucléaire d'IRF7, en réponse à l'ADN CpG-A, tandis que DHX9 est importante pour l'activation de NF- κ B et par conséquent à la production du TNF- α et l'IL-6 en réponse à l'ADN CpG-B¹⁴⁹. Une étude utilisant des knock-out pour Myd88, démontre que ces hélicases initient leur signalisation en se liant au domaine TIR de cet adaptateur, après que toutes réponses aux CpG-A et -B aient été abolies dans ces souris¹⁴⁹. Notons également que DHX9 est impliqué dans la reconnaissance des ARNdb dans les mDC depuis que le knock-down par shRNA de cette hélicase montre sa nécessité dans la production d'IFN de type I et de

cytokines pro-inflammatoires en réponse au Poly(I:C), au virus influenza A et au réoviridae¹⁵⁰. Afin d'identifier l'implication d'éventuelles autres hélicases dans l'immunité innée, le groupe de Yong-Jun Liu a effectué un crible d'une banque de siRNA dirigés contre 59 membres de cette famille. Ils ont alors constaté une altération de la production des IFNs et des cytokines pro-inflammatoires suite à la stimulation des DC murines ou des monocytes humains, déficients pour DDX41, avec de l'ADNdb et le virus HSV-1. Conformément à son rôle de senseur d'ADN, DDX41 interagit avec STING et TBK1 pour une signalisation optimale¹⁵¹ (Figure 8). De plus il a été suggéré que DDX41 peut lier directement les dinucléotides cycliques bactériens (CDNs), à savoir la Guanosine 3'5' monophosphate cyclique (c-di-GMP) et l'adénosine 3'5'monophosphate cyclique (c-di-AMP). Ces seconds messagers agissent comme des PAMPs qui signalent la présence d'une infection bactérienne intracellulaire et induisent donc une réponse IFN de type I. Suite à la liaison de ces CDNs, DDX41 induit une réponse IFN via une signalisation dépendante de STING-TBK1-IRF3¹⁵².

IFI16, protéine appartenant à la famille des PyHIN, s'est avérée jouer un rôle dans la reconnaissance des ADNdb. Il a été montré que l'inhibition du senseur IFI16 diminuait la réponse IFN- β induite par de l'ADNdb et par une infection par le HSV-1, alors que celle de virus à ARN n'était pas modifiée¹⁵³. L'induction des IFNs nécessite l'engagement de la protéine adaptatrice STING et l'activation subséquente de TBK1. Bien que ce senseur soit principalement nucléaire, une partie du pool d'IFI16 se localise dans le cytoplasme lors d'une infection virale ou bactérienne. Il a en fait été démontré qu'en fonction de l'état d'acétylation de sa séquence de localisation nucléaire, IFI16 faisait la navette entre le cytoplasme et le noyau, deux compartiments où il est capable de reconnaître les ADNs¹⁵⁴. D'autre part, il est apparu qu'en réponse à une infection par le virus du sarcome de Kaposi, IFI16 pouvait médier des réponses inflammatoires. L'infection conduit à une augmentation de la colocalisation nucléaire d'IFI16 avec ASC, suivie par la migration de ces deux facteurs dans la région périnucléaire¹⁵⁵. Depuis sa capacité à induire l'inflammasome a été étendue à l'HSV-1 et à l'EBV^{156, 157}.

Certaines protéines, connues pour jouer un rôle dans les réponses aux dommages à l'ADN dans le noyau ont également été impliquées dans la reconnaissance des ADNs cytosoliques. Ces protéines peuvent directement reconnaître les ADNs viraux, indépendamment de leur premier rôle, et/ou peuvent être mobilisées pour stimuler une réponse immune en réponse aux dommages de l'ADN cellulaire induit par les virus. La protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK) est un complexe hétérotrimérique, composé des protéines Ku 80 et Ku 70 et d'une unité catalytique, la DNA-PKcs. Bien qu'impliqué dans

les processus de réparation d'ADN, ku70 joue également un rôle dans la détection des ADNdb supérieurs à 500 pb, déclenchant ainsi la production d'IFN de type III IFN (IFN λ 1), plutôt que les IFN de type I, via l'activation d'IRF1 et -7¹⁵⁸. Un an plus tard, à son tour la DNA-PK a été identifiée comme un senseur d'ADN, en particulier dans les fibroblastes où associée à l'ADN dans le cytoplasme, elle initie une cascade de signalisation, impliquant STING-TBK1-IRF3, conduisant à la production des IFN de type I. Fait intéressant, bien qu'essentielle à l'activation d'IRF3 après stimulation par de l'ADN ou le virus de la vaccine, la DNA-PK n'est pas requise pour l'activation du facteur de transcription NF- κ B¹⁵⁹. Tout comme les protéines précédentes, Mre11, semble initier des réponses STING-dépendantes, après stimulation par des ADN cytosoliques mais non aux virus à ADN tel que le HSV¹⁶⁰. Enfin, Rad50, en plus de faire partie d'un complexe, composé de Mre11 et Nbs1, détectant les cassures d'ADNdb, cette protéine est impliquée dans les réponses immunitaires après détection des ADNs. Dans ce cas de figure, après infection par le virus de la vaccine, Rad50 transloque dans le noyau, où il prend en charge l'ADN viral et initie une voie de signalisation indépendante de STING, impliquant CARD9 et Bcl-10. Cela conduit à l'activation de NF- κ B, et plus particulièrement l'induction de l'ARNm de la pro-IL-1b¹⁶¹ (Figure 8).

c) cGas, le senseur clé d'ADN exogène

Comme vu précédemment, un certain nombre de senseurs d'ADN putatifs ont été décrits, avant l'identification de cGas (cyclic-GMP-AMP (cGAMP) synthase). Cependant, de façon universelle, aucun d'entre eux n'a été accepté comme le senseur d'ADN majeur. Il reste toutefois possible que chaque senseur alors décrit puisse fonctionner différemment en fonction du type cellulaire, le niveau d'expression ou la séquence d'ADN.

En utilisant d'élégantes stratégies de purification et reconstitution biochimiques, le laboratoire de Zhijian James Chen, a identifié un dinucléotide cyclique, le cGMP (cyclic-GMP-AMP), comme un second messager généré par les cellules après la transfection d'ADN ou après infection par des virus à ADN¹⁶². Des expériences de spectrométrie de masse quantitatives couplées à des purifications biochimiques ont quant à elles permis d'identifier cGas, comme senseur d'ADN, synthétisant cGAMP après reconnaissance de son ligand¹⁶³.

cGas, dans sa structure globale, ressemble à la protéine liant les ARNdb, OAS1, avec des modifications dans sa région de liaison aux nucléotides, spécifiant son affinité pour les ADNdb plutôt que les ARNdb^{164, 165}. L'activation de l'enzyme se produit en réponse à la

liaison de l'ADN à cGas, provoquant un changement de conformation, permettant l'accès des substrats au niveau du site actif et par conséquent à la synthèse de cGAMP. Le cGAMP ainsi synthétisé est unique en son genre, puisqu'il contient deux liaisons phosphodiester particulières : l'une entre le 2'OH du GMP et le 5' phosphate de l'AMP et l'autre entre le 3'OH de l'AMP et le 5' phosphate du GMP, lui valant sont nom de 2'3'-cGAMP^{166, 167, 168}. D'importants éléments de preuves indiquent que cGas est le senseur d'ADN cytosolique, longtemps recherché, activant STING par la synthèse de 2'3'-cGAMP (Figure 8). Premièrement, des expériences biochimiques ont démontré que la protéine cGas purifiée est capable de lier directement l'ADN¹⁶³. Deuxièmement, la surexpression de cette protéine donne lieu à l'activation d'IRF3 et l'induction d'IFNs de type I, seulement dans les cellules exprimant STING, avec un ordre de grandeur nettement supérieur à celui induit par les autres senseurs d'ADN décrits précédemment¹⁶³. Troisièmement, cGas synthétise cGAMP, en vue de l'activation de STING, uniquement en présence d'ADN. Le rôle essentiel de la synthèse de cGAMP est soutenu par le fait que la surexpression de mutants catalytiquement inactifs de cGas, abolit la production d'IFNs de type I, en dépit de leur capacité à lier l'ADN^{163, 164, 167}. Quatrièmement, cGas est une protéine cytosolique, et lie l'ADN dans ce même compartiment. Enfin, l'importance de la signalisation cGas-cGAMP dans les défenses de l'hôte a été validée par l'étude des cellules et des souris déficientes pour cGas^{169, 170}. Notamment, les fibroblastes primaires et les macrophages issus de la moelle osseuse de souris *Gas*^{-/-} sont incapables de produire des IFNs de type I et toutes autres cytokines en réponse à l'ADN bactérien ainsi que celui provenant de virus tels que le HSV-1, le virus de la vaccine¹⁶⁹ ou le MHV68¹⁷⁰, mais répondent normalement à des virus à ARN tel que le virus de Sendai. C'est également le cas des cellules présentatrices d'antigènes, les cDCs et pDCs. En plus des virus à ADN, les rétrovirus tel que le VIH, ayant pour génome des ARNs, requièrent une rétro-transcription de leur ARN en ADN pour propager leurs infections. Connus pour activer les réponses immunes via IRF3, les senseurs reconnaissant ces virus ne sont cependant pas identifiés. Une étude a alors démontré que l'infection par le VIH active cGas, conduisant à la synthèse de cGAMP, à l'activation de STING et par conséquent à la production d'IFNs de type I et de cytokines. Les cellules primaires humaines (macrophages et DCs) infectées par des isolats cliniques de VIH-1 produisent cGAMP dans des conditions permissives à la réplication virale, soulignant la relevance clinique de la détection du VIH par cGas. Fait intéressant, les inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH, et non ceux de l'intégrase, abolissent la production d'IFNs, indiquant que le rétro-transcrit d'ADN est responsable de la stimulation du système immunitaire. En outre, cGas est responsable de la détection d'autres rétrovirus

comme le virus de la leucémie murine et le virus de l'immunodéficience simienne¹⁷¹.

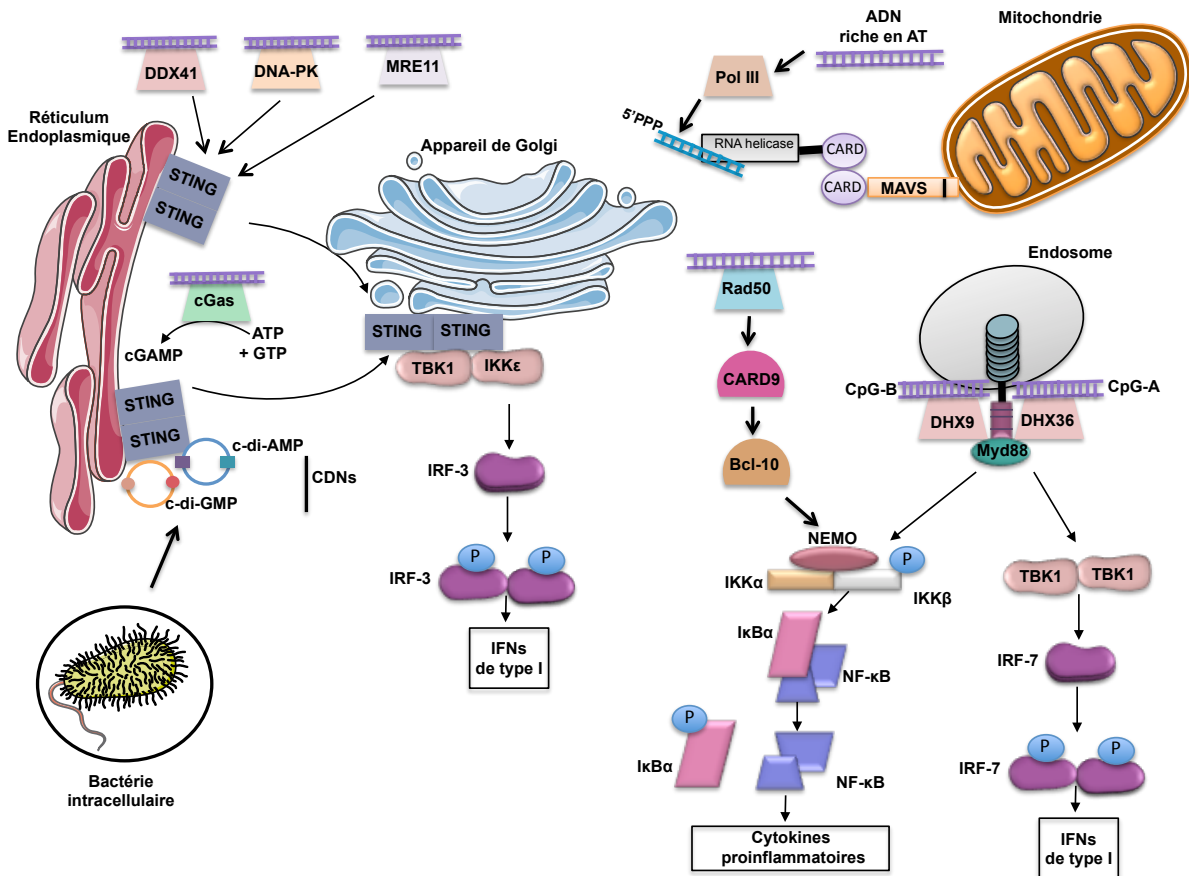


Figure 8 : Voies de signalisation des senseurs d'ADN cytosoliques

d) Les inflammasomes

Alors que la plupart des PRRs engagent les voies classiques de la réponse immunitaire, Martinon et Tschopp ont décrit en 2002, une voie alterne : la voie des inflammasomes¹⁷².

Les inflammasomes sont des complexes supromoléculaires qui se forment dans le cytosol, jouant alors un rôle central dans le maintien de la clairance de ce même compartiment. Ces complexes multimériques comprennent :

- un senseur appartenant à la famille des ALRs ou des NLRs

Le génome humain code pour 22 NLRs mais seulement NLRP-1,-3,-6,-7-12 et le complexe NLRC4/NAIP ont été décrits comme participant à l'élaboration des inflammasomes. Contrairement à la complexité structurale des NLRs (voir partie I.1), la famille des ALRs, composée de AIM2 et IFI16, comprend un domaine PYD et un domaine de liaison à

l'ADNdb, HIN200.

- une protéine adaptatrice : ASC
- un zygomène inactif : la pro-caspase 1

L'activation des inflammasomes requiert la conjonction de 2 signaux.

Signal 1 = Priming

D'une manière générale, ce stimulus peut inclure n'importe quels récepteurs dont la signalisation conduit à l'activation de NF- κ B comme les récepteurs à l'IL-1, les TLRs ou encore les récepteurs cytokiniques TNFR-1 et -2¹⁷³. L'activation de NF- κ B permet d'augmenter à la fois la transcription de la pro-IL-1 β , cette dernière n'étant pas exprimée de façon constitutive, et dans certains cas celle de NLRP3, dont les niveaux de base sont insuffisants pour la formation d'un inflammasome efficace (Figure 9).

Signal 2 : Signal d'activation

Les molécules activant de façon spécifique les NLRs et/ou les ALRs, permettent alors l'assemblage du complexe inflammasome, aboutissant à l'activation de la caspase-1.

Les ALRs, via leur domaine HIN200, peuvent détecter directement les ADNdb. AIM2 reconnaît généralement les ADNdb cytosoliques de virus à ADN tels que le cytomegalovirus murin et le virus de la vaccine, ainsi que celui des bactéries cytosoliques telles que *Francisella tularensis* et *Listeria monocytogenes*¹⁷⁴. En revanche, IFI16, situé dans le noyau, détecte l'ADN du virus de l'Herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV)¹⁵⁵.

Contrairement aux ALRs, activés par l'intermédiaire des ADNdb, les activateurs de la plupart des NLRs restent indéfinis. Pour NLRP3, un inflammasome largement étudié, un grand nombre de molécules activatrices ont été identifiées. Elles incluent de nombreux signaux de danger microbiens, chimiques ou endogènes. L'activation de ce récepteur peut résulter de la présence de cristaux (cholestérol, acide urique), de particules (silice, amiante) ou de protéines anormales (protéine amyloïde, huntingtine). L'ATP extracellulaire (témoin d'un stress cellulaire), les dérivés actifs de l'oxygène, les perturbations de l'homéostasie ionique intracellulaire (K^+ et Ca^{2+}), ou encore des dommages lysosomaux ou mitochondriaux peuvent également entraîner l'activation de NLRP3^{175, 176}. Les mécanismes d'activation (directe ou indirecte) de ces divers signaux avec NLRP3 restent cependant peu clairs. Des avancées dans ce domaine ont cependant été réalisées récemment, dans le cas de l'activation de NLRP3 par

les ARNdb cytosoliques et les ARNs bactériens. En effet une étude a identifié DHX33, comme senseur des ARNdb via son domaine hélicase. Elle interagirait ensuite avec NLRP3 et permettrait ainsi la formation du complexe inflammasome en réponse aux ARNs¹⁷⁷.

Ce deuxième signal conduit à un changement conformationnel qui permet l'interaction des récepteurs avec d'autres protéines du complexe de l'inflammasome. Le PRR interagit, le plus souvent, avec la protéine adaptatrice ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) qui sert de connecteur entre le récepteur et la procaspase-1. L'oligomérisation de cette plateforme (PRR + ASC + procaspase-1) en heptamères permet un rapprochement conformationnel des procaspases-1 et entraîne leur auto-activation par auto-clivage. La caspase-1 activée convertit ensuite la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 en leurs formes actives par clivage des pro-domaines, ce qui déclenche leur sécrétion (Figure 8).

De même, la caspase-1, une caspase non apoptotique, déclenche la pyroptose, une mort cellulaire de type nécrotique inflammatoire¹⁷⁸. La formation de pores dans la membrane cellulaire conduit à une augmentation de la pression oncotique, un afflux d'eau intracellulaire et un gonflement cellulaire. Il en résulte une lyse osmotique de la cellule et le relargage des composants inflammatoires vers le milieu extracellulaire. Un tel processus semble particulièrement important lors des infections par des pathogènes intracellulaires. En effet, la pyroptose permet une destruction précoce de la niche de réplication du pathogène (mort de la cellule) et l'induction d'une inflammation locale, permettant de confiner l'infection.

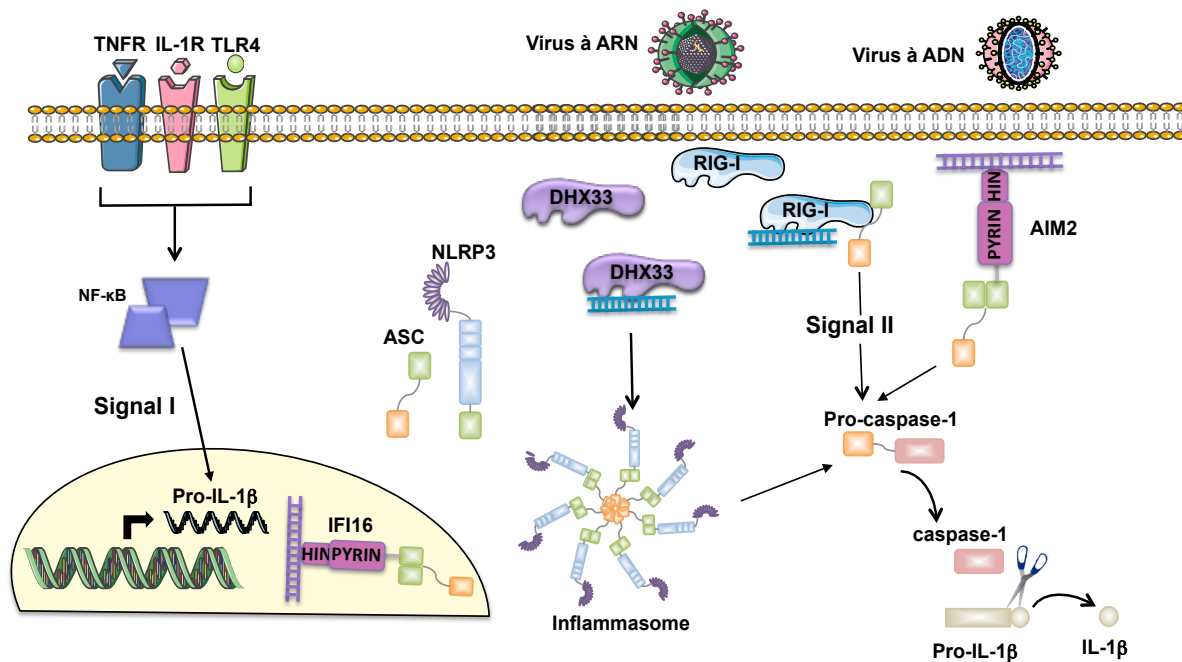


Figure 9 : Voies de signalisation des inflammasomes après infection par les virus

II. Organites et immunité innée

1. Les organites comme plateforme de signalisation cellulaire

1. La mitochondrie

La mitochondrie est un organe unique, non seulement par sa structure à double membranes, mais également parce qu'elle possède son propre génome : un ADN mitochondrial circulaire (ADNmt) codant pour des protéines essentielles pour la fonction respiratoire des mitochondries. La mitochondrie participe également à de nombreux processus cellulaires essentiels tels que l'homéostasie du calcium, le recyclage de l'ADP en ATP impliqué notamment dans la phosphorylation oxydative, l'apoptose, la synthèse des lipides et des stéroïdes ainsi que dans la signalisation cellulaire¹⁷⁹. L'une des découvertes les plus impressionnantes en ce qui concerne les nouvelles fonctions des mitochondries est leur implication dans l'immunité innée antivirale cellulaire. Soupçonnées d'avoir évolué à partir d'une protéobactérie¹⁸⁰, leur rôle nouvellement découvert dans la défense de la cellule hôte était inattendu.

Un lien direct entre les mitochondries et la signalisation antivirale a d'abord été mis en évidence avec l'identification, par quatre groupes indépendants, de MAVS, comme un

adaptateur moléculaire crucial pour la signalisation en aval des RLRs^{133, 134, 135, 136}. Seul le groupe de James Chen identifie MAVS comme une protéine mitochondriale, ancrée à la membrane externe, et détermine que cette localisation est essentielle à sa fonction¹³⁵. Des études ultérieures ont clairement montré que la déficience de MAVS, générée chez des souris Knock-Out ou par des protéases virales, abolit la production des interférons de type I et des cytokines inflammatoires, soulignant alors l'importance du lien entre l'immunité innée antivirale et les mitochondries^{181, 182}.

MAVS est composé de 3 domaines fonctionnels : un domaine CARD N-terminal, une région centrale riche en proline et un domaine transmembranaire (TM) en C-terminal. Le domaine transmembranaire de MAVS est extrêmement intéressant et important pour son ancrage à la membrane externe des mitochondries. La délétion de ce domaine prévient aussi bien la localisation mitochondriale de MAVS mais également sa fonction^{135, 136}. Le VHC utilise sa protéase NS3/4A pour cliver MAVS au niveau du résidu Cys-508, position adjacente au domaine TM de MAVS, le dissociant des mitochondries et empêchant ainsi l'induction de l'IFN- β ¹⁸³. De plus, ce domaine TM montre des similitudes avec ceux des protéines mitochondriales membranaires comme Bcl-2, Bcl-xL et TOM20, et le remplacement du domaine TM de MAVS par celui de l'une de ces protéines restaure la localisation et la fonction de cet adaptateur¹³⁵. Ces données suggèrent l'importance de ce domaine pour la fonction de MAVS dans la signalisation antivirale ainsi que l'implication de la localisation mitochondriale dans cette signalisation. Le domaine CARD de MAVS possède de fortes homologies de séquence avec les domaines CARDS des RLRs, permettant ainsi une interaction homotypique des senseurs cytosoliques avec cet adaptateur suite à une infection virale¹⁸⁴. La région riche en proline, permet quant à elle l'interaction de MAVS avec les membres de la famille TRAFs comme TRAF3 et TRAF6, impliqués dans la signalisation conduisant à la production des IFNs de type I et des cytokines pro-inflammatoires, respectivement^{136, 138}.

Récemment, plusieurs études, dont une issue de notre laboratoire, ont décrit un rôle de la dynamique mitochondriale dans la régulation de la signalisation en aval des RLRs, introduisant ainsi un nouveau niveau de complexité dans les réponses immunitaires antivirales mitochondriales. Les mitochondries sont des organites dynamiques qui se déplacent, se divisent et fusionnent continuellement. Les cellules eucaryotes présentent un réseau mitochondrial filamenteux qui résulte d'un équilibre dynamique entre deux forces antagonistes de fission et de fusion¹⁷⁹. Par conséquent, un déséquilibre de la fission conduit à un allongement mitochondrial, alors qu'une altération de la fusion déclenche la fragmentation

du réseau mitochondrial. Le contrôle de ce mécanisme est permis par des protéines de la machinerie de fission/fusion des mitochondries : Drp1 est nécessaire à la fission alors que les protéines Opa1 et les Mitofusines 1 et 2 (Mfn1/Mfn2) sont essentielles à la fusion mitochondriale^{185, 186, 187, 188, 189}. Comme mentionné précédemment, plusieurs études ont décrit un rôle de la dynamique mitochondriale dans la régulation de la signalisation en aval des RLRs. Tout d'abord, il a été montré que la Mfn2 interagit avec MAVS dans un complexe de haut poids moléculaire, inhibant ainsi la signalisation en aval des RLRs¹⁹⁰ (Figure 10). La surexpression de la Mfn2 bloque l'activation d'IRF3 et NF- κ B en aval de RIG-I, MDA5 et MAVS contrairement aux fibroblastes des souris Mfn2^{-/-} qui présentent une production accrue d'IFN- β suite à une infection virale¹⁹⁰. Étonnamment, alors que Mfn2 apparaît comme un régulateur négatif dans la voie RLR, deux études indépendantes ont montré que son proche homologue, Mfn1 est un inhibiteur direct de MAVS^{191, 192}. Dans les deux cas, il a été rapporté que MAVS interagit avec Mfn1, puis après activation des RLRs, le complexe Mfn1/MAVS régule soit la redistribution de MAVS le long des mitochondries ou l'allongement du réseau mitochondrial (Figure 10). Il apparaît donc que les protéines homologues Mfn1 et Mfn2 ont des rôles opposés dans l'immunité innée anti-virale, bien qu'elles partagent une fonction similaire dans la fusion mitochondriale. La signalisation antivirale mitochondriale n'est pas seulement régulée par la dynamique mitochondriale. En effet, une étude a démontré le rôle du potentiel membranaire mitochondrial dans cette voie de signalisation¹⁹³. Les auteurs observent que les cellules présentant un potentiel de membrane faible, ce qui est le cas des cellules traitées avec le CCCP (un protonophore) ou les cellules déficientes pour Mfn1 et Mfn2, présente une réponse immune antivirale défectueuse. Alors que le rôle précis du potentiel de membrane dans la signalisation de MAVS reste à déterminer, il a été suggéré que la perte de potentiel pourrait empêcher le réarrangement structural du complexe MAVS.

Bien que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) puissent, à forte dose, être délétères pour la machinerie cellulaire, ils sont également des seconds messagers essentiels dans différentes voies de signalisation sensibles à l'état rédox et en modulent un certain nombre. Fait intéressant, les ROS ont été décrits à la fois comme des régulateurs positifs et négatifs de la voie de signalisation initiée par les RLRs. Il a été notamment publié que NOX2 (Enzyme NADPH oxydase, principale source de la production de ROS avec la mitochondrie) et les ROS sont nécessaires pour initier une réponse antivirale MAVS dépendante¹⁹⁴. Les auteurs de cette étude ont également démontré que la sous-expression de NOX2 est corrélée à une diminution de l'expression de l'ARNm de MAVS sans affecter sa localisation mitochondriale, prouvant ainsi que NOX2 est essentielle pour l'expression de cet adaptateur¹⁹⁴. ATG5

(Autophagy-related gene 5), régulateur essentiel de l'autophagie et de la mitophagie peut inhiber la signalisation initiée par les RLRs. Iwasaki *et al.* ont en effet démontré qu'en réponse à une infection par le VSV, les MEFs ATG5 KO présentent des mitochondries dysfonctionnelles, une augmentation de ROS mitochondriaux (mROS) et une amélioration de la production des IFN de type I¹⁹⁵. Le traitement, par des agents anti-oxydants, de ces mêmes cellules ainsi que des cellules primaires, réduit la génération d'IFNs à des niveaux de type sauvage, suggérant que la production anormale de ROS potentialise, dans ces cellules, la réponse RLR dépendante. En outre, l'augmentation des mROS via l'exposition des cellules à la roténone (inhibiteur de la chaîne respiratoire) augmente la production des IFNs à la fois dans les cellules sauvages et ATG5 KO. Par conséquent, la potentialisation de la réponse RLR dépendante est probablement attribuable à l'accroissement de mROS résultant de l'accumulation de mitochondries endommagées. Le fait que l'induction de mROS potentialise la réponse antivirale dans les cellules sauvages qu'ils sont des seconds messagers critiques pour celle-ci. Par ailleurs, une autre étude a montré que la cytochrome oxydase (complexe IV de la chaîne respiratoire), plus précisément la sous-unité *COX5B*, interagit avec MAVS afin de réguler négativement la signalisation en aval de cet adaptateur¹⁹⁶. Alors que l'engagement de MAVS, conduit à l'augmentation de la production de mROS et de *COX5B*, ce dernier régule négativement la signalisation dépendante de MAVS en limitant la production de mROS. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer quels acteurs de la signalisation sont sensibles aux mROS, quels sont exactement leurs rôles dans la signalisation antivirale et enfin si les virus sont capables de manipuler les niveaux de mROS produits pendant l'infection afin de contrôler la signalisation dépendante des RLRs

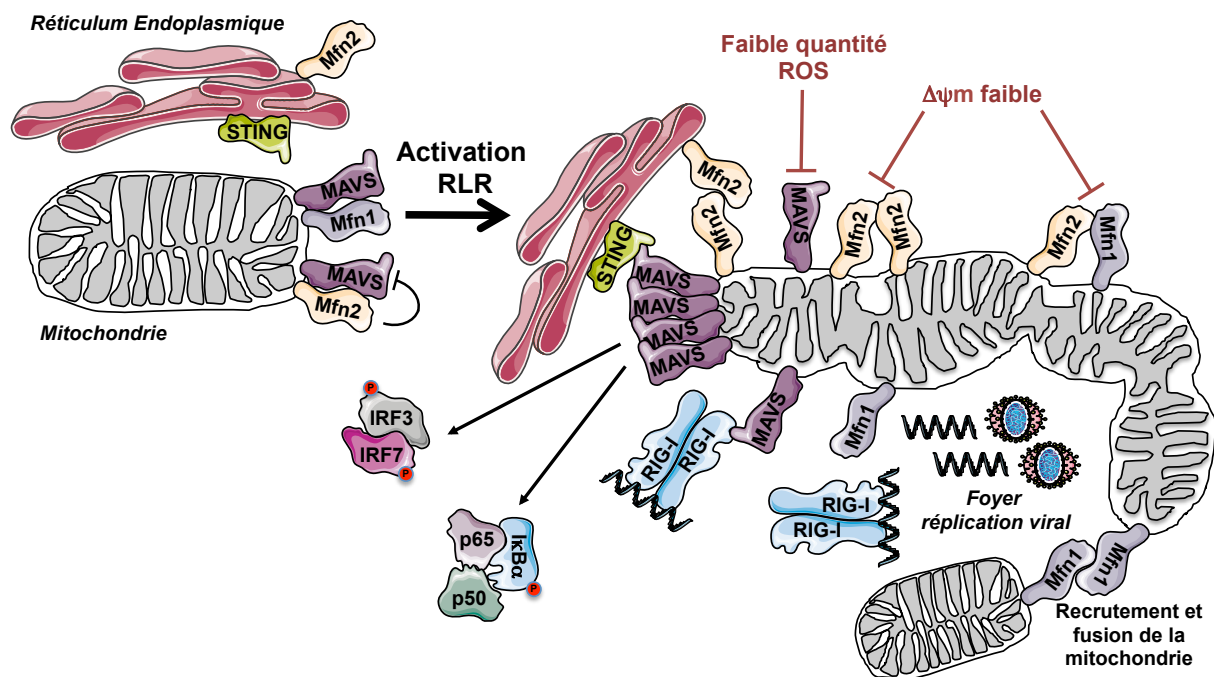


Figure 10 : Dynamique mitochondriale et immunité innée antivirale¹⁹⁷.

2. Le réticulum endoplasmique

Le RE est un ensemble de cavités closes communicantes entre elles. La forme de ces cavités est très variable (citernes aplaties, vésicules globuleuses et tubes contournés). Il se présente en microscopie électronique sous deux formes différentes, correspondant à 2 aspects fonctionnels, le réticulum endoplasmique rugueux (RER), couvert de ribosomes, en continuité avec l'enveloppe nucléaire et le réticulum endoplasmique lisse (REL). En règle générale, le RER intervient dans la synthèse et la glycosylation de certaines protéines notamment les protéines sécrétoires, lysosomiales et celles intégrées aux biomembranes. Le REL est quant à lui impliqué dans la synthèse de différents types de stéroïdes et de lipides selon le type cellulaire, ainsi que dans la détoxification des cellules et le stockage du calcium. Le réticulum endoplasmique joue également un rôle majeur dans le contrôle de qualité des protéines. En effet, il s'assure de l'acquisition de la structure tertiaire de celles-ci. Ce repliement est en grande partie dû à la formation de ponts disulfures (Cys-S-S-Cys) et est contrôlé par des protéines chaperones telles que BiP ainsi que par la calnexine et la calréticuline qui sont insérées dans la membrane du RER. Si les protéines sont incorrectement ou non repliées, elles

vont être exportées vers le cytosol où elles seront dégradées par le protéasome, ce processus s'appelle ERAD (Endoplasmic-reticulum Associated Degradation)¹⁹⁸.

Un lien direct entre le RE et la signalisation antivirale a d'abord été mis en évidence avec l'identification de STING, comme un adaptateur moléculaire crucial pour la signalisation en aval des senseurs d'ADN¹⁴¹. Les cellules dépourvues en STING, protéine ancrée via 4 régions transmembranaires dans le réticulum endoplasmique (RE) de cellules non stimulées, sont insensibles à la production de cytokines après une exposition à un large éventail d'ADN ou à des agents pathogènes. Inversement, la surexpression de STING, conduit à l'activation des facteurs de transcription IRF3 et NF- κ B et par conséquent à la production des IFN de type I et de nombreuses cytokines, respectivement¹⁴². L'activation de ces facteurs de transcription et plus précisément d'IRF3, nécessite la translocation de STING et son assemblage avec la kinase TBK1 pour une transduction optimale du signal. Après la détection d'ADNdb, STING se relocalise du RE à l'appareil de Golgi pour atteindre finalement des structures ponctuées cytoplasmiques où l'on retrouve TBK1^{142, 143, 144}. Le blocage du transport de STING, génétiquement ou pharmacologiquement, empêche l'expression des IFNs et des ISGs. En effet, l'utilisation de la Bréfeldine A, et non la chloroquine, bloque la translocation de STING, indiquant ainsi que cet adaptateur utilise les vésicules golgiennes pour atteindre sa destination finale, les structures ponctuées du cytosol^{142, 199}. Il est connu qu'une séquence KDEL en C-terminal d'une protéine, est un signal de rétention dans le RE. L'addition d'un peptide signal KDEL (mais non KKMP) à l'extrémité C-terminale de STING réduit sa capacité à induire la production des IFNs. En accord avec ce résultat, le surnageant de culture de cellules HEK293 transfectées avec la forme sauvage de STING, mais non celui des cellules transfectées avec STING-KDEL, supprime la réplication du HSV-1. L'ensemble de ces résultats, indique que le transfert de STING est nécessaire à l'activation des événements en aval¹⁴³.

Une étude de notre laboratoire a démontré également un rôle du RE dans l'activation de la voie NF- κ B. Suite à l'activation de récepteurs antigéniques (BCR, TCR), de récepteurs cytokiniques (TNFR, IL-1R) ou de récepteurs de l'immunité innée en réponse aux infections (TLR3, -4, RLRs et NOD2), le RE, via la Méthadérine (MTDH) recrute certains composants ubiquitinylés, que l'on a appelé TUCANs (Transmetteurs Ubiquitinylés Conduisant à l'Activation de NF- κ B) lors de la signalisation aboutissant à l'activation de NF- κ B. Le RE servirait alors d'une plateforme de recrutement, induisant ainsi la formation d'un signalosome, pour permettre l'activation de NF- κ B²⁰⁰.

Suite à ces observations, un projet visant à évaluer la contribution des E3 ubiquitine ligases en charge de relayer NF- κ B au niveau des organites à été réalisé en effectuant le crible d'une banque de siRNAs dirigés contre les 46 E3 ligases transmembranaires en utilisant comme modèle la signalisation du TNFR. Ce crible à permis d'identifier l'E3 ligase RNF121, protéine localisée au niveau de l'appareil de Golgi, comme un régulateur positif de NF- κ B²⁰¹.

2. La cellule et ses constituants, source de signaux de danger

Lorsque les tissus subissent une altération de leur intégrité associée à la mort de cellules, ces derniers libèrent des molécules que l'on appelle signaux de danger (DAMP). La majorité des DAMPs, de nature variée, révèlent une double vie. Comme molécules intracellulaires, elles jouent un rôle dans l'homéostasie cellulaire, telles que les protéines liant le calcium, les molécules chaperonnes ou les molécules stabilisant la chromatine. Elles répondent aussi à quatre critères : i) elles sont libérées par les cellules en nécrose et retenues par celles en apoptose; ii) elles induisent la réponse immunitaire innée et spécifique, la réparation tissulaire et des altérations pouvant induire une transformation tumorale ; iii) elles activent les voies de signalisation liées à l'inflammation et iv) elles sont relarguées dans le milieu extracellulaire par des mécanismes sécrétoires non-conventionnels. Après leur relargage dans le milieu extracellulaire par les cellules actives ou nécrotiques, comme indicateurs de dommage, d'infection ou d'inflammation, les DAMPs deviennent des signaux de danger qui activent les cellules de l'immunité et de l'endothélium vasculaire et jouent un rôle dans le recrutement des cellules inflammatoires aux sites des dommages tissulaires.

1. Les signaux de danger d'origine cytoplasmique

- Les protéines de choc thermique (HSP, Heat Shock Proteins)

En concentration physiologique, les HSPs agissent comme des chaperons moléculaires qui aident au repliement des protéines naissantes ou mal-repliées, empêchant ainsi l'aggrégation de protéines²⁰². Cinq familles de HSPs existent chez l'homme, classées en fonction de leur poids moléculaire, à savoir : HSP20, HSP60, HSP70, HSP90 et HSP100. Lors d'un stress cellulaire, ces protéines normalement intracellulaires, peuvent se retrouver à la surface cellulaire ou être sécrétées dans le milieu extracellulaire et alors servir de DAMPs. Elles sont impliquées dans l'activation du TLR2 et du TLR4 induisant alors une signalisation Myd88-

dépendante conduisant notamment à l'activation du facteur de transcription NF- κ B et à la production de cytokines pro-inflammatoires²⁰³.

➤ Les protéines S100

Il s'agit d'une famille de protéines de bas poids moléculaires liant le calcium. A ce jour, 25 membres ont été identifiés parmi lesquels S100A8, S100A9, S100A12 sont reconnus comme signaux de danger²⁰⁴. Comme les autres DAMPs, ces protéines présentent une double vie : intracellulairement, elles ont un rôle dans le métabolisme de la migration cellulaire et du cytosquelette. Après libération dans l'espace extracellulaire, en raison de dommages cellulaires ou à l'activation des phagocytes, elles deviennent des signaux de danger qui activent les cellules immunitaires et l'endothélium vasculaire. Une fois dans l'espace extracellulaire, les protéines S100 peuvent activer de multiples récepteurs y compris le TLR4, menant à l'activation de NF- κ B²⁰⁴.

➤ L'acide urique

L'acide urique, soluble dans le milieu intracellulaire, précipite lorsqu'il est libéré dans le milieu extracellulaire pour donner des cristaux d'acide urique²⁰⁵. Ces cristaux sont capables d'activer l'inflammasome NLRP3, entraînant la production d'IL-1 et d'IL-18²⁰⁶. En effet, les macrophages murins déficients pour le récepteur à l'IL-1 ou différents composants de l'inflammasome tels que la caspase-1, ASC, et NLRP3 ne produisent plus de cytokines suite à l'accumulation de cristaux d'acide urique et présentent une réduction de la réaction inflammatoire²⁰⁶.

2. Les signaux de danger et organites cellulaires

1) Le noyau

HMGB1, est une protéine résidente du noyau cellulaire où elle se lie aux nucléosomes et facilite le repliement de l'ADN. Dans le milieu extracellulaire, HMGB1 peut exercer des fonctions pro-inflammatoires. Cela se produit soit lorsqu'elle est libérée activement par un mécanisme sécrétoire non conventionnel lors de la stimulation par des médiateurs pro-inflammatoires (par exemple, lipopolysaccharide, cytokines pro-inflammatoires, l'oxyde

nitrique) ou passivement par nécrose^{207, 208}. Durant l'apoptose, HMGB1 ne peut être libérée en raison de modifications post-transcriptionnelles de la protéine elle-même ou de modification structurelle de la chromatine avec laquelle elle interagit, ceci augmentant la rétention nucléaire²⁰⁸. Une fois sécrétée, passivement ou activement, cette protéine peut se lier à différents PRRs, y compris le TLR2, le TLR4 et le récepteur RAGE permettant ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires^{209, 210}. Le TLR9, à également été mentionné comme possible récepteur de HMGB1, bien que cela reste controversé. La facilité de cette protéine à former des complexes avec diverses molécules, y compris l'ADN, ligand connu du TLR9, pose ainsi l'hypothèse d'une liaison indirecte de HMGB1 au TLR9^{211, 212}. De plus, HMGB1 exerce une activité chimiotactique envers les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques ; il peut en outre favoriser l'activation, la migration et la maturation de ces dernières.

Cependant, il existe un débat sur les propriétés immunostimulatrices directes de HMGB1 ; Certaines études montrent que cette protéine, hautement purifiée, n'exerce pas de propriétés pro-inflammatoires par elle-même, mais que ses attributs sont dus à la formation de complexes de HMGB1 avec de l'ADN, des lipides, des lipopolysaccharides, ou encore des cytokines²¹³. Ces complexes probablement très inflammatoires stimuleraient alors la production de cytokines par l'intermédiaire de leur liaison à certains récepteurs tels que les TLRs ou les récepteurs cytokiniques. Le fait que d'autres études prétendent le contraire peut être expliqué par le fait que l'état oxydatif de HMGB1, important pour la régulation de ses fonctions, n'ai pas été pris en compte. Lorsque les trois résidus cystéine (C23, C45 et C106) de HMGB1 sont sous une forme réduite, HMGB1 présente des propriétés chimioattractives mais non immunostimulatrices, sous leur forme oxydée cette protéine n'affiche alors plus ces deux qualités²¹⁴. Enfin, lorsque la C106 est réduite, tandis que C23 et C45 forment une liaison disulfure intermoléculaire, HMGB1 possède cette fois des propriétés immunostimulatrices²¹⁵. Dans cet état intermédiaire, il se liera au récepteur RAGE et le TLR2 / 4, conduisant à l'activation de la voie NF-κB et à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

Deux autres classes de molécules nucléaires peuvent jouer le rôle de médiateurs inflammatoires endogènes après leur translocation : l'ADN et les histones. Dans les cellules des mammifères, ces deux classes de molécules sont étroitement associées et forment ainsi le nucléosome. Des études suggèrent que, dans les milieux *in vivo*, la libération de molécules nucléaires par des cellules apoptotiques et nécrotiques se produit de façon similaire et que ces

deux formes de mort cellulaire sont associées au relargage du contenu nucléaire et cytoplasmique dans le sang.

En raison du rôle de l'ADN comme antigène cible dans certaines maladies auto-immunes tel que le Lupus érythémateux disséminé, les propriétés immunitaires de l'ADN des mammifères ont été largement étudiées *in vivo* et *in vitro*. Ces études, menées sur plusieurs décennies, ont montré que cet ADN, seul, ne présente pas d'activité immunogène significative. Comme vu précédemment, notre ADN diffère des ADNs étrangers par leur structure et leur séquence, notamment dû à certaines modifications biochimiques, pouvant influencer sur leur activité immunostimulatrice⁶⁸. Bien que l'ADN des mammifères seul soit incapable d'induire des réponses *in vitro* lorsqu'il est mis en culture avec des cellules, il peut néanmoins induire des réponses lorsqu'il est introduit par des agents à l'intérieur des cellules²¹⁶. Ces agents modifient le mode d'absorption de l'ADN dans la cellule et par conséquent permettent l'accès à des récepteurs qui peuvent être soit cytoplasmiques ou endosomaux. Dans un sens, l'ADN nucléaire des mammifères est un DAMP incomplet, bien qu'il puisse acquérir une activité immunoactive via son interaction avec d'autres molécules, facilitant l'absorption cellulaire.

Contrairement aux études avec l'ADN, différents groupes indiquent que les histones ont une activité immunitaire propre. Les concentrations élevées des histones dans le sérum ont été impliquées dans de nombreux processus physiopathologiques et dans la progression de maladies telles que des maladies auto-immunes, des maladies inflammatoires et certaines formes de cancer, les considérant alors comme des médiateurs potentiels de maladies inflammatoires systémiques létales²¹⁷. La présence d'histones dans le milieu extracellulaire, va alors initier des réponses inflammatoires via l'activation des TLRs, notamment le TLR2, le TLR4 et le TLR9, conduisant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires^{218, 219}.

2) Le réticulum endoplasmique

a) Le stress du réticulum endoplasmique favorise l'inflammation

De nombreuses situations perturbent la maturation protéique, induisant l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE, produisant alors une situation de stress appelée stress du RE. Tout comme les altérations du métabolisme, les infections virales peuvent interférer avec les processus de maturation post-traductionnelle des protéines natives et ainsi induire leur accumulation. Certains pathogènes intracellulaires interagissent avec des

organites, y compris le RE, afin d'établir leur niche et se répliquer, produisant de nombreuses particules virales qui peuvent alors surcharger le RE²²⁰. Cette accumulation oblige la cellule à déclencher une réponse adaptative appelée « Unfolded Protein Response » (UPR) dont l'objectif est de diminuer la quantité de protéines dans la lumière du RE.

Suite à un stress, les cellules eucaryotes vont déclencher l'UPR qui exerce trois fonctions principales : l'adaptation, l'alarme et l'induction de la mort cellulaire dans les cas d'un stress prolongé. En résumé, cette réponse possède deux composantes : la première composante (traductionnelle) de l'UPR est une répression rapide et intense de la synthèse protéique afin d'empêcher l'arrivée d'autres protéines dans le RE et d'éviter ainsi la surcharge de cet organite. La seconde (transcriptionnelle) consiste à synthétiser de nouvelles protéines chaperonnes ou des « foldases » pour stimuler les processus de repliement et entraîner vers la dégradation les protéines mal repliées. Dans les cas où la situation de stress est trop intense ou de trop longue durée et que ces deux composantes ne peuvent y remédier, la réponse UPR déclenche des signaux d'alarme avec la génération d'une réaction inflammatoire médiée par les voies NF- κ B et JNK et la diminution d'expression de facteurs anti-apoptotiques comme la protéine Bcl-2. Après cette phase d'alarme, la cellule peut entrer en apoptose.

La réponse UPR est constituée de trois voies de signalisation impliquant trois protéines transmembranaires : IRE1 α (Inositol Requiring Enzyme 1 α), le facteur de transcription ATF6 (Activated Transcription Factor 6) et la protéine kinase PERK (Protein kinase RNA (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase)²²¹. Dans des conditions physiologiques, la protéine chaperonne BiP, appartenant à la famille des protéines de choc thermique (Heat Shock Protein), est liée aux domaines luminaux de ces trois médiateurs. Lorsqu'un stress survient, BiP se lie aux protéines mal conformées qui se sont accumulées dans la lumière du RE et les dirige vers la voie ERAD (Endoplasmic-Reticulum Associated Degradation) pour être dégradées par le protéasome. Les protéines transmembranaires ainsi libérées sont activées et entraînent l'activation de voies de régulation traductionnelle et transcriptionnelle²²¹.

Bien que l'inflammation contribue à l'induction du stress du RE, ce même mécanisme peut également favoriser l'inflammation en soi, en activant, par différentes voies, le facteur de transcription NF- κ B et la transcription des gènes de l'inflammation. En absence de stimuli inflammatoires, NF- κ B est sous forme inactive dans le cytoplasme, lié à son inhibiteur (I κ B) exprimé de façon constitutive. En réponse au stress du RE, le domaine cytoplasmique de

IRE1 α se complexe avec IKK grâce à la protéine adaptatrice TRAF2. Cette interaction entraîne la phosphorylation activatrice de IKK qui va elle-même induire la phosphorylation inhibitrice de I κ B α . I κ B α se dissocie alors de NF- κ B, conduisant à la dégradation d'I κ B par le protéasome et à la translocation de NF- κ B dans le noyau²²² (Figure 11). Le complexe IRE1 α /TRAF2 permet également le recrutement de la kinase JNK, l'activation de la voie Akt et la translocation de NF- κ B suite à la phosphorylation d'I κ B²²³ (Figure 11).

Des chercheurs se sont intéressés à la contribution que pouvait avoir NOD1 et NOD2 dans les réponses inflammatoires du réticulum endoplasmique. Ils ont découvert que l'induction d'un stress réticulaire par l'utilisation de la thapsigargine et du dithiothréitol, déclenche une production d'IL-6 de façon NOD1/2 dépendante²²⁴. Physiologiquement, l'inflammation provoquée par l'infection de *Brucella Abortus*, est également dépendante de TRAF2, NOD1/2 et de RIP2 ; elle peut, de plus, être réduite par un inhibiteur du stress réticulaire ou d'IRE1 α . L'association de NOD1 et NOD2 avec des réponses pro-inflammatoires induite par la voie signalisation IRE1 α /TRAF2 fournit un lien supplémentaire entre immunité innée et inflammation induite par le stress du RE (Figure 11).

De plus, l'activation de PERK entraîne la diminution de la traduction des ARNm et réduit donc la synthèse de I κ B (Figure 11). Le ratio NF- κ B/I κ B est augmenté et NF- κ B libre peut migrer dans le noyau²²². L'activation de ATF6 active également la voie Akt/NF- κ B par un mécanisme encore méconnu²²⁵.

b) Diaphonie entre stress du RE et mitochondrie

Dans le RE, la formation de ponts disulfures est un des événements majeurs conduisant au repliement correct des protéines. Ce mécanisme nécessite un environnement oxydatif tel que le glutathion et des oxydoréductases comme la PDI^{226, 227}. De plus, PDI permet la réduction et le réarrangement de ponts disulfures incorrects en se fixant sur son substrat permettant ainsi une modification de la liaison par une réaction d'isomérisation. La protéine ERO1 (ER oxydation 1) permet de réoxyder PDI suite à sa réduction lors de la formation de ponts disulfures, en transférant les électrons directement à l'oxygène par une réaction flavine dépendante, produisant ainsi des radicaux libres oxygénés (ROS) et du glutathion oxydé (GSSG)^{226, 227}. Une surcharge de protéines dans le RE peut donc conduire à l'accumulation de ROS et de glutathion oxydé, constituant une source de stress oxydant et par conséquent un stress du RE^{222, 226, 227} (Figure 11). En réponse au stress du RE, les cellules activent la réponse UPR pour limiter l'accumulation des ROS. L'activation de la voie PERK

entraîne la transcription sélective du facteur ATF4 ainsi que la phosphorylation de NRF2 (Nuclear factor-erythroid-derived 2 (NF-E2)-Related Factor 2) induisant la transcription de gènes anti-oxydants^{228, 229}. Les ROS ainsi formés peuvent cibler les protéines chaperonnes et les canaux calciques, tel que le récepteur de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3R), conduisant au relargage du calcium intracellulaire du RE. Il s'en suit un afflux de calcium dans la mitochondrie responsable de la stimulation du métabolisme mitochondrial conduisant, entre autre, à une production accrue de ROS²³⁰ (Figure 11). Les ROS mitochondriaux exacerbèrent alors la libération du calcium réticulaire.

Récemment une étude a identifié un mécanisme NLRP3-Caspase2 dépendant qui relaie le stress du RE aux mitochondries favorisant ainsi l'inflammation, l'intégration de stress cellulaire et l'immunité innée²³¹. Dans un modèle d'infection, le stress du RE ainsi engendré active le médiateur IRE1 α , qui permet entre autre le contrôle de la traduction de TXNIP, protéine alors acheminée vers les mitochondries où elle se lie à la thiorédoxine-2, défense anti-oxydante, permettant d'augmenter les concentrations d'espèces réactives de l'oxygène mitochondriales. Cette augmentation promeut l'association de l'inflammasome NLRP3 avec les mitochondries. NLRP3 activerait alors la caspase-2, qui à son tour cliverait le facteur pro-apoptotique Bid, permettant l'activation de Bax et Bad et la formation de pores dans la membrane conduisant à la libération du contenu mitochondrial²³¹ (Figure 11).

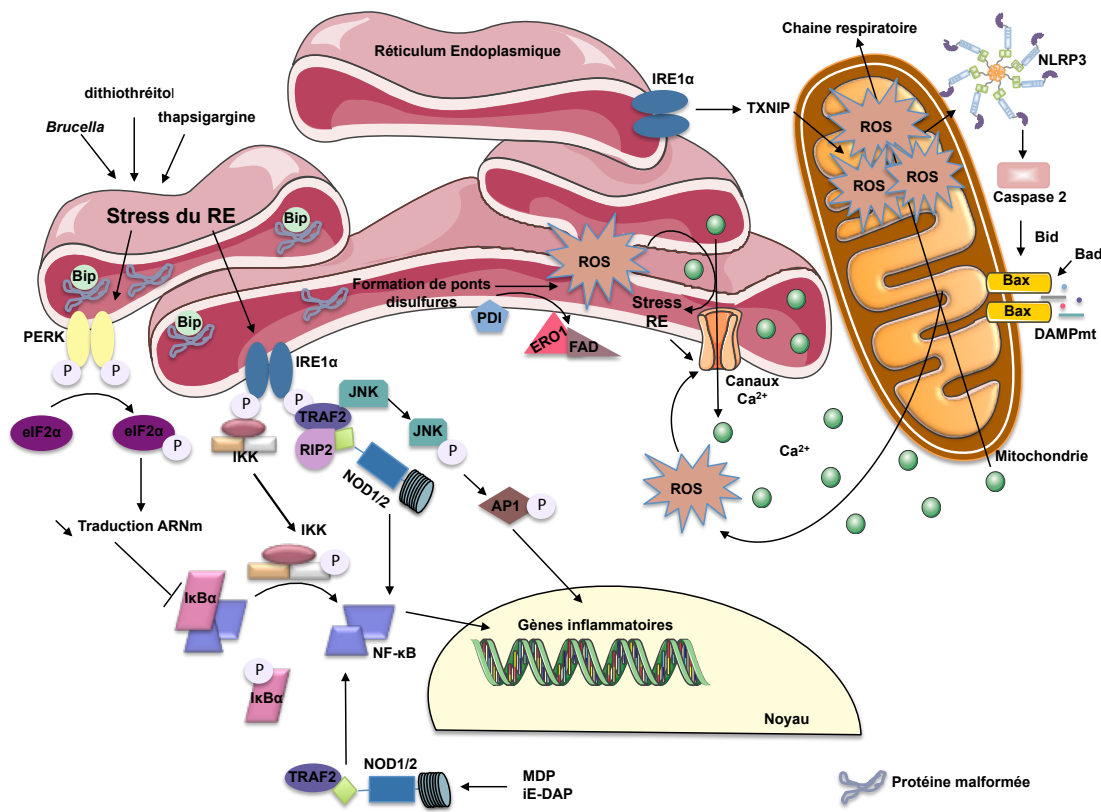


Figure 11 : Stress du réticulum endoplasmique et inflammation

3) La mitochondrie

a) ADN mitochondrial

Les mitochondries véritables usine à énergie, sont des organites uniques qui proviennent de l'endosymbiose d'une α -protéobactérie¹⁸⁰. La mitochondrie contient donc son propre matériel génétique, l'ADN mitochondrial (ADNmt). Cet ADN, semblable à celui de son ancêtre bactérien, consiste en une boucle d'ADN circulaire à double brin, contenant des motifs CpG non méthylés. Les études sur la reconnaissance de l'ADN bactérien par le système immunitaire et notamment le TLR9, qui reconnaît leur séquences CpG non-méthylées, a permis d'élucider le rôle de l'ADNmt dans l'activation du système immunitaire. Les similitudes entre l'ADN bactérien (bDNA) et l'ADN mitochondrial suggèrent ainsi qu'elles peuvent induire une réponse inflammatoire par des voies analogues²³². En effet, comme avec l'ADN bactérien, l'ADNmt active la voie MAPK p38 par le biais des récepteurs Toll-like 9 (TLR9) dans les leucocytes polynucléaires (PMN), induisant un phénotype inflammatoire *in vivo*. De plus l'interaction entre le TLR9 et l'ADNmt active le facteur de

transcription NF- κ B permettant l'augmentation de l'expression d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 β ²³³ (Figure 12).

Deux études distinctes ont montré que l'ADNmt, relargué dans le cytoplasme, joue un rôle clef dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. Nakahira *et al.* ont démontré que la libération de l'ADNmt dépend de l'activation de NLRP3 et des espèces réactives de l'oxygène mitochondriales ; ainsi l'ADNmt amplifierait l'activation de l'inflammasome après son déclenchement initial (proposé ici comme étant la production de ROS)²³⁴. En revanche, Shimada *et al.* décrivent que la mort mitochondriale est une condition préalable à la libération de l'ADNmt oxydé dans le cytoplasme, où il se lie directement à NLRP3 pour activer l'inflammasome²³⁵ (Figure 12). En outre, les cellules dépourvues d'ADNmt (généralisé par le traitement au bromure d'éthidium) sont incapables d'activer NLRP3, soutenant ainsi un rôle direct de l'ADN mitochondrial²³⁴. Fait intéressant, NLRP3 est nécessaire à la libération de l'ADNmt lors de l'activation inflammasome. Ceci suggère que l'ADNmt agirait comme une boucle de rétroaction positive, potentialisant l'activation de l'inflammasome NLRP3. En revanche, un rapport récent, utilisant une série de modèles de souris génétiquement déficientes, a montré que l'apoptose mitochondriale est inutile pour l'activation de l'inflammasome NLRP3²³⁶. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour clarifier l'implication de l'apoptose mitochondriale dans l'activation de l'inflammasome.

En plus d'interagir avec les récepteurs précédemment décrits, l'ADNmt active également la voie de signalisation dépendante de STING (Figure 12). Une équipe a découvert que la déficience, induite génétiquement ou lors de l'infection par le HSV, du facteur de transcription mitochondriale A (TFAM) déclenche une perturbation de la stabilité de l'ADNmt, se traduisant par la libération de l'ADNmt fragmenté qui recrute et active CGAS. cGas activé va alors générer le second messager cGAMP et activer STING, permettant le recrutement et l'activation de TBK1, kinase responsable de l'activation d'IRF3²³⁷. Fait intéressant, des études indiquent que l'apoptose des cellules, médiée par Bax/Bak, conduisant à l'activation des caspases inhibe la production des IFNs. Bax/Bak déclenchent la libération de l'ADNmt, reconnu par cGas initiant la production d'IFN. En principe, Bax et Bak n'induisent que la perméabilisation de la membrane externe, la question est donc comment expliquer la libération de l'ADNmt. On pourrait plutôt concevoir une apoptose tardive avec libération du contenu mitochondrial. Les caspases activées atténuent cependant cette réponse^{238, 239}. La mitochondrie joue donc un rôle crucial pour déterminer si les cellules en apoptose déclenchent des réponses inflammatoires suite à la reconnaissance de l'ADNmt ou restent immunologiquement silencieuses via l'activation des caspases.

En résumé, le stress mitochondrial induit par une infection, conduisant à la libération de l'ADNmt, est un mécanisme évolutif bénéfique qui amplifie les réponses immunes suite à l'invasion de pathogènes. Cependant, l'accumulation aberrante de DAMPs mitochondriaux et la libération de l'ADNmt dans le cytosol peut alors provoquer des maladies inflammatoires.

b) Voies métaboliques de la mitochondrie

L'ATP, molécule appartenant à la famille des purines, est essentiel pour le transport de l'énergie dans une cellule, bien qu'il possède également de nombreuses fonctions de signalisation. L'ATP peut être libéré par les cellules endommagées ou par les cellules du système immunitaire via les récepteurs PANX1 qui permettent sa libération dans le milieu extracellulaire. Bien que l'ATP soit principalement synthétisé par les mitochondries, il peut être libéré par de multiples compartiments intracellulaires, y compris le cytoplasme, le RE et la mitochondrie. Dans le milieu extracellulaire, l'ATP peut moduler les réponses immunes telle que la sécrétion d'interleukine, sert de signal chimioattractant et permet d'activer les cellules T. L'ATP extracellulaire peut activer les récepteurs purinergiques, dont il existe deux classes : les récepteurs P2Y couplés aux protéines G et les récepteurs P2X, protéines transmembranaires qui forment des canaux ioniques. L'activation des récepteurs P2Y induit le recrutement de neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques au site d'inflammation²⁴⁰. D'autre part, la fixation réversible de l'ATP sur le récepteur P2X7, induit un changement de conformation du récepteur : ce canal ionique transmembranaire est alors ouvert ce qui entraîne un influx de Ca^{2+} et un efflux de K^+ , induisant l'activation des MAPKs et de l'inflammasome NLRP3, respectivement, conduisant à l'initiation de cascades de signalisation pro-inflammatoires²⁴¹. L'activation du récepteur P2X7 conduit également à une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase responsable de la formation de ROS, conduisant à la maturation de la caspase-1 et de l'IL-1 β ^{242, 243} (Figure 12).

Même si la chaîne de transport d'électrons est un procédé de production d'ATP, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont alors générées comme sous-produits de ces réactions, faisant ainsi de la mitochondrie la principale source de ROS. Diverses conditions de stress, y compris l'augmentation des taux métaboliques, l'hypoxie, ou des dommages membranaires, induisent une augmentation de la production mitochondriale de ROS pouvant amorcer l'apoptose. Pour enquêter sur la possible implication des mitochondries dans l'activation de l'inflammasome, une équipe a induit artificiellement la production de ROS dans les mitochondries en bloquant les enzymes clés de la chaîne respiratoire²⁴⁴. Ils ont alors

montré que l'inhibition des complexes I ou III de la chaîne respiratoire mitochondriale, provoque l'activation de l'inflammasome NLRP3, que l'inhibition de l'autophagie/mitophagie, qui entraîne une présence prolongée des ROS mitochondriaux, conduit à l'activation spontanée de l'inflammasome et enfin que NLRP3 et ASC colocalise avec la mitochondrie en présence d'activateurs de l'inflammasome. Ces données suggèrent alors que les ROS mitochondriaux sont capables d'activer l'inflammasome NLRP3²⁴⁴. Les mitochondries peuvent montrer une excitabilité anormale aux effets des ROS exogènes, répondant aux élévations anormales de leur concentration par un accroissement de leur production en ROS, appelé RIRR pour ROS-induced ROS release²⁴⁵.

Le calcium (Ca^{2+}) est un second messenger jouant un rôle essentiel dans la régulation de multiples voies de signalisation au sein des cellules. Des flux aberrants en Ca^{2+} peuvent donc entraîner des événements cellulaires catastrophiques, entraînant les cellules à déployer des stratégies pour contrôler les niveaux de calcium intracellulaires²⁴⁶. En particulier, les mitochondries qui jouent un rôle central dans la régulation des niveaux de calcium en acceptant le Ca^{2+} libéré par le RE. Il y a cependant un seuil de concentration calcique intra-mitochondrial qui ne peut être dépassé sans mettre en route de nouveaux mécanismes pathologiques, y compris un dysfonctionnement de la mitochondrie. Le calcium joue un rôle clé dans la régulation des fonctions de cet organite notamment dans la transmission des signaux transmitochondriaux²⁴⁶. De ce fait, au delà d'une certaine concentration, l'ion calcique influe sur la production de ROS en augmentant le métabolisme de la mitochondrie (cycle de Krebs et stimulation de la NO synthase) et donc pouvant ainsi conduire à l'activation de l'inflammasome, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent²⁴⁶. Il influe également l'ouverture d'un canal de la membrane mitochondriale interne dénommé PTP (Permeability Transition Pore) responsable d'un gonflement et la rupture de la membrane mitochondriale externe.

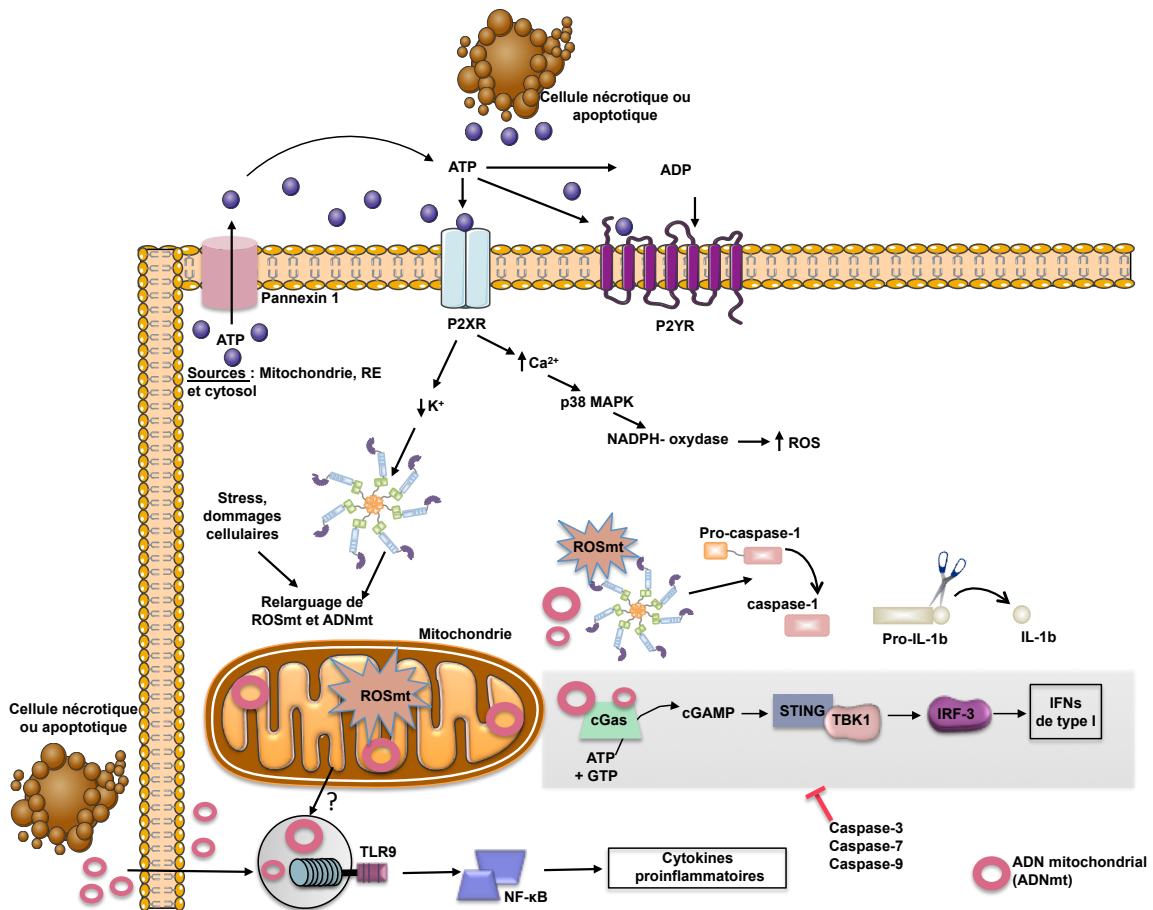


Figure 12 : La mitochondrie comme activateur de la réponse immune

III. Ubiquitination et Immunité

Les fonctions cellulaires de la plupart des protéines sont régulées par des modifications post-traductionnelles (PTM). Ces PTM étant inductibles et réversibles, elles permettent aux cellules de répondre dynamiquement à des stimuli externes en modulant les voies de signalisation intracellulaires. Parmi les PTM les mieux étudiés on retrouve la phosphorylation, l'acétylation et l'ubiquitination.

1. Le système ubiquitine

1. Ubiquitine et cascade enzymatique

En 1980, Avram Hershko et Aaron Ciechanover en collaboration avec Irwin Rose démontrèrent qu'une chaîne polypeptidique thermostable, alors appelée facteur protéolytique-

1 ATP dépendant, pouvait être conjuguée aux protéines, uniquement en présence d'ATP, qui par cet événement étaient désignées pour la dégradation^{247, 248, 249, 250}. Plus tard, ce facteur fut assimilé à une petite protéine de 76 acides aminés déjà identifiée par Goldstein et ses collègues sous le terme d'ubiquitine (en raison de son expression ubiquitaire)²⁵¹. Depuis, une multitude de travaux a été dédiée à cette petite molécule et à la description de son implication dans les différents processus physiologiques.

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'attachement covalent d'une molécule d'ubiquitine sur une protéine cible. L'attachement de l'ubiquitine se fait *via* une liaison isopeptidique qui se met en place entre le résidu glycine se trouvant à l'extrémité C-terminale (G76) de la molécule d'ubiquitine et un résidu Lysine de la protéine cible. Cette réaction implique l'action séquentielle de trois enzymes : une enzyme d'activation (E1), une enzyme de conjugaison (E2) et une ligase (E3)^{252, 253} (Figure 13).

Depuis sa découverte, en 1981, l'ubiquitin-activating enzyme 1 (**UBE1**) a longtemps été considérée comme étant l'unique enzyme responsable de l'activation de l'ubiquitine. Toutefois, de récents travaux ont caractérisé d'autres protéines ayant les mêmes propriétés qu'UBE1, notamment **UBA6** (Ubiquitin-like modifier activating enzyme 6) et **UBE1L2** (Ubiquitin-activating E1-Like protein 2)^{254, 255}. En présence d'ATP, l'enzyme E1 (ubiquitin-activating enzyme) active l'ubiquitine par un mécanisme complexe qui conduit à la formation d'une liaison thiol-ester riche en énergie entre la glycine C-terminale de l'ubiquitine et une cystéine du site actif de E1^{256, 257, 258}.

A ce jour, une quarantaine d'enzymes E2 (également appelées enzymes de conjugaison) ont été recensées^{259, 260}. Elles partagent toutes un motif catalytique conservé d'environ 150 acides aminés appelé domaine UBC (Ubiquitin Conjugating domain), mais peuvent différer par leurs extensions N- et C- terminales afin de faciliter certaines interactions spécifiques avec différentes E3 ligases. Les molécules d'ubiquitine activées sont recrutées au niveau de la cystéine de leur site actif UBC *via* une liaison thioester covalente^{261, 262}. Lorsqu'elles sont liées à certaines E3 ligases, les E2 peuvent catalyser directement le transfert de la molécule d'ubiquitine sur le substrat ou sur les résidus lysine de l'ubiquitine elle-même, permettant ainsi la poly-ubiquitination^{260, 263, 264}. Bien que le choix du substrat implique les E3 ligases, ce sont les E2 qui seraient déterminantes lors de la sélection du type d'ubiquitination et qui contrôlent de ce fait le devenir des protéines cibles^{260, 265, 266}.

La dernière étape dans la cascade d'ubiquitination, catalysée par les E3 Ubiquitine-ligases, correspond au recrutement spécifique du substrat et au transfert de l'ubiquitine sur cette protéine substrat. L'E3 ligase est impliquée aussi bien dans la catalyse de la première

molécule d'ubiquitine au substrat que dans la liaison des autres molécules d'ubiquitine successives permettant la synthèse d'une chaîne de poly-ubiquitination, lorsque cela est requis. Il existe un très grand nombre d'E3 ligases identifiées (environ 700) et certainement beaucoup d'autres non identifiées²⁵². Il existe différents types d'enzymes E3 que l'on peut regrouper en 2 classes, selon le mécanisme de transfert de l'ubiquitine vers le substrat. Dans le cas des enzymes monomériques à domaine HECT (« Homologous to E6-AP C-terminus »), elles prennent physiquement en charge l'ubiquitine et la transportent ensuite sur la protéine cible (Figure 13). En revanche, les enzymes E3 à motif « RING finger » jouent un rôle d'adaptateur permettant le rapprochement entre le substrat et l'ubiquitine portée par l'enzyme E2 (Figure 13).

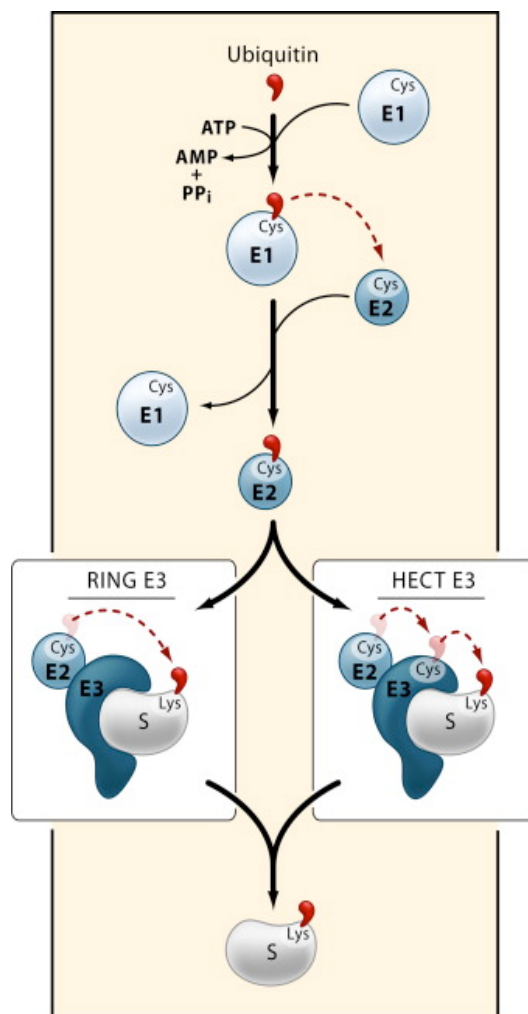


Figure 13 : Cascade de liaison de l'ubiquitine²⁶³

2. Les différents type d'ubiquitination

La conjugaison de l'ubiquitine sur le substrat se produit généralement au niveau des résidus lysine mais d'autres acides aminés peuvent recevoir cette molécule, notamment la thréonine, la cystéine et la sérine²⁶⁷. Tout substrat peut être étiqueté avec une seule molécule d'ubiquitine, c'est la mono-ubiquitination, ou par une chaîne d'ubiquitine plus ou moins longue résultant en la poly-ubiquitination du substrat (Figure 14). De plus, la mono-ubiquitination peut avoir lieu sur une seule lysine ou sur différents résidus lysine conduisant à une multiple mono-ubiquitination ou multi-ubiquitination^{267, 268}.

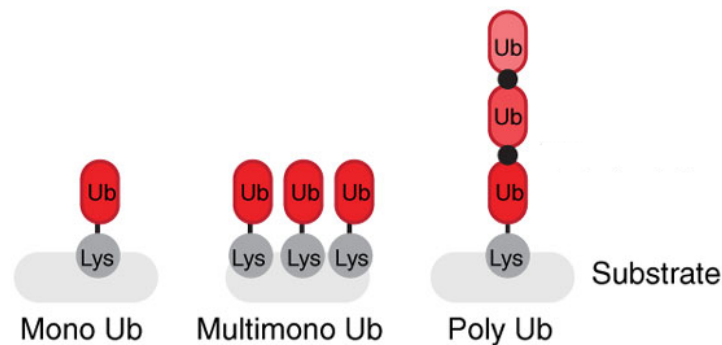


Figure 14 : mono-, multimono- ou poly-ubiquitination²⁶⁸

La molécule d'ubiquitine contient sept résidus lysine (Lys ou K), et chacun d'entre eux peut accueillir une molécule d'ubiquitine lors de la formation des chaînes de poly-ubiquitine. De plus, le résidu méthionine (Met ou M) se trouvant à l'extrémité N-terminale peut également recevoir les molécules d'ubiquitine, donnant lieu à des ubiquitinations dites linéaires. De ce fait, huit types de chaînes de poly-ubiquitine peuvent être formées correspondant aux huit sites receveurs : K6, K11, K29, K27, K33, K48, K63 et M1 ; et c'est selon le résidu impliqué dans la formation des chaînes de poly-ubiquitine que sera déterminé le devenir de la protéine cible^{268, 269, 270} (Figure 15).

Les ubiquitinations les mieux caractérisées à ce jour sont les chaînes de type K48 et K63, dans lesquelles une molécule d'ubiquitine est liée au niveau de sa G76 à la lysine 48 et 63 de l'ubiquitine suivante, respectivement. Ces différentes ubiquitinations engendrent des processus cellulaires différents. Les chaînes de type K48 sont généralement reconnues par le protéasome, conduisant à la dégradation du substrat, mécanisme utilisé pour le turn-over des protéines dans la cellule^{268, 269, 270} (Figure 15). En revanche, les chaînes de type K63 ne déclenchent pas la dégradation par le protéasome, mais jouent un rôle important dans les voies de signalisation, en stabilisant les substrats ou en agissant comme plateforme pour la

formation de complexes multimériques de signalisation (Figure 15). Plus précisément, l'ubiquitination de type K63 favorise la multimérisation des protéines de signalisation, induisant ainsi leurs états actifs, permettant le recrutement de partenaires d'interaction supplémentaires et, finalement conduisant à la transduction du signal. En outre, elle peut conduire à la formation de complexes de signalisation actifs par le recrutement de partenaires possédant des domaines de liaison à l'ubiquitine (UBDs) qui reconnaissent les protéines ubiquitinylées^{268, 269, 270}. Tout comme les chaînes de type K63, l'ubiquitination linéaire régule positivement les événements de signalisation cellulaire^{269, 270, 271}. Les fonctions des autres chaînes de poly-ubiquitine sont beaucoup plus énigmatiques^{269, 270}. Le traitement avec des inhibiteurs du protéasome conduit à un enrichissement non seulement de chaînes de type K48 mais également des types K11, K29 et K33 suggérant un rôle dans la dégradation des protéines. L'ubiquitination de type K11 serait ainsi impliquée spécifiquement dans la dégradation des protéines régulant le cycle cellulaire^{269, 270, 272}. Enfin, les chaînes de type K6 semblent être liées aux dommages à l'ADN^{269, 270}.

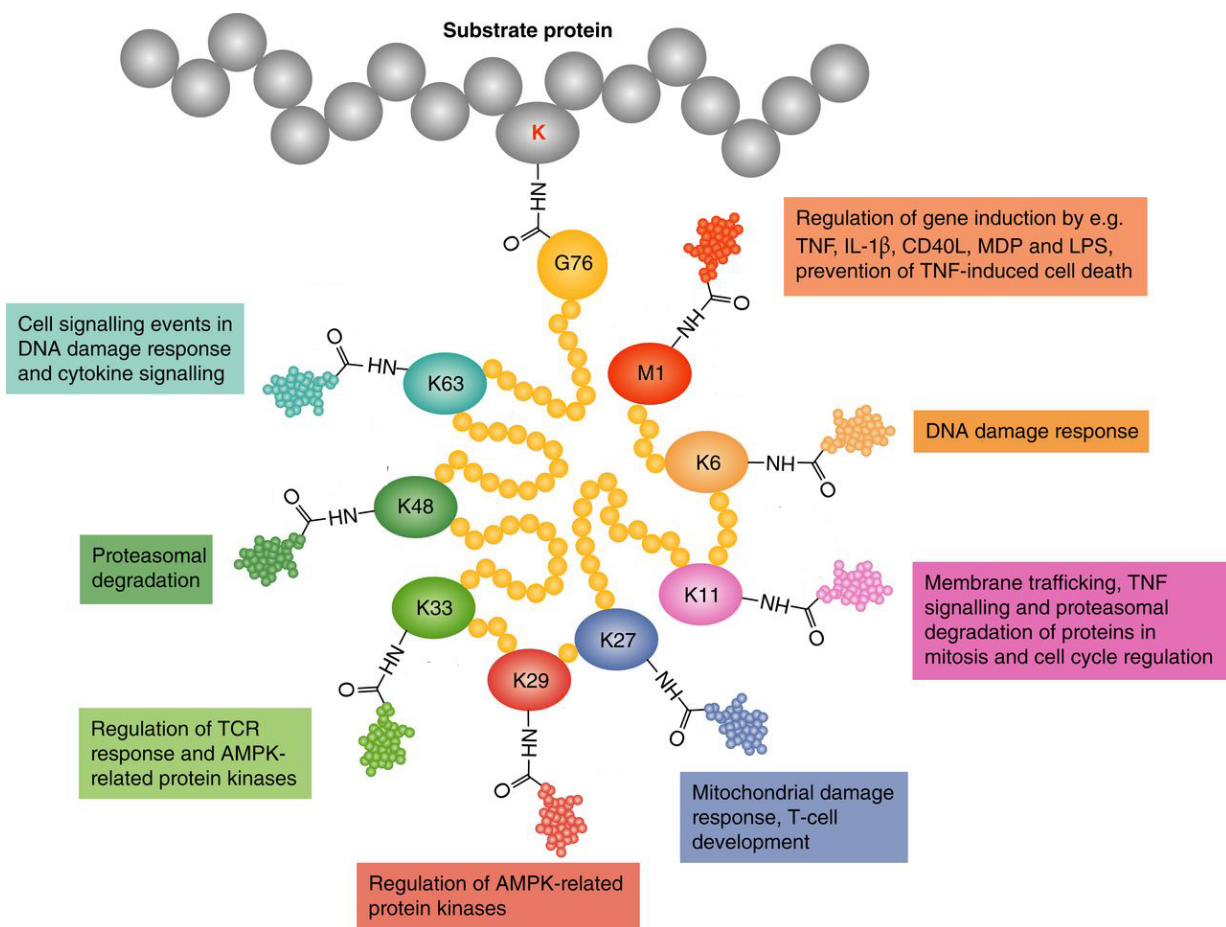


Figure 15 : Les types d'ubiquitination et leurs fonctions²⁷³

3. Réversibilité de l'ubiquitination : la déubiquitination

L'ubiquitination est une réaction réversible grâce à l'action d'enzymes appelées déubiquitines ligases ou déubiquitinases (DUBs), capables d'hydrolyser les liaisons isopeptidiques entre les molécules d'ubiquitine au sein des chaînes de poly-ubiquitine ou entre l'ubiquitine et la protéine cible^{274, 275}.

Une étude *in silico* menée par Nijman et ses collaborateurs a permis de déterminer une centaine de DUBs codées par le génome humain, qui peuvent être classées selon leur mécanisme catalytique, en deux familles : les protéases à cystéine et les métalloprotéases. La famille des protéases à cystéine se décompose en 5 sous-groupes distincts par la structure et la séquence de leur domaine catalytique : les protéases spécifiques de l'ubiquitine (USP), les hydrolases des ubiquitine en C-terminal (UCH), les protéases otubain (OTU), les protéases de la maladie de Machado Joseph (MJD), les protéines induites par la protéine chimiotactique des monocytes (MCPIP)^{276, 277} (Figure 16). La famille des métalloprotéases ne contient quant à elle que le seul groupe des protéases JAMM (JAB1/MPN/Mov37)^{276, 277}. Les USPs constituent la plus grande partie des DUBs, avec environ 60 membres. Elles sont caractérisées par deux motifs courts et conservés, les « boîte histidine » et « boîte cystéine » contenant les résidus impliqués dans la protéolyse de l'ubiquitine. La fixation de l'ubiquitine engendre un changement conformationnel les rendant actives et ce mécanisme est spécifique de l'ubiquitine²⁷⁸. Les UCHs, au nombre de 4 chez l'homme, fonctionnent comme les USPs et semblent plus spécifiques des petites protéines ubiquitinylées, car elles possèdent une boucle exiguë qui empêche la catalyse de longues chaînes de poly-ubiquitine. Les 14 OTUs, identifiés par homologie de séquence avec la protéine de la drosophile *otu*, possèdent au sein de leur site catalytique, actif de manière constitutive, un résidu asparagine, en plus des résidus cystéine et histidine, ce qui leur confère leur spécificité²⁷⁹. Les MJDs ont été identifiées suite à l'étude de l'Ataxin-3, qui montre une triade catalytique au site actif comparable aux autres DUBs, bien que le domaine catalytique de la protéine soit différent. C'est l'instabilité d'une répétition nucléotidique CAG dans le gène Ataxin-3 à l'origine de la maladie neurologique appelée maladie de Machado-Joseph qui leur a valu leur nom. La fonction normale d'Ataxin-3 consistant à effectuer un contrôle qualité « ubiquitine dépendant » des protéines²⁸⁰. Au sein des DUBs, la famille des MCPIPs est la seule des protéases à cystéine à être dépourvue d'une « boîte histidine » dans son domaine catalytique. Elle présente un domaine riche en prolines au niveau de son extrémité C-terminale, un domaine conservé CCCH de type doigt de zinc dans sa région centrale et une extrémité N-terminale conservée, les deux dernières régions

étant importantes pour son activité catalytique^{276, 281}. Les JAMMs, hautement conservées au cours de l'évolution, forment la seule famille de DUBs à activité métalloprotéase à zinc ; 12 membres ont été à ce jour identifiés chez l'homme. Elles sont recrutées au cours du trafic vésiculaire et du recyclage des récepteurs²⁸².

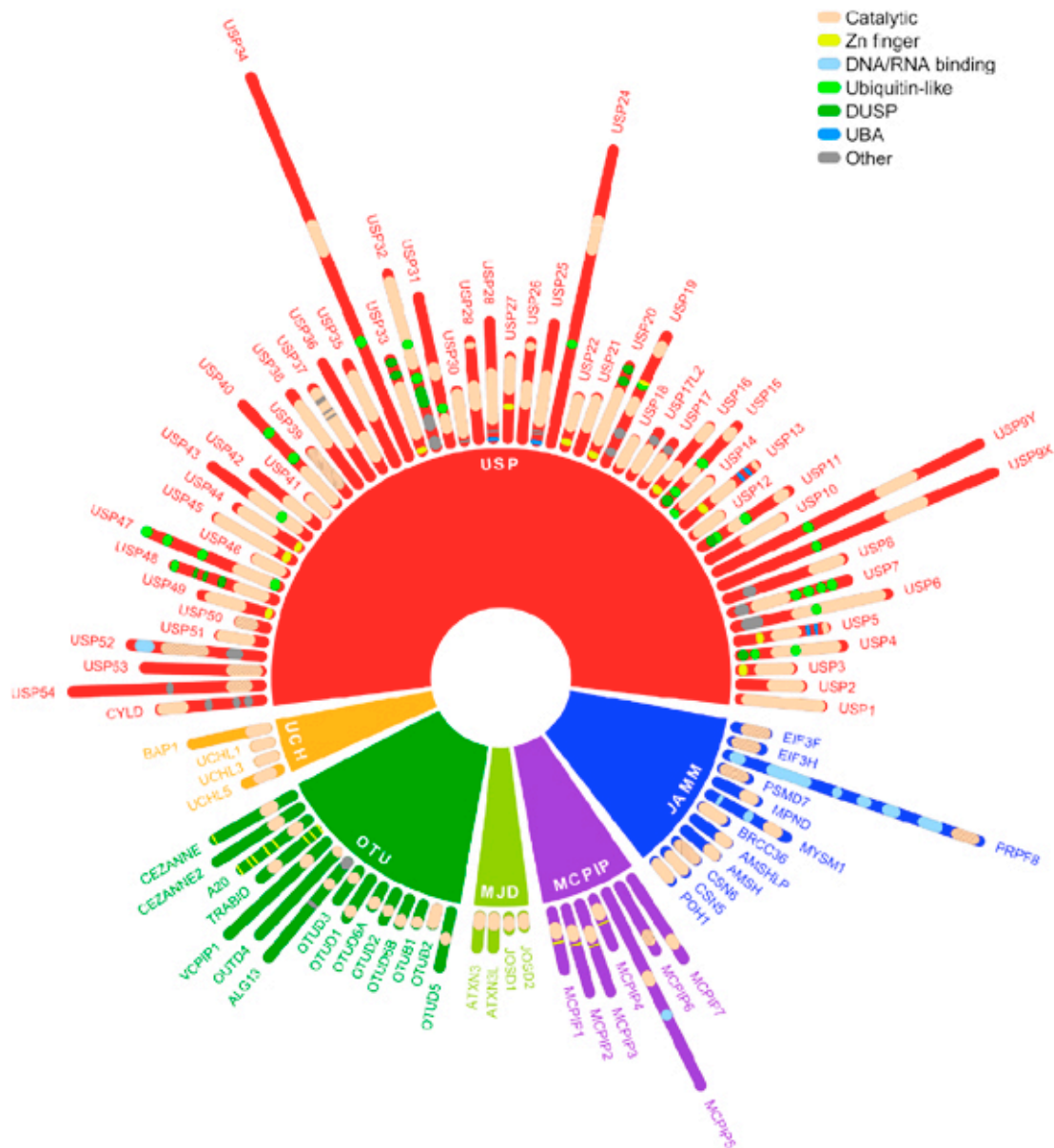


Figure 16 : Classification des DUBs humaines²⁷⁶

Le mécanisme déterminant la spécificité de chaque famille de DUBs à un certain type d'ubiquitination n'a pas encore été élucidé. Toutefois, des analyses fonctionnelles et structurales indiquent que les USPs et les OTUs sont spécifiques de chaînes de type K48, K63 et K11, alors que les MJDs et JAMMs ne reconnaissent que les chaînes de type K63.

Les DUBs sont essentielles à différentes fonctions cellulaires²⁸³. D'une part, le processus de déubiquitination participe à la maturation des molécules d'ubiquitine, synthétisées sous forme de précurseurs associés à des protéines ribosomales, desquelles elles doivent être dissociées afin de devenir fonctionnelles. D'autre part, ce processus est déterminant pour le recyclage de l'ubiquitine et l'initiation du processus de protéolyse, qui nécessite le clivage préalable de leur étiquette Ub avant d'être dégradée. Par ailleurs, il a été montré que la déubiquitination des protéines possédant un polymère K48 inférieur à quatre molécules d'ubiquitine permettait de les sauver de la dégradation. La déubiquitination est également indispensable au bon fonctionnement du protéasome 26S impliqué dans la protéolyse des protéines ubiquitinylées. En effet, les DUBs permettent de protéger la sous-unité 26S du protéasome des polymères d'ubiquitine libres qui pourraient entrer en compétition avec des protéines ubiquitinylées et inhiber ainsi leur dégradation. Enfin, les DUBs peuvent agir de manière plus spécifique sur des protéines ubiquitinylées en modulant leur activation et être ainsi à l'origine de l'arrêt ou de l'initiation de la transduction de la signalisation²⁷⁶

A l'instar des autres protéases, la régulation des DUBs est finement contrôlée afin de prévenir le clivage de substrats inappropriés. A ce titre, la majorité des DUBs, notamment les USPs et UCHs, sont synthétisées sous forme inactive, et ce n'est qu'après leur association avec une molécule d'ubiquitine qu'elles acquièrent une conformation catalytiquement compétente. Des niveaux de régulations supplémentaires peuvent être mis en jeu pour contrôler leur activité catalytique, telles que des régulations transcriptionnelles ou des modifications post-traductionnelles susceptibles d'affecter l'activation, la localisation ou la demi-vie des DUBs.

2. L'ubiquitination comme régulateur de l'immunité

1. Régulation des différents PRRs et de leur adaptateur moléculaire

1) Les TLRs et leurs adaptateurs Myd88 et TRIF

L'ubiquitination de type K48 permet la régulation subtile des TLRs et de leurs protéines signalisatrices associées, agissant alors comme une boucle de rétro-contrôle négative, empêchant l'activation prolongée du système immunitaire inné.

Triad3A, est une E3 ubiquitine ligase qui se lie et ubiquitinye plusieurs membres de la famille TLRs²⁸⁴. Initialement identifié comme un partenaire du TLR9 par un système de double-hybride chez la levure, des analyses plus détaillées ont montré qu'il interagissait également avec le TLR3, -4 et -5. La surexpression de Triad3A conduit à la poly-ubiquitination de type K48 et à la dégradation des TLR4 et -9, et dans une moindre mesure celle du TLR3 et -5. Conformément à ceci, la surexpression de Triad3A inhibe la capacité de signalisation de ces TLRs (Figure 17). Des études ultérieures ont indiqué que Triad3A peut également jouer un rôle en aval de ces PRRs et des RLRs, en ciblant deux molécules clés de la signalisation : RIP1 et TRAF3^{285, 286} (Figure 17 et 18).

C'est lors de stimulations par le TGF- β , qu'il a été découvert que le niveau d'expression de l'adaptateur MyD88 est également étroitement régulé par l'intermédiaire de cette ubiquitination²⁸⁷. Des études ultérieures ont montré que les E3 ubiquitine ligases Smurf 1 et 2 se lient à MyD88, interaction dépendante de Smad6, et conduisent à l'ubiquitination et la dégradation de MyD88, limitant ainsi la réponse inflammatoire induite par la signalisation des TLRs²⁸⁸ (Figure 17).

Nrdp1 est une E3 ligase qui conduit à la dégradation de MyD88, mais présente un rôle plus complexe dans la signalisation des TLRs. Outre son action de polymérisation de chaîne de type K48 sur Myd88 (Figure 17), Nrdp1 agit comme un régulateur positif sur TBK1 et sa signalisation associée²⁸⁹ (Figure 18). Ainsi, la double activité de Nrdp1 coordonne la signalisation d'un bras de la réponse TLR, tout en amortissant l'autre bras de cette voie.

Pour enrayer la signalisation du TLR3, TRIF est la cible d'une ubiquitination dégradative de type K48 par l'E3 ubiquitine ligase WWP2²⁹⁰. Suite à la stimulation du TLR3 par le Poly(I:C), les macrophages issus de la moelle osseuse de souris déficientes pour WWP2 affichent des niveaux d'IFN- β , de TNF α et d'IL-6 augmentés (Figure 17).

Enfin, plusieurs groupes ont démontré que l'ubiquitination de type K63 de la protéine proximale IRAK1 est nécessaire pour la signalisation en aval, consistant au recrutement de TAK1 et NEMO au niveau du complexe TRAF6^{291, 292, 293}. Il existe cependant une divergence quant à l'enzyme responsable de ce phénomène : bien que plusieurs études indiquent que les membres de la famille des E3 ligases Pellino sont responsables de l'addition des chaînes de poly-ubiquitine d'IRAK1^{292, 293}, d'autres ont suggéré l'implication de TRAF6 dans ce processus²⁹¹ (Figure 17). Par ailleurs, lors du recrutement de RIP1 au niveau du complexe TLR3-TRIF, Pellino 1 polymérise les chaînes d'ubiquitine K63 de cette protéine, permettant

alors le recrutement de TAK1 et NEMO et par conséquent l'activation de NF- κ B²⁹⁴ (Figure 17).

2) les RLRs et l'adaptateur MAVS

a) Activation via l'ubiquitination de type K63

Au cours des dernières années, il est devenu évident que l'ubiquitination de type K63 joue un rôle crucial dans la promotion de la signalisation des RLRs. Des expériences de spectrométrie de masse et des analyses biochimiques ont montré que les domaines CARDS de RIG-I sont ubiquitinylés par TRIM25, E3 ligase inductible par les IFNs et appartenant à la famille des protéines à motif tripartite (TRIM)²⁹⁵. Cette étude montre que suite à une infection virale, TRIM25 se lie via son domaine SPRY au premier domaine CARD de RIG-I ; son activité E3 ubiquitine ligase lui permet alors de conjuguer des chaînes de poly-ubiquitine de type K63 sur le résidu K172 du deuxième domaine CARD du senseur²⁹⁵. Ces chaînes permettent alors l'interaction de RIG-I avec MAVS, comme en témoigne les mutations du résidu K172 ainsi que celles du gène *trim25*, les deux réduisant considérablement l'ubiquitination de RIG-I ainsi que son interaction avec MAVS^{295, 296}. Des études fonctionnelles dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEF) déficients pour TRIM25 montrent un défaut de production des IFNs de type I suite à une infection par le VSV ainsi qu'une forte augmentation des cellules infectées. A noter, qu'avec ou sans expression ectopique de TRIM25, aucune ubiquitination des domaines CARDS de MDA5 a été détectée²⁹⁵ (Figure 17).

RNF135 (également appelée Riplet et REUL) est une autre E3 ligase responsable de la polymérisation de chaînes de poly-ubiquitine de type K63 sur RIG-I^{297, 298}. Des études *in vivo* ont confirmé l'importance de cette enzyme dans l'activation de ce senseur : les souris déficientes pour RNF135 produisent moins d'IFNs et présentent une sensibilité accrue aux infections par le VSV par rapport aux souris sauvages²⁹⁹. Cependant, certains détails mécanistiques, notamment les résidus et les domaines cibles de l'ubiquitination restent incertains. Alors qu'une étude suggère que Riplet est responsable de l'ubiquitination des domaines CARDS²⁹⁷, d'autres ont démontré que les cibles de cette enzyme sont des résidus lysines présents dans le domaine C-terminal de RIG-I²⁹⁸. Dans ce dernier cas, une étude a également proposé un modèle d'activation de RIG-I via cette ubiquitination : lorsque le domaine CTD de ce senseur s'associe à l'ARN viral, RNF135 polymérise alors des chaînes d'ubiquitine sur le domaine RD de RIG-I entraînant alors son interaction avec l'E3 ubiquitine

ligase TRIM25. L'ubiquitination de RIG-I par cette seconde enzyme permet son oligomérisation et son association avec l'adaptateur MAVS³⁰⁰ (Figure 17).

Une étude récente a mis en évidence une troisième E3 ubiquitine ligase, TRIM4, impliquée dans la régulation de la transduction du signal de RIG-I. La surexpression de TRIM4 conduit à une augmentation de l'induction des IFNs après infection par le virus de Sendai, un paramyxovirus, connu pour être détecté par RIG-I³⁰¹. Une analyse plus détaillée a indiqué que TRIM4 interagit avec RIG-I et entraîne son ubiquitination de type K63 sur les résidus K154, K164, K172 des domaines CARDS. Cependant, le rôle physiologique et la contribution de cette ubiquitination dans l'immunité innée antivirale doit encore être déterminé (Figure 17). Un autre mécanisme de régulation a récemment été découvert et implique les granules de stress antiviraux (avSGs)³⁰². L'E3 ligase MEX3C se lierait à l'ARN viral, entraînant ainsi son interaction avec RIG-I à l'intérieur des avSGs. Cette étude a indiqué que les résidus K48, K99 et K169 de RIG-I sont ubiquitinilés par MEX3C, augmentant la production des IFNs. Bien que cette étude renforce l'hypothèse que la localisation subcellulaire de RIG-I peut être importante pour la détection d'ARN viral, le rôle exact de avSGs dans la signalisation immunitaire innée reste incertaine.

Malgré la capacité des chaînes de poly-ub de type K63 libres de s'associer à RIG-I, une étude structurale de ce senseur a prouvé que les chaînes d'ubiquitine covalentes permettent une meilleure stabilisation du senseur actif³⁰³.

L'ubiquitination de type K63 de RIG-I étant cruciale pour son activité, en réponse à une infection virale, il n'est pas surprenant que plusieurs DUBs est été identifiées pour contrecarrer cette modification. Au moins trois DUBs différentes sont impliquées dans l'inhibition de la signalisation médiée par RIG-I, via la suppression des chaînes d'ubiquitine : CYLD (discuté dans la partie III, 2, 3), USP21 et USP3. USP21 interagit avec RIG-I à la fois dans les cellules non infectées et lors des infections par le VSV et le SeV. Cette interaction conduit à la déubiquitination et par conséquent à la diminution de la production des IFNs³⁰⁴. Plus récemment, une étude a démontré qu'USP3 interagissait également avec RIG-I et présentait le même effet que USP21³⁰⁵. Fait intéressant, cette étude a également montré un effet régulateur négatif de USP3 sur l'activité de MDA5; cependant, le mécanisme précis par lequel USP3 affecte l'activité de MDA5 reste incertain, étant donné le rôle évasif de l'ubiquitination activatrice de type K63 de MDA5.

Enfin, l'adaptateur MAVS, présente une ubiquitination du résidu K500 de type K63, cependant l'enzyme qui en est responsable n'a pas encore été identifiée³⁰⁶ (Figure 17).

b) Ubiquitination dégradative de type K48

Parce que la production de cytokines et d'IFNs de type I, suite à une infection virale, doit être contrôlée pour éviter des effets secondaires nocifs à la cellule, la régulation négative de RIG-I est indispensable. Arimoto et ses collaborateurs ont montré que l'E3 ubiquitine ligase RNF125 induit l'ubiquitination de type K48 puis la dégradation de RIG-I, agissant alors comme une boucle de retrocontrôle négative en régulant les niveaux de ce senseur³⁰⁷. Cette étude souligne qu'RNF125 n'est pas spécifique de RIG-I puisqu'elle interagit, dans une moindre mesure, avec MDA5 et MAVS³⁰⁷. À noter que cette ubiquitination dégradative est contrecarrée par USP4, qui stabilise les niveaux de RIG-I permettant ainsi la prolongation de l'induction des IFNs. Après infection virale, les niveaux d'USP4 diminuent, démontrant que cette protéine permet la régulation de l'état d'équilibre de RIG-I³⁰⁸ (Figure 17).

Le LUBAC, composé des E3 ligase HOIL-1L et HOIP, utilise deux mécanismes distincts pour réguler négativement la signalisation médiée par RIG-I. D'une part, le LUBAC induit l'ubiquitination du domaine C-terminal de TRIM25, conduisant à sa dégradation protéasomale³⁰⁹. D'autre part, le domaine NZF (Npl4 zinc finger) de HOIL-1L entre en compétition avec TRIM25 pour la liaison à RIG-I³⁰⁹. Cependant, le groupe de ZJ Chen a montré que le LUBAC, entre leurs mains, n'a pas de rôle négatif sur la voie RIG-I¹³⁸. Au vu de cette divergence, d'autres études sont nécessaires notamment pour comparer l'impact de l'extinction de chacun des trois composants du LUBAC sur la signalisation de MAVS puisque certaines publications ont suggéré que bien que ces protéines soient associées, elles sont différenciellement impliquées dans des fonctions distinctes.

MDA5 est régulée de manière négative par une autre E3 ubiquitine ligase, TRIM13³¹⁰. La surexpression de cette enzyme inhibe la signalisation médiée par MDA5. En outre, les souris TRIM13 ^{-/-}, suite à une infection par l'EMCV, présentent des niveaux élevés d'IFNs de type I comparés aux souris WT. Cette étude n'a pas examinée spécifiquement l'ubiquitination de MDA5 par TRIM13; cependant comme cette enzyme possède un domaine RING fonctionnel, il est probable que le mécanisme de régulation décrit ci-dessus implique l'ubiquitination dégradative (Figure 17).

L'aggrégation de MAVS est un élément clé de la signalisation des RLRs¹³⁷, mais leur régulation commence seulement à être clarifiée. En plus d'ubiquitinyler RIG-I et renforcer son interaction avec MAVS, notre laboratoire a montré que TRIM25 ubiquitinyler cet adaptateur sur les résidus lysines 7 et 10 et induit sa protéolyse partielle³¹¹. Il a alors été proposé que MAVS sert de plateforme qui permet l'assemblage d'un complexe de

signalisation comprenant NEMO et TBK1. La dégradation partielle de MAVS par le protéasome libérerait alors le complexe de signalisation dans le cytosol, permettant ainsi la phosphorylation d'IRF3 par TBK1³¹¹. Plus récemment, les lysine 7 et 500 se sont révélées être ubiquitinylées par MARCH5, E3 ubiquitine ligase mitochondriale, qui dissout efficacement les aggrégats de MAVS en les ciblant spécifiquement pour la dégradation³¹² (Figure 17).

La dégradation complète de MAVS est alors exercée indépendamment par les E3 ubiquitine ligases RNF125, RNF5, AIP4 (Atrophin 1 Interacting Protein 4; également appelé ITCH) et Smurf 1 et 2^{313, 314, 315, 316}. RNF5 interagit avec le domaine C-terminal de MAVS en ciblant spécifiquement les résidus K362 et K461 pour catalyser des chaînes d'ubiquitine de type K48, aboutissant à sa dégradation protéasomale, en réponse à une infection virale³¹⁶. Absent des mitochondries, AIP4 est spécifiquement recruté lors d'une infection virale par PCBP2, permettant alors l'ubiquitination des résidus K371 et K420³¹⁵. En outre, AIP4 inhibe l'ensemble des cascades de signalisation mises en place par les différents PRRs en ubiquitinylant cIAP1, responsable de l'activation de TRAF3 et TRAF6, entraînant alors sa dégradation lysosomale. Enfin, Ndfip1 (NEDD4 family-interacting protein 1) se lie à MAVS et recrute Smurf 1, facilitant l'ubiquitination de sites encore inconnus au sein de MAVS³¹⁴ (Figure 17).

Fait intéressant, TRIM44 lutte contre l'ubiquitination dégradative de MAVS³¹⁷. Sa surexpression conduit à une meilleure stabilité de MAVS et à une augmentation de la production des IFNs de type I, en supprimant l'ubiquitination de MAVS, médiée par PCBP2/AIP4. Il convient de noter que TRIM44 est une protéine TRIM atypique : dépourvue du domaine RING finger, elle possède à la place un domaine ZF-UBP, se trouvant généralement chez les DUBs de la famille USP. D'autres études sont donc nécessaires pour définir le mécanisme précis par lequel TRIM44 stabilise MAVS, et en particulier si son activité de DUB joue un rôle dans la régulation de l'adaptateur (Figure 17).

3) Ubiquitination de STING

L'ubiquitination joue un rôle primordial dans la fonction de signalisation de STING. Initialement, deux E3 ubiquitines ligases, TRIM56 et TRIM32, ont été décrites comme régulant positivement l'activation d'IRF3 médiée par STING^{318, 319}. Suite à l'induction des IFNs, TRIM56 interagit avec STING et polymérise des chaînes d'ubiquitine de type K63, facilitant la dimérisation de ce dernier et son association avec TBK1³¹⁸. De même, TRIM32

s'associe avec STING au niveau des mitochondries et du RE, favorisant l'activation de la signalisation en aval³¹⁹. Récemment Wang et ses collaborateurs ont proposé un modèle inattendu quant au mécanisme de recrutement de TBK1 au niveau de STING³²⁰. En réponse à la stimulation de l'ADN cytoplasmique, AMFR (autocrine motility factor receptor), E3 ligase résidente du RE, interagit avec STING, mécanisme dépendant Insig1 (insulin-induced gene 1) et conjugue des chaînes d'ubiquitine de type K27. TBK1 se lie alors sélectivement aux chaînes de type K27, et non à celle de type K63, s'intégrant ainsi au signalosome formé par STING. Des études fonctionnelles ont alors révélé que l'inhibition de l'une de ces protéines ou le knock out d'un de ces gènes abolit la production d'interféron et nuit considérablement aux défenses de l'hôte contre les infections au HSV-1³²⁰ (Figure 17).

Plusieurs E3 ubiquitine ligases, ayant un rôle négatif dans la régulation de la signalisation dépendante de STING, ont été également identifiées. RNF5 se lie à STING et conjugue des chaînes de poly-ubiquitine de type K48 sur son résidu K150, ayant pour conséquence sa dégradation protéasomale³²¹. RNF26, favorise quant à lui la polymérisation de chaînes d'ubiquitine de type K11 sur le résidu K150 de STING, également cible de RNF5³²². Cette ubiquitination entre donc en compétition avec celle de type K48, stabilisant la protéine. RNF26 facilite également la dégradation autophagique d'IRF3³²². Ainsi au cours de l'infection virale, RNF26 favorise la signalisation antivirale en protégeant STING de la dégradation, en phase plus tardive, RNF26 sert de rétrocontrôle négatif en induisant la dégradation d'IRF3³²². Enfin, la dégradation ubiquitine dépendante de STING est également médiée par TRIM30 α , enzyme induite lors de l'infection par le HSV-1 dans les cellules dendritiques³²³ (Figure 17).

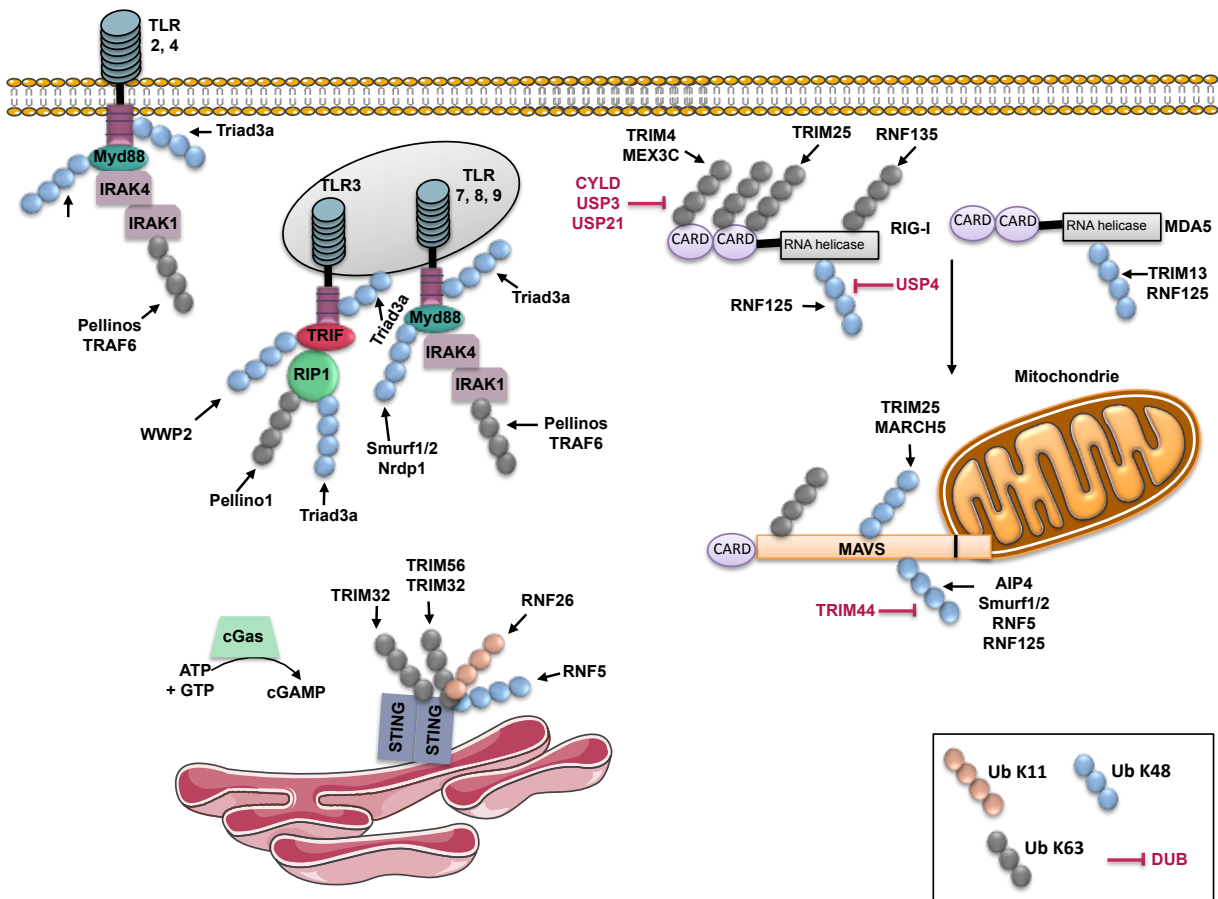


Figure 17: Régulation par Ubiquitination des différents PRRs et leurs adaptateurs

2. Régulation par l'ubiquitination de la signalisation en aval des PRRs

Bien que les TLRs, les RLRs et cGas utilisent des protéines adaptatrices distinctes, la signalisation en aval de celles-ci converge vers des molécules de signalisation communes, la famille des E3 ubiquitine ligases TRAFs (TRAF2, -3, -5 et -6) et les kinases TBK1 et IKK ϵ , conduisant à l'activation des facteurs de transcription IRF3/7 et NF- κ B.

1) Ubiquitination de type K63 et activation des protéines kinases

L'une des premières fonctions de l'ubiquitination de type K63 a été décrite pour l'activité transductrice de TRAF6³²⁴. L'engagement des récepteurs associés à Myd88 et MAVS, conduit au recrutement de l'E3 RING ubiquitine ligase TRAF6, qui génère des chaînes de poly-ubiquitination de type K63, essentielles pour le recrutement et l'activation

des complexes TAK1/TAB et IKK. Il a été démontré que TRAF6 catalyse sa propre ubiquitination et des chaînes libres de type K63^{324, 325}. Cette ubiquitination joue un double rôle, en stabilisant le taux de TRAF6 et en servant d'échaffaudage pour le recrutement de TAB2, qui recrute et active à son tour TAK1³²⁶. L'ubiquitination est également responsable du recrutement de NEMO, qui à son tour recrute IKK α et IKK β , ce dernier pouvant alors être phosphorylé par TAK1^{100, 109} (Figure 18).

L'activation d'IRF3, autre versant de l'engagement de TRIF et MAVS suite à la stimulation des RLRs et certains TLRs, conduit au recrutement de l'E3 RING ubiquitine ligase TRAF3. Tout comme TRAF6, TRAF3 est capable de s'auto-ubiquitiner, processus dépendant de l'enzyme E2, Ubc5³²⁷. Les chaînes de poly-ubiquitine de type K63 ainsi formées permettent le recrutement de NEMO, qui se lie alors à un complexe comprenant les protéines TANK et TBK1 / IKK ϵ . Une fois activée, TBK1 phosphoryle IRF3 et IRF7, induisant la transcription des ISGs (Figure 18).

Au moins trois E3 ubiquitine ligases ont été identifiées pour l'ubiquitination de type K63 de TBK1, autre cible importante de ce processus. Une analyse protéomique globale des composants de l'immunité innée chez l'homme, a désigné Mind Bomb 1 et 2 (MIB1/2) comme responsable de l'ubiquitination de TBK1 sur les résidus K69, K154 et K372. Une analyse détaillée a alors montrée que l'ubiquitination de TBK1 par les MIBs est critique pour le recrutement de NEMO et la réponse antivirale, suite à la détection des ARNs viraux³²⁸. Il semblerait que MIB2 se lie au niveau d'une région très conservée entre les acides aminés 438-442 de MAVS, motif essentiel pour l'ubiquitination de TBK1 par cette E3 ligase³²⁹. Des expériences de siRNAs dirigés contre TRAF3 ont permis de souligner l'implication de cette dernière dans la poly-ubiquitination et l'activation de TBK1/IKK ϵ ³³⁰. Enfin, il semblerait que l'E3 ubiquitine ligase Nrdp1, favorise l'expression des IFNs de type I, au détriment des cytokines pro-inflammatoires. Nrdp1 ubiquitinyler et active TBK1 suite à l'engagement de TRIF, simultanément, elle polymérise des chaînes d'ubiquitine de type K48 sur Myd88, régulant négativement l'activation de NF- κ B²⁸⁹. Récemment, une analyse structurale a révélée que l'ubiquitination de type K63 sur les résidus K30 et K401 de TBK1 est requise pour son activité enzymatique³³¹ (Figure 18).

2) Ubiquitination de type K48 et modulation de la transcription des gènes antiviraux

Dans les macrophages, TRAF6 est ubiquitinylé par TRIM38 et empêche ainsi l'activation excessive de NF- κ B³³². Triad3A, connue pour son rôle dans la dégradation des TLRs, induit également l'ubiquitination de type K48 de TRAF3²⁸⁶. Cette enzyme cible donc de multiples protéines impliquées dans le signalisation immune, afin de down-réguler l'expression des gènes antiviraux médiée par IRF3 (Figure 18).

En outre, l'ubiquitination de type K48 de TBK1, observée tardivement après une infection virale, favorise la dégradation par le protéasome de cette kinase et met donc fin à la transduction du signal en aval de celle-ci. En effet, il a été montré que l'E3 ubiquitine ligase DTX4 est recrutée, via NLRP4, au niveau de TBK1 induisant l'ubiquitination de la kinase au niveau du résidu K670, conduisant finalement à la dégradation de TBK1³³³. De même, TRIP (TRAF-interacting protein), régule négativement les niveaux cellulaires de TBK1 en se liant directement à cette enzyme et en tant que E3 ubiquitine ligase promeut la polymérisation de chaînes de type K48³³⁴ (Figure 18).

Les IRFs font partie des protéines les plus étroitement régulées de la voie de signalisation conduisant à la production des IFNs de type I par un set de modifications post-transcriptionnelles, y compris l'ubiquitination. L'infection virale induit l'expression de certaines E3 ubiquitine ligases, notamment RBCK1 (RBCC protein interacting with PKC1 ; que l'on connaît également sous HOIL-1 Heme-oxidized IRP2 ligase-1, une sous-unité du LUBAC), responsable de l'ubiquitination de type K48 d'IRF3 et par conséquent de sa dégradation par le protéasome, agissant alors comme une boucle de rétrocontrôle négative quant à la transcription de gènes induits par ce facteur de transcription³³⁵. Une étude récente a identifiée TRIM26 comme l'enzyme conjuguant des chaînes de poly-ubiquitines de type K48 sur les résidus Lys70 et 87, déclenchant ainsi la dégradation de la forme active et nucléaire d'IRF3³³⁶. En outre, IRF3 activé subit une phosphorylation sur le résidu Ser339, favorisant ainsi l'interaction du peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 (Pin1), protéine nucléaire favorisant la dégradation d'IRF3³³⁷. L'E3 ubiquitine ligase alors recrutée par Pin1 reste inconnue, cependant la localisation nucléaire de TRIM26, fait d'elle un candidat potentiel. L'enzyme TRIM21 est décrite à la fois comme un régulateur positif, en agissant comme un compétiteur de l'isomérase Pin1 pour la liaison à l'IRF3, inhibant ainsi son ubiquitination et sa dégradation et comme régulateur négatif via son activité E3 ubiquitine ligase ciblant alors IRF3^{338, 339}. Elle modifierait également IRF7 après l'activation du TLR7 ou 9, bien que les sites accepteurs d'ubiquitination de ces deux facteurs de transcription

restent inconnus³³⁸. Enfin, FoxO1 (forkhead box protein O1), régulateur de la signalisation de l'insuline, se lie à IRF3 et favorise sa dégradation par le recrutement d'une E3 inconnue. Cette protéine régule également négativement la transcription d'IRF7³⁴⁰ (Figure 18).

L'ubiquitination dégradative K48 est quant à elle essentielle pour l'activation de NF- κ B. Suite à l'activation de cette voie, les I κ Bs sont phosphorylés par le complexe kinase IKK. Cette phosphorylation génère un motif dégron reconnu par un complexe d'E3 ligase appelé SCF *via* une protéine à motif conservé « F-Box » appelée β TrCP. Le SCF contient également la protéine Cullin 1 (Cul1), une protéine adaptatrice, SKP1 (S-phase kinase-associated protein 1) ainsi qu'une E3 ligase ROC1 (Regulator of cullins 1). L'E3 ligase ROC1, appelée également RBX1 (RING-box protein 1), est à l'origine du recrutement d'une enzyme E2 pour catalyser la poly-ubiquitination de type K48 d'I κ B phosphorylé. Ainsi, I κ B phosphorylé et ubiquitinylé est sélectivement dégradé par le protéasome 26S, libérant ainsi le facteur de transcription NF- κ B³⁴¹ (Figure 18).

3) Régulation de la protéine NEMO

En accord avec de nombreuses études, NEMO est crucial pour la réponse antivirale^{100, 109}. L'activation de NEMO, suite à sa polyubiquitination de type K63, est essentielle à l'activation du complexe IKK et à la transduction du signal en aval¹⁰⁰.

En 2010, Arimoto et ses collaborateurs ont montré que l'activation des facteurs de transcription IRF3 et NF- κ B, dépend de la liaison d'un polymère de poly-ubiquitine de type K27 sur NEMO, catalysée par l'E3 ubiquitine TRIM23³⁴².

Une étude ultérieure a démontré que NEMO est également modifié par des chaînes d'ubiquitine de type K29, catalysées par TRAF7. Ce marquage conduit quant à lui à la dégradation lysosomale de NEMO³⁴³.

Cette protéine est également la cible, sur les résidus K285 et K309, d'une ubiquitination linéaire, catalysée par le LUBAC. Cette ubiquitination conduit à la stabilisation des complexes TAK1/TAB et IKK due au recrutement de TAB2³⁴⁴. Cependant, l'ubiquitination linéaire de NEMO réprime la réponse médiée par RIG-I/MAVS. NEMO ubiquitinylé, interagit avec TRAF3, perturbant ainsi le complexe MAVS-TRAF3, essentiel pour la réponse antivirale³⁴⁵. D'autres études ont montré que NEMO, via son motif UBAN, se lie à des chaînes d'ubiquitine linéaires, indépendamment de sa propre ubiquitination³⁴⁶. Des études plus détaillées, seront cependant nécessaires pour comprendre l'interaction dynamique

de ces mécanismes de régulation ubiquitine dépendants qui modulent les réponses antivirales et pro-inflammatoires médiées par NEMO (Figure 18).

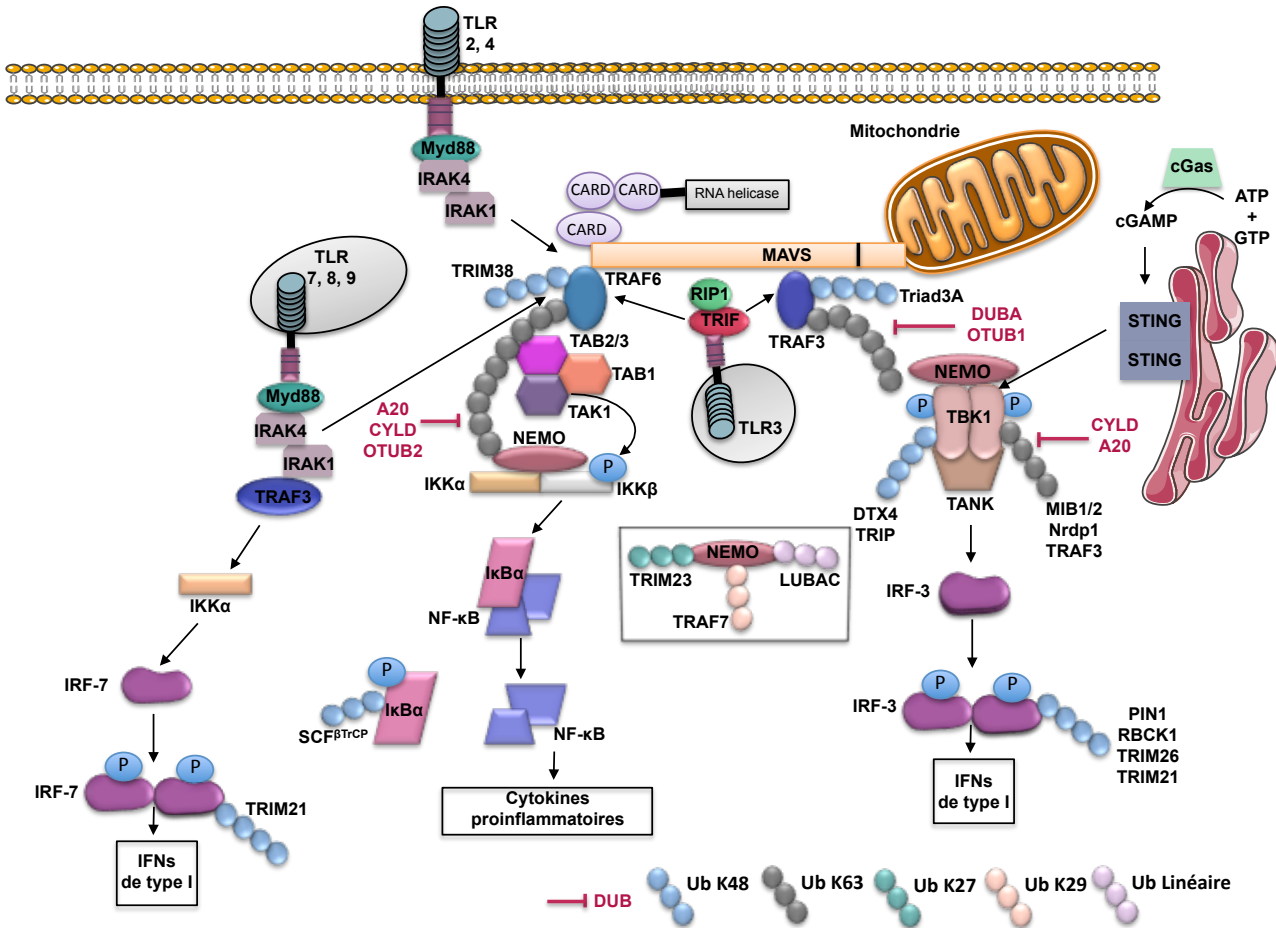


Figure 18 : Régulation par ubiquitination de la signalisation en aval des PRRs

3. Régulation de l'immunité innée antivirale par les DUBs

➤ CYLD

Cette protéine ubiquitaire a été initialement identifiée comme le produit d'un gène suppresseur de tumeur impliqué dans une maladie génétique, la cylindromatose³⁴⁷. Elle a par la suite été décrite comme étant impliquée dans la régulation de nombreuses voies notamment : NF-κB, la voie des MAPK et la signalisation antivirale. Cette protéine comprend un domaine catalytique de type USP qui lui permet de cliver les chaînes de poly-ubiquitine de type K63.

L'association directe de CYLD avec NEMO favorise la déubiquitination de ce dernier induisant ainsi l'abolition de l'activation de NF- κ B. Cette association permet également à CYLD d'utiliser NEMO comme site d'ancrage lui permettant l'accès aux chaînes de poly-ubiquitine de type K63 liées à certaines protéines clés de la signalisation, telles que TRAF2, TRAF6 et RIP1³⁴⁸ (Figure 18).

Une expression ectopique de CYLD, inhibe la signalisation aboutissant à l'activation d'IRF3 et la production d'IFN de type I induite par RIG-I, à l'inverse sa délétion stimule cette même réponse. En effet, CYLD est capable de retirer les chaînes de poly-ubiquitine de type K63 de RIG-I ainsi que de la kinase TBK1, responsable de la phosphorylation et l'activation d'IRF3, aboutissant ainsi à l'inhibition du signal^{349, 350} (Figure 17 et 18).

➤ DUBA

Des expériences de siRNAs visant à identifier des régulateurs négatifs de la production des IFNs de type I ont permis de caractériser la déubiquitinase A appelée DUBA, appartenant à la famille des OTUs. Ainsi l'absence de l'expression de cette enzyme augmente la réponse interféron aux PRRs, alors que sa surexpression l'abroge. D'autres expériences ont clairement démontré que son substrat est TRAF3. DUBA clive sélectivement les chaînes de poly-ubiquitine de type K63 de TRAF3, dissociant alors son interaction avec la kinase TBK1³⁵¹ (Figure 18).

➤ OTUB1 et OTUB2

Les déubiquitinases OTUB1 et OTUB2, membres de la famille OTU, sont également impliquées dans la régulation négative de la signalisation antivirale. En effet, ces deux enzymes interagissent avec TRAF3 et TRAF6, E3 ubiquitine ligase requises pour l'activation d'IRF3 et de NF- κ B respectivement, et induisent leur déubiquitination³⁵² (Figure 18).

➤ A20

Il s'agit de l'une des DUBs les plus étudiées et les mieux caractérisées. A20 est une protéine cytoplasmique induite par NF- κ B sur lequel elle exerce un rétrocontrôle négatif. A20 a la particularité de contenir à la fois un domaine OTU, en position N-terminale, lui conférant son activité de déubiquitinase, ainsi qu'un domaine en doigts de zinc, à son extrémité C-terminale, lui conférant une activité E3 ligase.

Au cours de l'activation du TNF-R, le domaine OTU de A20, catalyse la dissociation des chaînes de poly-ubiquitine de type K63 de la kinase RIP1. D'autre part, elle favorise *via* son domaine à doigts de zinc, l'ubiquitination de type K48 de RIP1 induisant sa dégradation par le protéasome³⁵³. Fait intéressant, A20 est essentiel pour limiter l'ubiquitination de TRAF6 après stimulation des TLRs, mettant fin à l'activation de NF- κ B suite au recrutement de Myd88 et TRIF³⁵⁴. Parce que TRAF6 et RIP1 sont impliqués dans l'activation de NF- κ B suite à la stimulation des TLRs, il est possible qu'A20 puisse également moduler l'ubiquitination et déubiquitination de RIP1 après l'engagement de ce récepteur (Figure 18).

En réponses aux infections virales, des expériences ont prouvé que la surexpression d'A20, inhibe non seulement l'activation de NF- κ B mais également celle des promoteurs ISRE et IFN β , soutenant ainsi son implication dans un rétro contrôle négatif visant à contenir la réponse antivirale^{355, 356, 357}. Suite à la stimulation du TLR3 et à l'infection par le virus de la maladie de NewCastle, Saitoh et ses collaborateurs ont démontré l'interaction d'A20 avec les kinases TBK1/IKK- ϵ et son rôle dans l'inhibition de l'activation d'IRF3³⁵⁶. Des études supplémentaires ont alors offert un mécanisme moléculaire supplémentaire : en réponse à une infection virale, A20, TAX1BP1 et ABIN1 forment un complexe protéique qui va alors perturber l'interaction entre TBK1 et TRAF3, interférant ainsi avec l'activité E3 ubiquitine ligase de TRAF3 et l'activation de TBK1^{330, 358}. Cependant, l'étude menée par Lin et ses collaborateurs montre que la surexpression de A20 abolit complètement l'activité d'un gène rapporteur ISRE, en réponse à la surexpression d'une forme constitutivement active de RIG-I (Δ RIG-I), mais partiellement ou pas du tout après surexpression de TRIF et TBK1, respectivement. Ces résultats semblent montrer qu'A20 est plus fortement et spécifiquement impliqué dans la régulation négative des RLRs et que cette action à lieu en amont de la kinase TBK1, contrairement à la régulation de la signalisation des TLRs³⁵⁵ (Figure 18).

Description du projet

L'immunité innée antivirale repose en grande partie sur la synthèse et la sécrétion des interférons de type I (IFN- α/β) par les cellules infectées et les cellules immunitaires. Ces dernières expriment des récepteurs invariants : les PRRs (Pathogen Recognition Receptors) qui reconnaissent, d'une part, des molécules aux motifs structuraux très conservés appelées PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern), essentielles à la survie et la pathogénicité des microorganismes et d'autre part les DAMPs (Damage/Danger Associated Molecular Pattern), conséquences métaboliques de l'inflammation et des infections. Parmi ces récepteurs, les RIG-I-like Récepteurs (RLRs) et le Toll-Like Récepteur 3 (TLR3) détectent l'ARN viral respectivement au niveau du cytosol et des endosomes déclenchant ainsi la cascade de signalisation conduisant à l'activation d'IRF3 et de NF- κ B, facteurs de transcription impliqués dans la production d'IFN- α/β et de cytokines pro-inflammatoires respectivement.

L'activation de NF- κ B suite à l'engagement de ces immunorécepteurs requiert la mise en place de larges signalosomes formés suite au recrutement de différents adaptateurs au niveau des récepteurs engagés. Ces adaptateurs subissent des ubiquitinations non-dégradatives au niveau desquelles se fera le recrutement de complexes nécessaires pour la transduction du signal. Nous avons démontré dans un précédent travail que ces protéines ubiquitinylées s'accumulent au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) *via* la protéine réticulaire Métadhérine (MTDH) qui assure la propagation du signal NF- κ B. Grâce à des expériences de mutagenèse dirigée, nous avons démontré que l'ubiquitination est un prérequis nécessaire à l'adressage de ces protéines au RE.

L'objectif de mon travail de thèse fut donc de vérifier si un tel relais membranaire s'applique également au cours de la voie d'activation d'IRF3 aboutissant à la production des IFNs de type I et quels sont les mécanismes moléculaires participant à l'activation de ces protéines ubiquitinylées. Pour cela, nous utilisons des modèles de cellules HEK293T, de HeLa et de MEFs infectées par du virus Sendai, dont l'ARN simple brin est reconnu par l'hélicase RIG-I, ou bien des cellules HEK293T-HATLR3 stimulées par l'analogue synthétique de l'ARN double brin viral, le poly(I :C). Nous avons remarqué que les voies de signalisation initiées en aval des RLRs et du TLR3 aboutissent à une accumulation de la forme ubiquitinylée de TBK1, kinase impliquée dans la phosphorylation d'IRF3, au niveau d'une fraction dite des membranes lourdes, contenant l'ensemble des organites intracellulaires. Bien que l'ubiquitination de l'E3 ubiquitine ligase TRAF3 soit requise pour la transduction du signal, nous n'avons observé aucune accumulation de sa forme ubiquitinylée au niveau des membranes lourdes. Ceci suggère alors l'implication d'un relais

endomembranaire, en aval de TRAF3, pour une transduction optimale du signal aboutissant à la production des IFNs de type I. Mes travaux se sont alors concentrés sur l'étude de l'activation de TBK1. Dans cette optique nous avons, à l'aide de différents fractionnements cellulaires et de la microscopie confocale, cherché à identifier l'organite mis en jeu lors du relais endomembranaire impliquant TBK1. A partir du constat que l'activation de TBK1 passait par son adressage à l'un des organites de la cellule, la suite du travail a consisté en la recherche et la caractérisation de l'élément capable de recruter et in fine d'activer TBK1 au niveau de celui-ci, permettant alors la phosphorylation d'IRF3 et par conséquent la production des IFNs de type I.

En résumé, ce projet devrait permettre de mieux comprendre l'activation de TBK1, kinase avec un rôle clef dans l'immunité innée mais également impliquée dans certains cancers. Par extension, cette étude va permettre de mieux comprendre comment la cellule infectée produit une réponse antivirale efficace contre les virus à ARN, via les IFNs de type I.

Résultats

THE GOLGI APPARATUS ACTS AS A PLATFORM FOR TBK1 ACTIVATION AFTER VIRAL RNA SENSING

Pourcelot M, Zemirli N, Silva Da Costa L, Loyant R, Garcin D, Vitour D, Munitic I, Vazquez A, Arnoult A

L'immunité innée antivirale repose en grande partie sur la synthèse et la sécrétion des interférons de type I (IFN- α/β) par les cellules infectées et les cellules immunitaires. Ces dernières expriment des récepteurs invariants : les PRRs (Pathogen Recognition Receptors) qui reconnaissent des molécules aux motifs structuraux très conservés appelées PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern), essentielles à la survie et la pathogénicité des microorganismes. Parmi ces récepteurs, les RIG-I-like Récepteurs (RLRs) et le Toll-Like Récepteur 3 (TLR3) détectent l'ARN viral respectivement au niveau du cytosol et des endosomes déclenchant ainsi la cascade de signalisation conduisant à l'activation d'IRF3 et de NF- κ B, facteurs de transcription impliqués dans la production d'IFN- α/β et de cytokines pro-inflammatoires respectivement.

De récents travaux dans notre laboratoire suggèrent un rôle critique des organites et plus particulièrement du réticulum endoplasmique (RE), dans l'activation de NF- κ B au cours de l'immunité innée et adaptative (*Alexia et al., 2013*). Ce relais membranaire semble concerner spécifiquement les protéines ubiquitinylées impliquées dans la transduction du signal aboutissant à l'activation de NF- κ B. Ces données nous ont encouragé à étudier si un tel relais membranaire pouvait également exister lors de l'activation d'IRF3, aboutissant à la production des IFNs de type I. Pour ce faire nous avons tout d'abord examiné la localisation cellulaire des protéines ubiquitinylées impliquées dans cette voie de signalisation.

Cela nous a conduit à observer que les voies de signalisation initiées en aval des RLRs et du TLR3 aboutissent à une accumulation de la forme ubiquitinylée de TBK1, kinase impliquée dans la phosphorylation d'IRF3, au niveau d'une fraction dite des membranes lourdes, contenant l'ensemble des organites intracellulaires. Bien que l'ubiquitination de l'E3 ubiquitine ligase TRAF3 est requise pour la transduction du signal, nous n'avons pas observé d'accumulation de sa forme ubiquitinylée au niveau des membranes lourdes. Ceci suggère alors l'implication d'un relais endomembranaire, en aval de TRAF3, pour une transduction optimale du signal aboutissant à la production des IFNs de type I.

Suite à la stimulation des RLRs et du TLR3, les différentes expériences de fractionnement cellulaire et d'immunofluorescence ont montré une accumulation de TBK1 ubiquitinylée et phosphorylée au niveau de l'appareil de Golgi. *In vitro*, il apparaît que la

fraction enrichie en appareil de Golgi de cellules infectées induit fortement la phosphorylation d'IRF3 recombinant en comparaison à la fraction enrichie en mitochondrie. Ce résultat confirme ainsi que la forme active de TBK1 est localisée au niveau de l'appareil de Golgi et non aux mitochondries contrairement à ce que l'on pouvait penser.

Il a été montré que l'ubiquitination K63 de TBK1 sur les résidus lysine 30 et 401 est primordiale pour son activation et donc pour la signalisation. Après confirmation que le double mutant pour ces lysines perd la capacité à induire la production d'IFNs de type I, nous avons démontré que celui-ci présente un défaut d'agrégation au niveau de l'appareil de Golgi, nous indiquant alors que l'ubiquitination de TBK1 est un pré-requis nécessaire à son adressage au Golgi.

Une étude récente a proposé que les chaînes d'ubiquitine associées à TBK1 étaient reconnues par des « senseurs » afin de permettre le rapprochement des molécules de TBK1 pour la trans-autophosphorylation de la kinase. Optineurine (OPTN), nous est apparu comme un candidat probable puisque en plus de posséder un Ubiquitin-Binding Domain (UBD), elle est localisée au niveau de l'appareil de Golgi. Les différentes expériences de bioluminescence, de biochimie, d'absorbance et de biologie moléculaire, réalisées dans des lignées cellulaires et dans des cellules issues d'un modèle murin, ont montré qu'en l'absence d' OPTN l'activation d'IRF3 et par conséquent la production des IFNs de type I était fortement diminuée. De plus, en son absence, TBK1 présente un défaut d'agrégation au niveau de l'appareil de Golgi. Ces observations ainsi que le fait que la forme de TBK1 présentant un défaut d'ubiquitination n'interagit quasiment plus avec OPTN nous a permis de proposer un modèle où la stimulation des RLRs et du TLR3 suite à une infection virale conduit à l'ubiquitination en K63 de TBK1. OPTN, au niveau de l'appareil de Golgi, agirait alors comme un senseur de cette protéine via ses chaînes d'ubiquitines, permettant ainsi sa dimérisation et sa transautophosphorylation. Une fois activée TBK1 peut alors phosphoryler IRF3 et permettre ainsi la production des IFNs de type I.

Enfin nous avons pu mettre en évidence l'importance d'OPTN dans la régulation des réponses antivirales, grâce à l'étude de la protéine Non Structural 3 (NS3) du BlueTongue Virus (BTV), qui interagit avec OPTN et entraîne alors une diminution d'interaction entre TBK1 et cette même protéine, conduisant *in fine* à une diminution de production des IFNs de type I.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



The Golgi apparatus acts as a platform for TBK1 activation after viral RNA sensing

Marie Pourcelot^{1,2,3}, Naima Zemirli^{1,2,3}, Leandro Silva Da Costa^{1,2,3}, Roxane Loyant^{1,2,3}, Dominique Garcin⁴, Damien Vitour⁵, Ivana Munitic⁶, Aimé Vazquez^{1,2,3} and Damien Arnoult^{1,2,3*}

Abstract

Background: After viral infection and the stimulation of some pattern-recognition receptors, TANK-binding kinase I (TBK1) is activated by K63-linked polyubiquitination followed by *trans*-autophosphorylation. While the activated TBK1 induces type I interferon production by phosphorylating the transcription factor IRF3, the precise molecular mechanisms underlying TBK1 activation remain unclear.

Results: We report here the localization of the ubiquitinated and phosphorylated active form of TBK1 to the Golgi apparatus after the stimulation of RIG-I-like receptors (RLRs) or Toll-like receptor-3 (TLR3), due to TBK1 K63-linked ubiquitination on lysine residues 30 and 401. The ubiquitin-binding protein optineurin (OPTN) recruits ubiquitinated TBK1 to the Golgi apparatus, leading to the formation of complexes in which TBK1 is activated by *trans*-autophosphorylation. Indeed, OPTN deficiency in various cell lines and primary cells impairs TBK1 targeting to the Golgi apparatus and its activation following RLR or TLR3 stimulation. Interestingly, the Bluetongue virus NS3 protein binds OPTN at the Golgi apparatus, neutralizing its activity and thereby decreasing TBK1 activation and downstream signaling.

Conclusions: Our results highlight an unexpected role of the Golgi apparatus in innate immunity as a key subcellular gateway for TBK1 activation after RNA virus infection.

Abbreviations: BMDM, Bone marrow derived macrophages; IFN, Interferon; IRF3, Interferon regulatory factor (IRF)-3; ISREs, IFN-stimulated response elements; MEF, Murine embryonic fibroblast; NF- κ B, Nuclear factor-kappaB; PBS, Phosphate buffered saline; PRRs, Pattern-recognition receptors; RLRs, RIG-I-like receptors; TLRs, Toll-like receptors; WT, Wildtype

Background

The innate immune response is the first line of defense against microbial pathogens, including viruses. After infection, the replication of a virus within host cells generates molecular signatures known as pathogen-associated molecular patterns. The antiviral immune response is dependent on germline-encoded pattern-recognition receptors (PRRs), which sense the presence of viral nucleic acids and trigger a series of signaling pathways leading to the rapid production of pro-inflammatory cytokines and type I interferons (IFN α /IFN β) [1, 2]. Once secreted, type I IFNs stimulate the transcription of IFN-stimulated genes to prevent the virus from spreading and to activate the adaptive immune response [3]. The loss of type I IFN

signaling leads to severe immunodeficiency with a high susceptibility to viral infection [4].

The various classes of PRRs involved in virus detection include endosomal Toll-like receptors (TLRs), cytosolic DexD/H-box retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors (RLRs) and cytosolic DNA receptors [1, 2]. All antiviral PRRs induce type I IFN expression, but the signaling components involved differ between PRRs. However, one common feature of all these signaling pathways is the recruitment of adaptor proteins to form a scaffold with the cellular ubiquitin ligases TRAFs. For instance, viral dsRNA in endosomes is detected by TLR3, whereas viral RNA in the cytosol is detected by RLRs, leading to the recruitment of TRIF and MAVS (this protein being anchored in the mitochondrial outer membrane), respectively. With the assistance of TRAFs and through polyubiquitination, these two adaptors then activate two cytosolic protein kinase complexes, one

* Correspondence: damien.arnoult@inserm.fr

¹INSERM, UMR_S 1197, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

²Université Paris-Saclay, Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article



consisting of the 'non-canonical' inhibitor of nuclear factor κ B kinase (IKK)-related TANK binding kinase 1 (TBK1) or its close homolog IKK ϵ , associated with various adaptor proteins, and the other containing IKK α , IKK β , and NEMO [1, 5, 6]. The IKK complex activates NF- κ B, promoting the production of pro-inflammatory cytokines, and NF- κ B activation requires the degradation of cytoplasmic inhibitors. By contrast, the transcription factors IRF3 and IRF7 are directly activated in the cytoplasm through TBK1-mediated phosphorylation, leading to their dimerization, translocation to the nucleus and the initiation of type I IFN production [3, 7].

TBK1 is a key regulator of type I IFN production. Indeed, the loss of TBK1 has a profound impact on type I IFN induction after viral infection [7–9]. TBK1 is constitutively expressed and TBK1 deficiency is embryo-lethal, due to the occurrence of high levels of hepatic apoptosis, a phenotype very similar to that of IKK β -deficient mice [10]. TBK1 activity is regulated by phosphorylation of the serine 172 residue within the classical kinase activation loop. The mechanisms of TBK1 activation are not clearly understood. Genetic and pharmacological inhibition studies have indicated that TBK1 can be activated by IKK β but that activation by *trans*-autophosphorylation is more likely [11, 12]. Post-translational modifications of some lysine residues of TBK1 through the addition of K63-linked polyubiquitin chains have been shown to be required for TBK1 activation and type I IFN production after viral infections [13, 14]. Moreover, it has been suggested that TBK1 autoactivation is dependent on the subcellular location of TBK1, with various adaptor proteins each directing TBK1 to discrete signaling complexes for different cellular responses [12, 15, 16].

We report here the targeting of ubiquitinated TBK1 to the Golgi apparatus after RLR or TLR3 stimulation, through interaction with optineurin (OPTN), an ubiquitin-binding adaptor protein [17]. OPTN senses the K63-linked polyubiquitin chains on TBK1, triggering the formation of TBK1-OPTN complexes, in which TBK1 is activated by *trans*-autophosphorylation. TBK1 then phosphorylates IRF3 to promote type I IFN production to establish an antiviral response. Interestingly, the Bluetongue virus NS3 protein neutralizes OPTN activity at the Golgi apparatus, thereby decreasing TBK1 activation and downstream signaling. Our observations thus reveal an unexpected new function of the Golgi apparatus in innate immunity.

Results

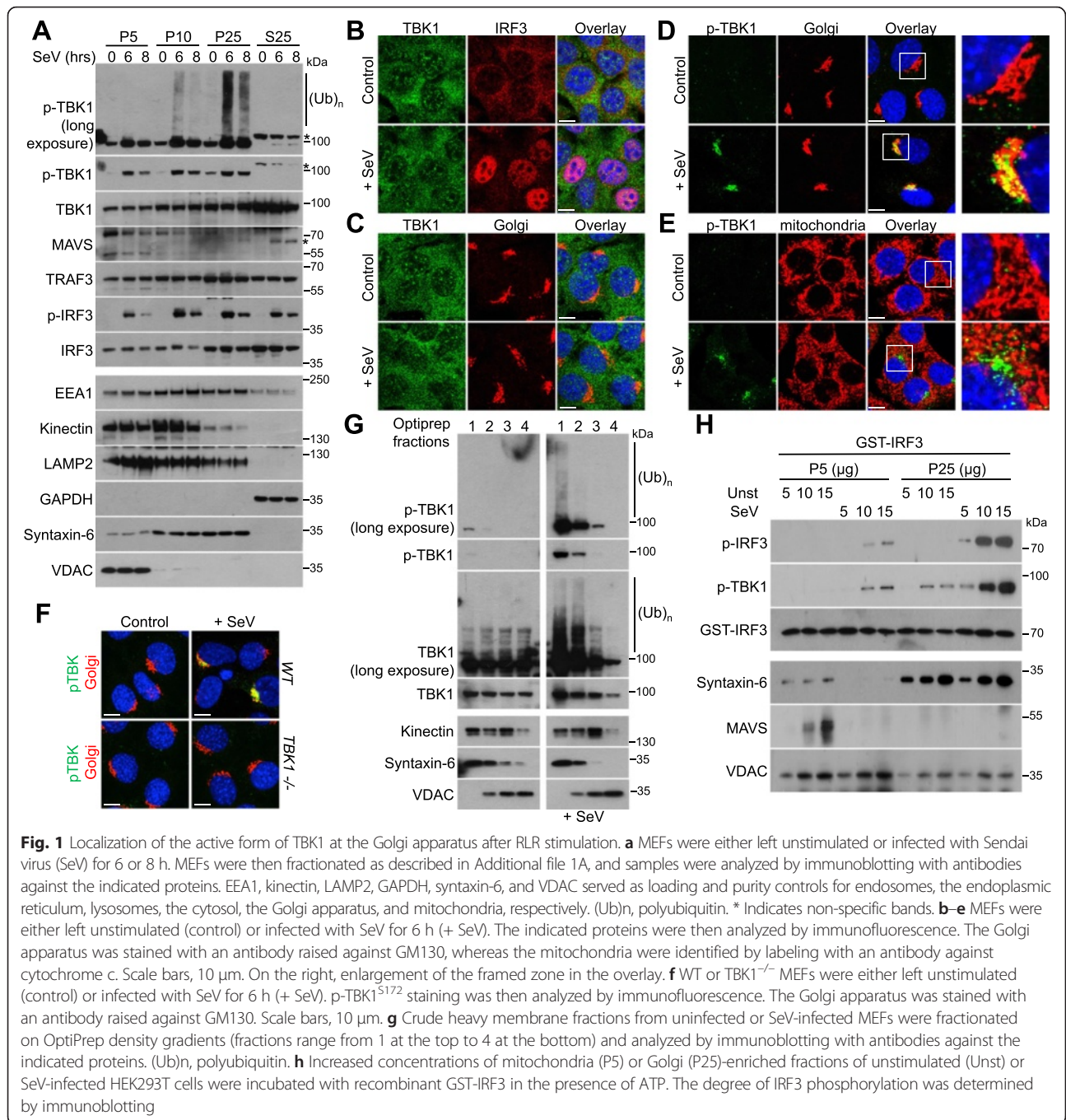
The active form of TBK1 localizes to the Golgi apparatus after RLR or TLR3 activation

We recently reported that ubiquitinated transmitters involved in NF- κ B activation accumulate at the surface of the endoplasmic reticulum [18]. This raised questions as to whether some endomembranes might also act as sites

of accumulation for ubiquitinated transmitters involved in activation of the transcription factor IRF3. To explore this hypothesis, murine embryonic fibroblasts (MEFs) were infected with Sendai virus to stimulate the RLR signaling pathway. Differential centrifugation was then used to separate the different membrane fractions, as indicated in Additional file 1A. With this approach, while a significant proportion of TBK1 was found in the cytosolic fraction (S25), unexpectedly, the ubiquitinated and phosphorylated active form of TBK1 (p-TBK1^{S172}) was detected mostly in the Golgi-enriched fraction (P25), and this TBK1 activation was associated with the phosphorylation of its substrate IRF3 (Fig. 1a). Immunofluorescence confirmed that IRF3 was activated, as it was translocated to the nucleus after infection (Fig. 1b). TBK1 staining was not affected by RLR activation (Fig. 1c), whereas p-TBK1^{S172} was detected at the Golgi apparatus (Fig. 1d and Additional file 1B), but not at mitochondria (Fig. 1e). Similarly, the infection of HeLa cells with Sendai virus led to a detection of the active form of TBK1 at the Golgi apparatus (Additional file 2A–E). TBK1^{-/-} MEFs confirmed the specificity of the used antibody raised against p-TBK1^{S172} (Fig. 1f) and, at later time points post-infection, we observed that the active form of TBK1 accumulates very close to the Golgi apparatus, at the centrosome (Additional file 1D and E). Importantly, RLR activation promoted the K63-linked polyubiquitination of TBK1, as previously reported (Additional file 2F) [13].

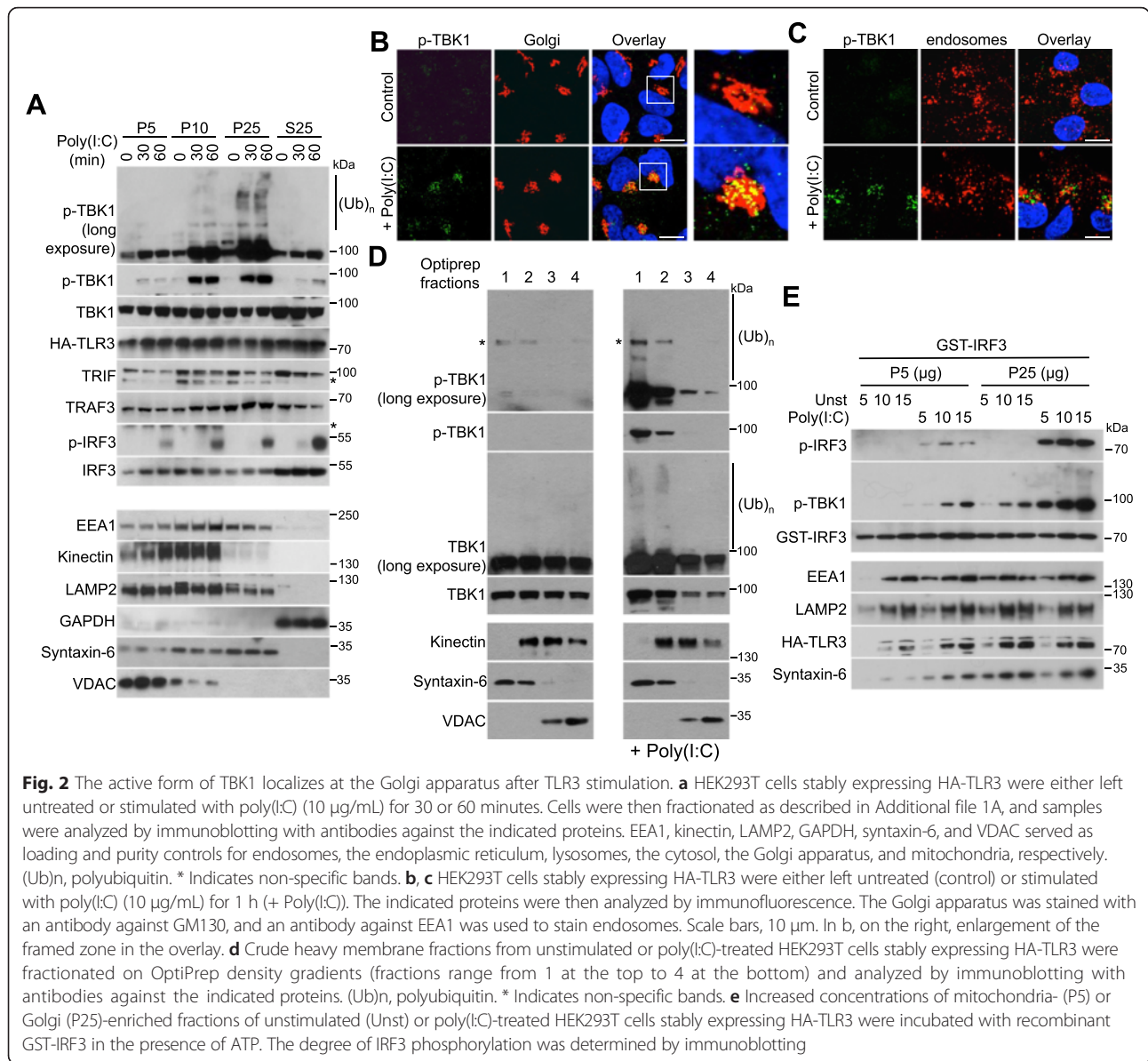
For further confirmation of the presence of the active form of TBK1 at the Golgi apparatus after RLR stimulation, cell fractions from control or infected cells were separated on Optiprep gradients to yield fractions enriched in Golgi apparatus, endoplasmic reticulum, or mitochondria. Unmodified TBK1 was detected in multiple fractions, whereas the ubiquitinated and phosphorylated protein was essentially limited to fractions enriched in the Golgi protein syntaxin-6 (Fig. 1g). p-TBK1^{S172} was also detected, using discontinuous density gradients, in Golgi membranes isolated from Sendai virus-infected cells (Additional file 1C).

Finally, to demonstrate that the active form of TBK1 was mostly located at the Golgi apparatus but not at the mitochondria after RLR stimulation, increased concentrations of mitochondria- (P5) or Golgi-enriched (P25) fractions of control or Sendai virus-infected cells were incubated with recombinant IRF3 in the presence of ATP. The mitochondria-enriched fraction of infected cells triggered the phosphorylation of recombinant IRF3, but this phosphorylation was significantly weaker than that observed with the Golgi-enriched fraction, in which most of the p-TBK1^{S172} was found (Fig. 1h). Our results are consistent with the reports that TBK1 does not sediment in the high molecular weight fractions together with the prion-like aggregates of MAVS at the mitochondria in response to Sendai virus infection [19, 20].



Within the endosomes, viral dsRNA is detected by TLR3, and the activation of this PRR leads to TBK1 activation after recruitment of the TRIF adaptor [2]. We therefore investigated whether active TBK1 was also found at the Golgi apparatus after TLR3 stimulation. HEK293 cells stably expressing HA-tagged TLR3 were stimulated with poly(I:C), an analog of viral dsRNA, and then differential centrifugation was performed to separate the various membrane fractions, as in Additional

file 1A. As observed after RLR stimulation, the ubiquitinated and phosphorylated active form of TBK1 was mostly present in the Golgi-enriched fraction (Fig. 2a). Immunofluorescence studies confirmed the presence of active TBK1 at the Golgi apparatus but not at the endosomes after TLR3 stimulation (Fig. 2b, c). Optiprep gradients further demonstrated that p-TBK1^{S172} was concentrated in the Golgi-enriched fraction (Fig. 2d) and that this fraction could phosphorylate recombinant IRF3 in vitro (Fig. 2e).

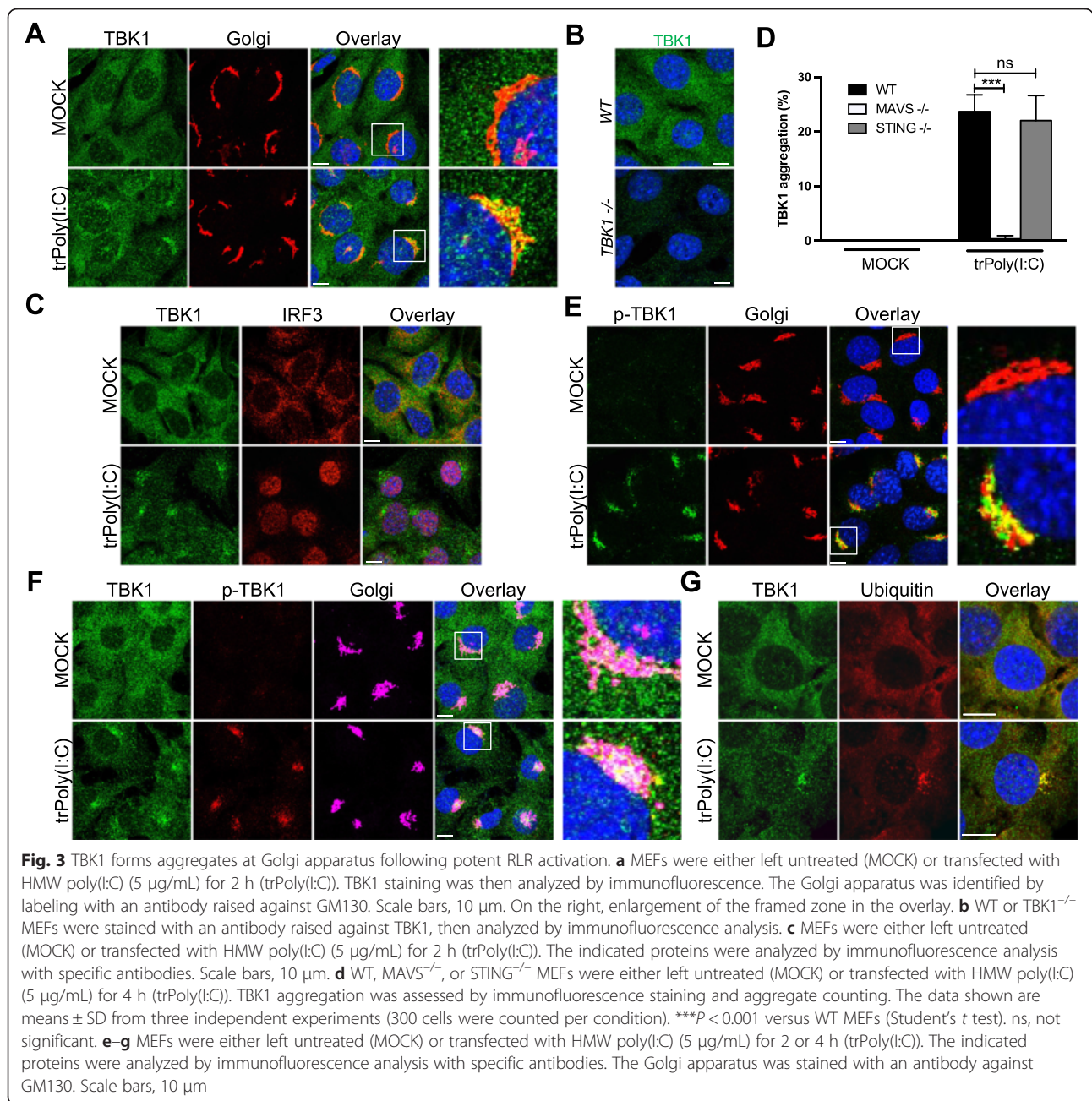


Thus, regardless of the viral pathogen-associated molecular pattern sensing location, i.e. cytoplasmic RLR or endosomal TLR, the active form of TBK1 is localized at the Golgi apparatus.

Potent RLR activation triggers TBK1 targeting and aggregation at the Golgi apparatus

After RLR stimulation, TBK1 activation is initiated at the mitochondria through the essential adaptor MAVS [2, 6]. However, active TBK1 was detected at the Golgi apparatus following Sendai virus infection suggesting the targeting of TBK1 to this organelle. This redistribution of TBK1 was further studied by stimulating RLRs in MEFs by transfection with poly(I:C), which is sensed in the cytosol by

RIG-I or melanoma differentiation-associated gene-5, in a size-dependent manner [21]. Interestingly, transfection with low- or high-molecular weight poly(I:C) for 2 hours triggered a TBK1 aggregation at the Golgi apparatus (Fig. 3a). TBK1 staining was lost in TBK1^{-/-} MEFs (Fig. 3b) confirming the specificity of the anti-TBK1 antibody and this TBK1 aggregation was also detected with another antibody raised against the kinase (Additional file 3A). TBK1 aggregation was associated with the nuclear translocation of IRF3 (Fig. 3c) and these aggregates do not co-localize with the autophagosomes (data not shown). Interestingly, 4 hours after poly(I:C) transfection, TBK1 accumulated at the centrosome, which is surrounded by the Golgi apparatus next to the nucleus (Additional file 3B, C).

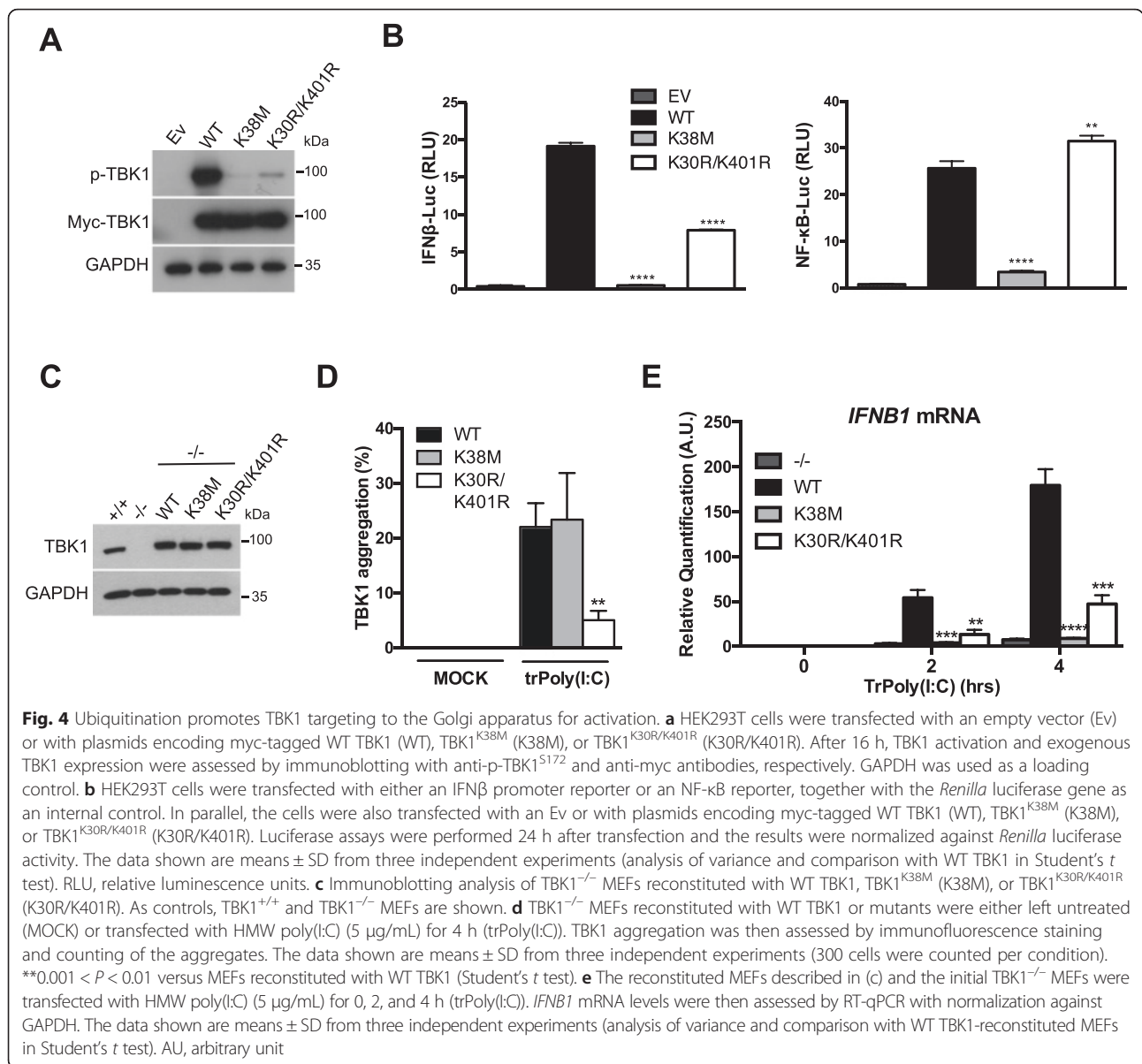


TBK1 aggregation was completely inhibited by transfection with poly(I:C) in MAVS^{-/-} MEFs but not in STING^{-/-} MEFs (Fig. 3d), STING being a crucial adaptor involved in cytosolic DNA sensing pathways anchored in the endoplasmic reticulum [22].

After the transfection of cells with poly(I:C), p-TBK1^{S172} was first detected at the Golgi apparatus (Fig. 3e) next at the centrosome (Additional file 3D and E) as observed during Sendai virus infection. Finally, as expected, the TBK1 aggregates consisted of the phosphorylated and ubiquitinated active form of the kinase (Fig. 3f, g and Additional file 4).

Ubiquitination targets TBK1 to the Golgi apparatus for activation

The K63-linked polyubiquitination of TBK1 on lysines 30 and 401 is required for the activation of this kinase [14]. Thus, whereas the overexpression of wildtype (WT) TBK1 led to activation of the kinase through *trans*-autophosphorylation, TBK1 activation was impaired after overexpression of the TBK1^{K30R/K401R} double mutant (Fig. 4a). The expression of a kinase-inactive mutant (K38M mutant) as a positive control did not trigger TBK1 activation (Fig. 4a). Consistent with these findings, significantly weaker stimulation of the IFN β promoter was observed in luciferase



assays after the overexpression of TBK1^{K30R/K401R} than with WT TBK1, and the promoter was not activated with TBK1^{K38M} (Fig. 4b). Interestingly, NF- κ B activation was not weaker with the polyubiquitination mutant than for the WT, whereas this activation was prevented with the kinase-inactive mutant (Fig. 4b).

Following our detection of ubiquitinated active TBK1 at the Golgi apparatus, we hypothesized that the targeting of TBK1 to the Golgi apparatus might be impaired in the absence of ubiquitination. We tested this hypothesis by reconstituting TBK1^{-/-} MEFs with WT or mutant TBK1 constructs (Fig. 4c), and then investigating TBK1 aggregation after transfection with poly(I:C). Stimulation triggered TBK1 aggregation in cells reconstituted with WT TBK1, but this aggregation was significantly

impaired with the K30R/K401R polyubiquitination mutant (Fig. 4d). In parallel, the expression of the IRF3 target gene *IFNB1* was analyzed. Transfection with poly(I:C) increased *IFNB1* mRNA levels in cells reconstituted with WT TBK1, but this response was abolished with the polyubiquitination mutant (Fig. 4e), as previously described [14]. We also reconstituted TBK1^{-/-} MEFs with the kinase-inactive mutant. TBK1 aggregation was unaffected (Fig. 4d), but the transcriptional response was completely inhibited (Fig. 4e). Thus, TBK1 polyubiquitination on conserved lysines 30 and 401 targets TBK1 to the Golgi apparatus in a process linked to the phosphorylation of the Ser172 residue in the kinase activation loop after dimerization [14]. These observations are consistent with the hypothesis developed from findings for structural

studies concerning the key role of cellular localization in the activation of TBK1 [12].

OPTN is required for optimal TBK1 activation after RLR or TLR3 stimulation

A structural study has also suggested that the binding of polyubiquitin chains triggers the higher-order oligomerization of TBK1-adaptor complexes, resulting in the *trans*-autophosphorylation and activation of the kinase [11]. As observed after RLR or TLR3 stimulation, the ubiquitinated and phosphorylated active form of TBK1 was detected at the Golgi apparatus. This suggested that an adaptor of ubiquitinated TBK1 was present at this organelle to promote the activation of TBK1. We identified optineurin (OPTN) as a likely candidate for this role. Indeed, this protein has an ubiquitin-binding domain (UBD) and a C-terminal ubiquitin-binding zinc finger (ZF), and is located at the Golgi apparatus [17, 23]. It has also been reported to be required for optimal TBK1 activation [24–28]. Immunofluorescence studies with three different antibodies against OPTN confirmed that a part of this protein is located at the Golgi apparatus (Additional file 5A), as previously reported [17, 23]. Moreover, OPTN was also detected in isolated Golgi membranes (Additional file 1C). Following infection with Sendai virus, leading to RLR activation, an increase in the association of TBK1 with OPTN was detected (Fig. 5a) and p-TBK1^{S172} was found in complex with OPTN in the Golgi-enriched fraction (Additional file 5B).

We then carried out assays on HEK293T cells with a luciferase reporter under the control of the IFN β promoter or driven by three copies of an NF- κ B enhancer. We found that stimulation of the IFN β promoter after RLR activation is impaired in cells in which OPTN expression was knocked down with two different siRNAs, whereas NF- κ B activation was unaffected (Fig. 5b). These results were confirmed with three other OPTN siRNAs (Additional file 6A). As a control, NEMO expression was knocked down, as this protein activates both the NF- κ B and IRF signaling pathways downstream from MAVS [29] and its loss inhibited both pathways (Fig. 5b). Biochemical studies in both HEK293T and HeLa cells confirmed that transfection with siRNAs against OPTN impairs TBK1 activation and subsequent signaling after RLR stimulation, but has no effect on the NF- κ B and ERK pathways (Additional files 6B and C). The infection of OPTN siRNA-transfected cells with another RNA virus, such as the vesicular stomatitis virus, to activate the RLRs, yielded similar results (Additional files 6D and E). Similarly, OPTN silencing in MEFs impaired TBK1 activation and IRF3 phosphorylation without altering NF- κ B or ERK signaling after Sendai virus infection (Fig. 5c). Importantly, TBK1 aggregation at the Golgi apparatus after poly(I:C) transfection was

prevented by the silencing of OPTN (Fig. 5d). This suggests that OPTN senses ubiquitinated TBK1 at the Golgi apparatus and promotes its activation, because the ubiquitination of TBK1 is required for its targeting to this organelle (Fig. 4).

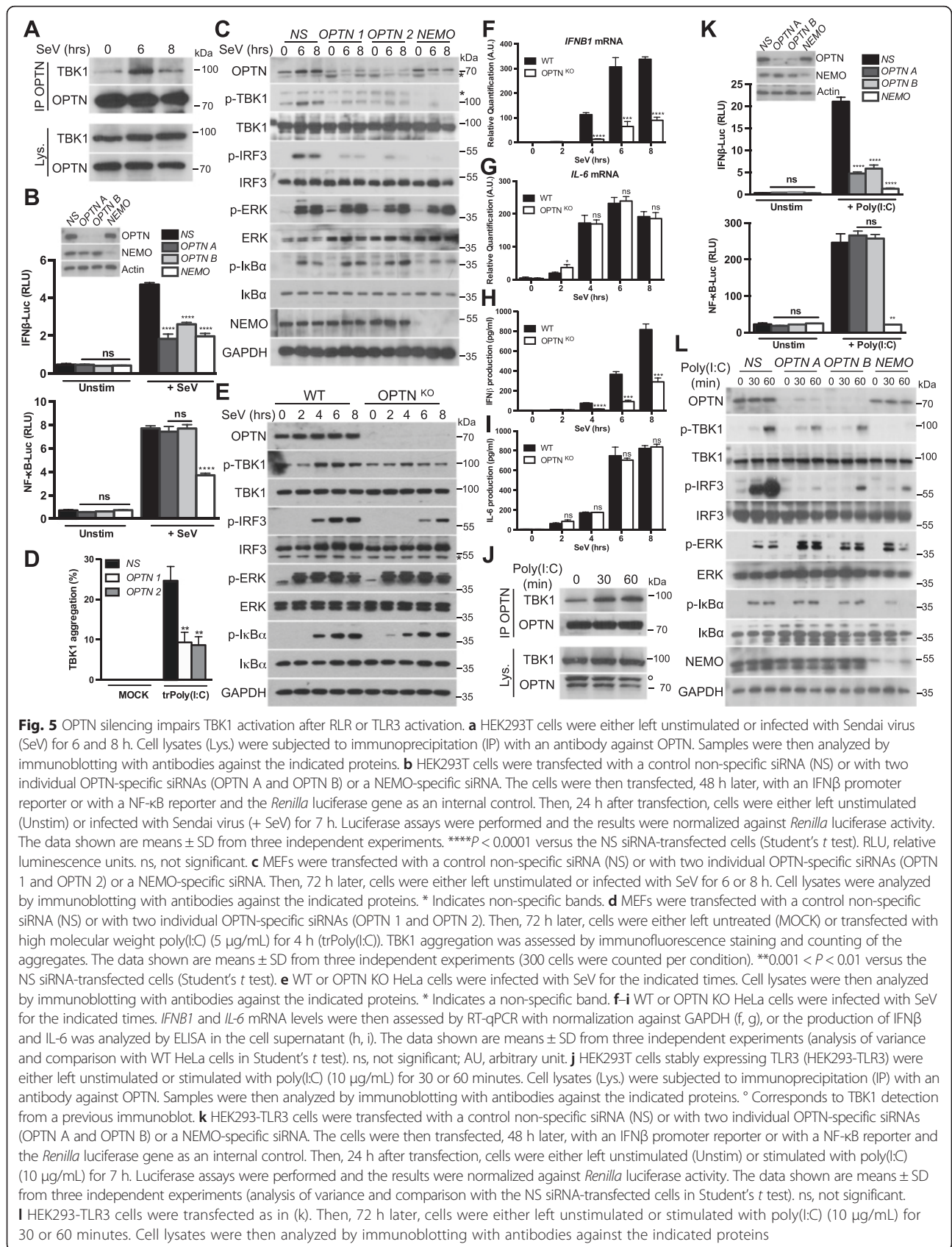
OPTN expression was also abolished with CRISPR/Cas9 technology in HeLa cells and the cells were then infected with Sendai virus. As expected, the IRF3 signaling pathway was decreased in OPTN knockout cells, whereas the NF- κ B and ERK pathways were not (Fig. 5e). Consequently, smaller amounts of IFN β were produced and secreted, but no effect was observed on the NF- κ B target IL-6 (Fig. 5f–i). Finally, the lack of OPTN did not affect the K63-linked polyubiquitination of TBK1 after RLR stimulation (Additional file 7).

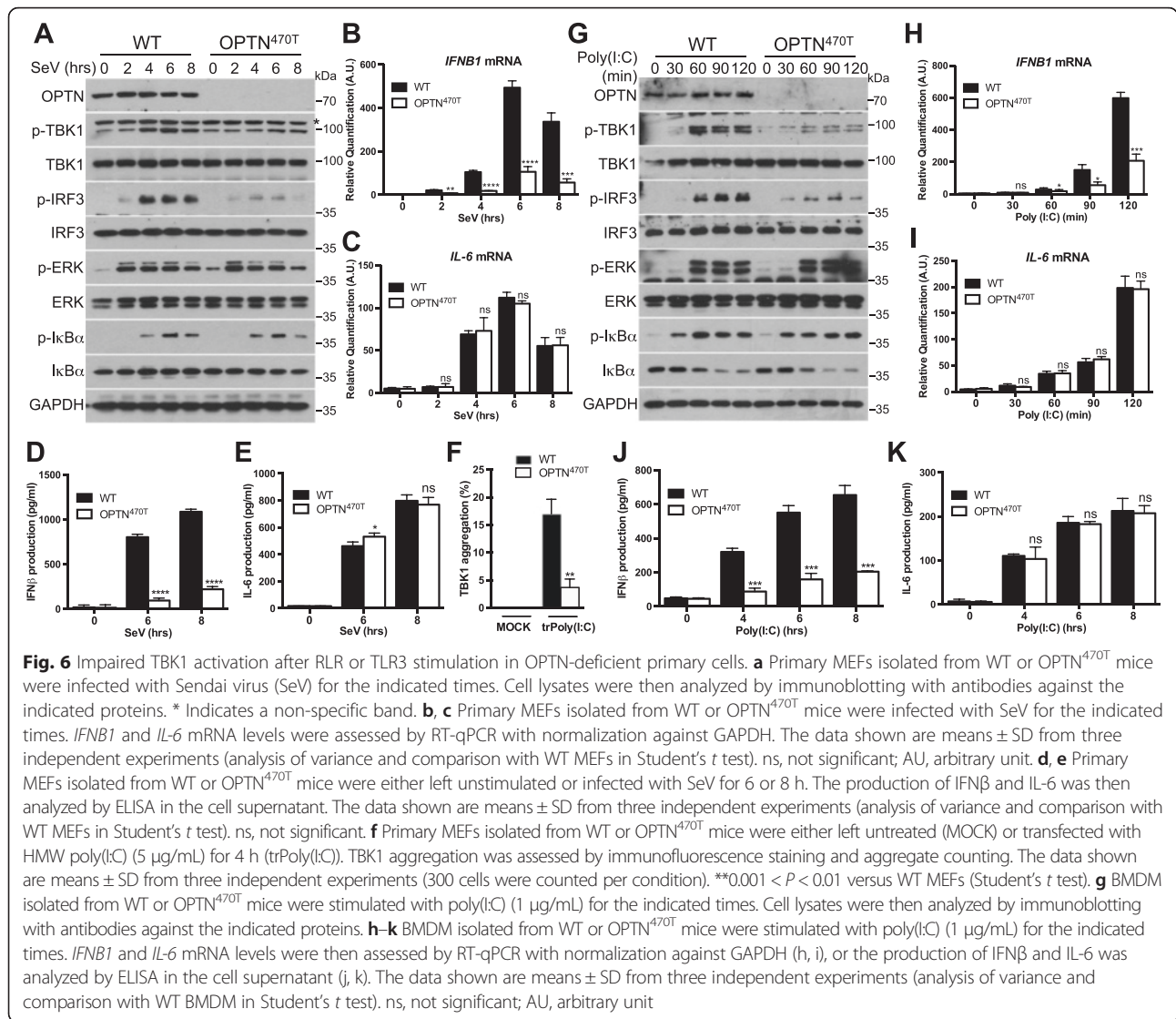
As ubiquitinated active TBK1 was uncovered at the Golgi apparatus after TLR3 stimulation (Fig. 2), we also explored the possible involvement of OPTN in TBK1 activation downstream from this PRR. Hence, an increased association between OPTN and TBK1 was detected after TLR3 stimulation (Fig. 5j). We then silenced OPTN, and both luciferase assays and immunoblots showed that knocking down the levels of this protein selectively inhibited the IRF3 signaling pathway (Fig. 5k, l and Additional file 6F).

OPTN insufficiency impairs TBK1 activation after RLR or TLR3 stimulation in primary cells

For further confirmation of the requirement of OPTN for TBK1 activation, we used primary cells from mice in which both the UBD and ZF domains of OPTN had been deleted (OPTN^{470T}) [27]. The truncated protein was produced in smaller amounts than the WT protein, allowing to investigate the effects of both defective Ub binding and OPTN insufficiency [27]. First, primary MEFs were infected with Sendai virus. OPTN^{470T} MEFs displayed weaker TBK1 activation than WT MEFs, together with lower levels of phosphorylation of IRF3, with no effect on ERK or NF- κ B signaling (Fig. 6a). Confirming these observations, levels of *IFNB1* mRNA and of IFN β release were lower in the OPTN^{470T} MEFs, whereas the production and secretion of IL-6 were unaffected (Fig. 6b–e). Furthermore, consistent with OPTN being required for recruiting ubiquitinated TBK1 to the Golgi apparatus, significantly less TBK1 aggregation was observed with the mutated OPTN (Fig. 6f). Finally, the comparison of WT and OPTN^{470T} bone marrow derived macrophages (BMDM) stimulated with poly(I:C) also confirmed that OPTN positively regulates TBK1 activation and downstream signaling after TLR3 stimulation without influencing NF- κ B or ERK signaling (Fig. 6g–k).

Together, our results suggest that OPTN recruits, at the Golgi apparatus, ubiquitinated TBK1 downstream from both RLRs and TLR3 in order to promote TBK1





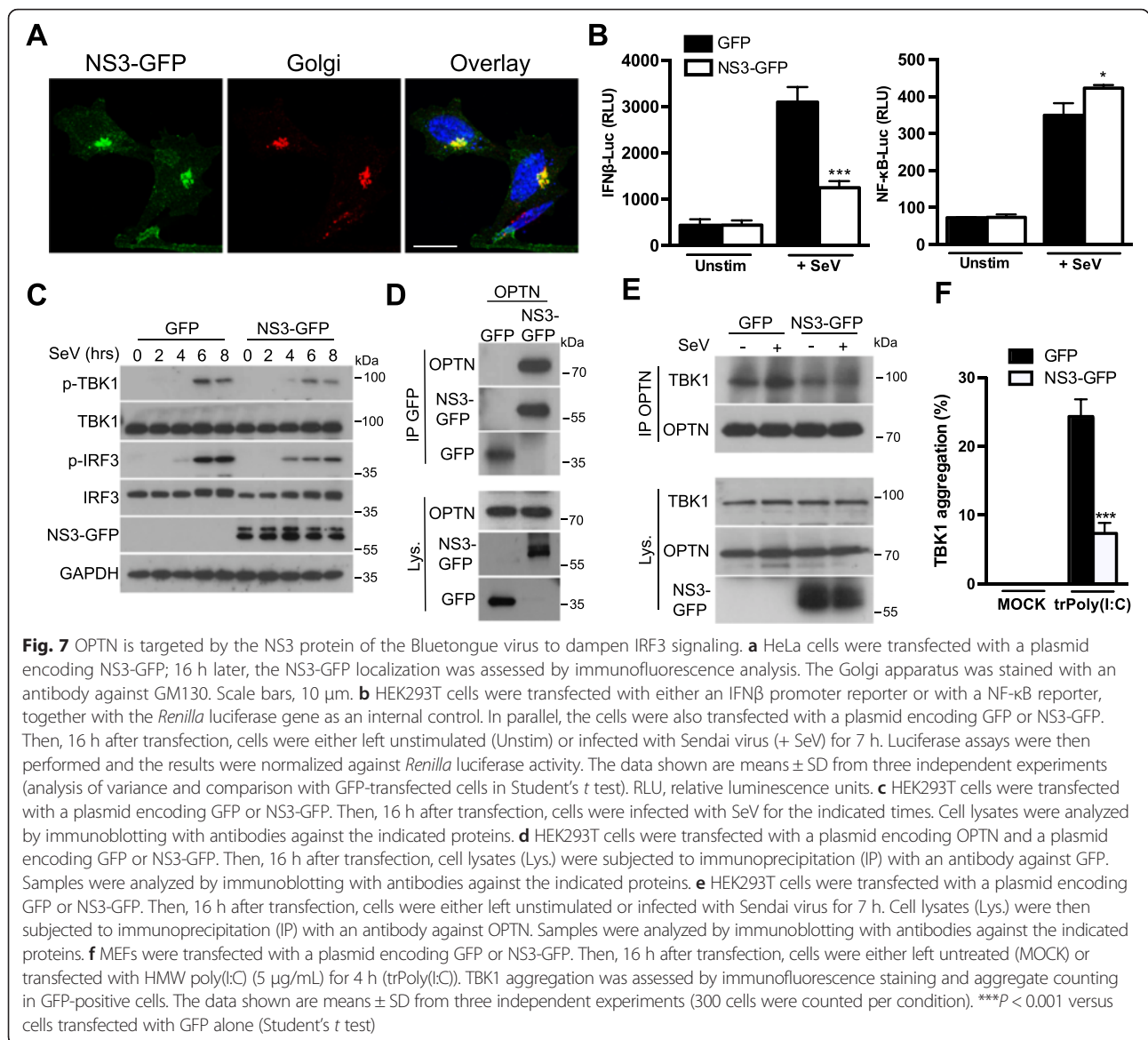
activation and a signaling pathway resulting in the production of type I IFNs.

The NS3 protein of the Bluetongue virus targets OPTN to dampen IRF3 signaling

Viruses have developed a battery of different strategies for overcoming the very sophisticated defense mechanisms of infected hosts. During the course of pathogen–host co-evolution, viruses have acquired an ability to inhibit the innate immune response by targeting host proteins [30]. Our results suggested that OPTN is important for TBK1 activation after RLR or TLR3 activation. We therefore hypothesized that there might be viral proteins capable of neutralizing the activity of OPTN, thereby preventing it from performing its function in innate immunity.

Non-structural protein 3 (NS3) of the Bluetongue virus, a dsRNA virus, has been localized to the Golgi

apparatus and shown to specifically modulate the type I IFN signaling pathway [31, 32]. We confirmed that NS3 expression led to the detection of this protein at the Golgi apparatus (Fig. 7a) and that, in luciferase assays, NS3 affected the stimulation of the IFNβ promoter but not NF-κB activation after RLR stimulation (Fig. 7b). Accordingly, NS3 expression decreased the phosphorylation of both TBK1 and IRF3 (Fig. 7c). As NS3 was targeted to the Golgi apparatus and decreased TBK1 activation, we then hypothesized that NS3 binds to OPTN to prevent it from activating TBK1. Immunoprecipitation experiments demonstrated that NS3 binds to OPTN (Fig. 7d) and, in cells expressing NS3, the association between OPTN and TBK1 was impaired after viral infection (Fig. 7e), accounting for the lower levels of TBK1 activation observed (Fig. 7c). Finally, TBK1 aggregation was inhibited in the presence of the viral protein,



confirming its ability to neutralize the activity of OPTN (Fig. 7f). Thus, the fact that OPTN is targeted by a viral protein to dampen type I IFN signaling reinforces our findings that OPTN is an important effector in TBK1 activation.

Discussion

Viral RNAs in endosomes are detected by TLR3, whereas those in the cytosol are detected by RLRs [2]. The stimulation of either of these PRRs leads to TBK1 activation and this kinase plays a crucial role in innate antiviral immunity through the phosphorylation of IRF3, which is required for the production of type I IFNs [7–9]. However, the precise molecular mechanisms underlying TBK1 activation are unclear. Surprisingly, after the stimulation of cells with

IL-1 β or TNF α , after mitophagy induction or in cancer dependent on KRAS signaling, TBK1 is phosphorylated whereas IRF3 is not [25, 26, 33, 34]. It has been therefore suggested that TBK1 autoactivation and substrate specificity are both dependent on the subcellular distribution of TBK1, with various adaptor proteins each directing TBK1 to discrete signaling complexes for different cellular responses [12, 15, 16]. Consistent with this hypothesis, we observed that the active form of TBK1 is present at the Golgi apparatus after the stimulation of RLRs or TLR3, and that its substrate, IRF3, is phosphorylated. In the case of mitophagy, p-TBK1^{S172} is recruited to depolarized mitochondria without IRF3 phosphorylation [25]. No significant accumulation of active TBK1 was detected at the Golgi apparatus after the treatment of cells with IL-1 β or

TNF α (data not shown), further suggesting that the presence of p-TBK1^{S172} at the Golgi apparatus is a prerequisite for the phosphorylation of IRF3 by this kinase.

A recent study has elegantly demonstrated that the adaptor proteins MAVS and TRIF (but also STING) harbor conserved domains that are phosphorylated by IKK β and/or TBK1 in response to stimulation [34]. Phosphorylated adaptor then binds to a positively charged surface of IRF3, thereby recruiting this transcription factor for its phosphorylation and activation by TBK1 [34]. While localized at the Golgi apparatus, active TBK1 does have the possibility to phosphorylate either MAVS or TRIF to promote IRF3 recruitment and ensuing activation of this transcription factor. Indeed, mitochondria (where MAVS anchors) and endosomes (where TRIF is recruited after TLR3 stimulation) through their dynamics or through their trafficking, respectively, are always in close proximity to the Golgi apparatus therefore permitting TBK1 to phosphorylate the adaptor proteins, a process required for IRF3 activation [34]. IRF3 phosphorylation around the Golgi apparatus, an organelle bordering the nucleus where this transcription factor migrates after activation, therefore reduces the possibility of IRF3 to meet phosphatases or E3 ubiquitin ligases that negatively regulate signaling.

A K63-linked polyubiquitination on lysines 30 and 401 is required in the process of TBK1 activation to permit this kinase to phosphorylate IRF3 [13, 14]. Our demonstration that this ubiquitination leads to the targeting of TBK1 to the Golgi apparatus for activation suggests that the ubiquitination sites of TBK1 (this kinase possesses more than 50 lysine residues conserved between humans and mice) might affect the subcellular distribution of this protein and the resulting signaling. It would be interesting to determine whether TBK1 is ubiquitinated after mitochondrial depolarization and, if so, on which lysine residues, for its targeting and activation at the mitochondria for mitophagy, as recently described [25, 26].

One key finding of this study is that ubiquitinated TBK1 is sensed by OPTN at the Golgi apparatus, promoting its *trans*-autophosphorylation after RLR or TLR3 stimulation. The binding of the K63-linked polyubiquitin chains on TBK1 to the UBD of OPTN probably triggers the oligomerization of TBK1-OPTN complexes, resulting in *trans*-autophosphorylation and TBK1 activation, as previously suggested [11] (Additional file 8). OPTN therefore appears to be a positive regulator of TBK1 activation through its polyubiquitin binding activity, as previously described [24, 27]. However, two other studies have suggested that OPTN negatively regulates TBK1 activation after RNA virus infection [35, 36]. We currently have no explanation for this discrepancy. Indeed, OPTN silencing with multiple siRNAs in HEK293T, HeLa cells, or MEFs, and OPTN knockout with CRISPR/Cas9 technology in HeLa cells, MEFs, and BMDMs from OPTN-deficient

mice clearly demonstrated an important role of this adaptor in TBK1 activation after RLR and TLR3 stimulation. Consistent with the involvement of OPTN in TBK1 activation, it has recently been reported that OPTN, again through its polyubiquitin binding activity, is required for TBK1 activation in response to mitochondrial depolarization [25, 26]. Moreover, during the preparation of this manuscript, a study reported that osteoclast precursors from OPTN mutant mice produced abnormally low levels of IFN β in response to RANKL [37]. Additionally, another study reported that BMDM from OPTN^{-/-} mice displayed impaired IRF signaling and low levels of type I IFN production in response to poly(I:C) [28]. Finally, further evidence for the involvement of OPTN in TBK1 activation is provided by our finding that the NS3 protein of the Bluetongue virus targets OPTN at the Golgi apparatus, decreasing TBK1 activation and the resulting IRF3 signaling. Thus, this RNA virus prevents OPTN from activating TBK1 as part of a strategy to modulate the innate immune response to facilitate its replication after infection. Consistent with this finding, other viruses have evolved strategies for targeting the adaptor proteins involved in TBK1 activation. The Vaccinia virus protein C6 binds TBK1 adaptor proteins (TANK, NAP1, and SINTBAD), thereby inhibiting the activation of IRF3 and IRF7 [38], and the Gn protein of hantaviruses disrupts the formation of TBK1 complexes, thereby blocking downstream responses [39].

In addition to acting as a sensor for ubiquitinated TBK1 at the Golgi apparatus for the kinase activation, OPTN has also been reported to be a substrate of TBK1. Indeed, phosphorylation of the Ser177 residue of OPTN by TBK1 increases the association of OPTN with LC3 during xenophagy for the clearance of cytosolic *Salmonella* and the restriction of intracellular bacterial proliferation [40]. Two independent studies have reported that RNA polymerase III detects DNA of viral or bacterial origin in the cytoplasm and induces type I IFNs via the RLR pathway [41, 42]. It therefore seems possible that stimulation of the RLR pathway after bacterial infection promotes TBK1 activation by OPTN at the Golgi apparatus and that, on the one hand, p-TBK1^{S172} triggers the production of type I IFNs and, on the other, the active kinase phosphorylates OPTN to induce the xenophagy of the invading bacteria.

OPTN is associated to Golgi apparatus through an interaction with Rab8 and the interacting domain of OPTN is localized between amino acids 141–209, comprising therefore Ser177 [43]. After TBK1 activation, the phosphorylation of OPTN [40, 44] may disrupt the association between OPTN and Rab8, therefore allowing TBK1-OPTN complexes [44] to leave the Golgi membranes to phosphorylate MAVS or TRIF at the mitochondria or endosomes, respectively, for IRF3 activation [34]. Our observation that p-TBK1^{S172} accumulates at

the centrosome at late time points after RLR activation strongly suggests that the active kinase is released from the Golgi membranes after its initial *trans*-autophosphorylation at this organelle.

Other adaptors, such as NAP1 or SINTBAD, have been reported to be involved in TBK1 activation during innate antiviral immunity [45, 46]. We found that, like OPTN, both NAP1 and SINTBAD were partially localized at the Golgi apparatus (Additional file 5C), providing further evidence for a critical role of this organelle in TBK1 signaling during innate immunity. Further studies are required to determine whether and how these adaptors act in concert at the Golgi apparatus to promote TBK1 activation. Indeed, the weak but nevertheless present, IFN- β response in OPTN-deficient cells suggests that factors other than OPTN contribute to TBK1 activity.

Conclusions

At the Golgi apparatus, we propose that, after RNA viral sensing, OPTN recruits ubiquitinated TBK1 via its UBD, leading to the *trans*-autoactivation of this kinase for the production of type I IFNs after IRF3 phosphorylation (Additional file 8). Our recent report that the Golgi-anchored E3 ubiquitin ligase RNF121 is a new player in the signaling leading to NF- κ B activation [47] suggests that the Golgi apparatus, in addition to its other known roles, acts as a hub for the formation and/or maturation of signalosomes, leading to activation of the IRF3 and NF- κ B signaling pathways. It remains to be determined whether other signaling pathways are relayed by the Golgi apparatus.

Methods

Cell culture and reagents

HEK293T and HeLa cells were obtained from ATCC. MEFs and HEK293T cells stably expressing TLR3 were obtained from Invivogen (San Diego, CA, USA). STING^{-/-}, MAVS^{-/-}, and TBK1^{-/-} MEFs were kindly provided by Dr. Glen Barber (Department of Cell Biology and Sylvester Comprehensive Cancer Center, University of Miami School of Medicine, Miami, USA), Dr. Jurg Tschopp (Department of Biochemistry, University of Lausanne, Epalinges, Switzerland), and Dr. Katherine Fitzgerald (Division of Infectious Diseases, University of Massachusetts Medical School, Worcester, USA), respectively. Primary MEFs isolated from WT or OPTN^{470T} mice were donated by Dr. Ivana Munitic. All cells were cultured in standard conditions. Bone marrow cells from WT or OPTN^{470T} mice were allowed to differentiate in complete DMEM supplemented with 20 % M-CSF-conditioned medium for 6–7 days.

The TLR3 agonist Poly(I:C) was obtained from Invivogen. The Sendai virus H4 strain and the vesicular stomatitis

virus mutant strain used to infect cells (multiplicity of infection = 5) and to stimulate the RLRs were provided by Dr. Dominique Garcin. Complexes between low or high molecular weight poly(I:C) and the transfection reagent Lyovect (Invivogen) were also used to activate RLRs.

Subcellular fractionation

For subcellular organelle fractionation, cells were mechanically disrupted with a 27G1/2 syringe (BD Biosciences, East Rutherford, NJ, USA) in H60 buffer (20 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 60 mM KCl) supplemented with protease inhibitor cocktail (Thermo Scientific, Illkirch, France). Samples were centrifuged at 1000 × *g* to remove the nuclei and unbroken cells. The supernatant (S1) was centrifuged at 5000 × *g* for 5 minutes, to precipitate heavy organelles (P5). The supernatant (S5) was further centrifuged at 10,000 × *g* for 10 minutes to generate S10 and P10. S10 was centrifuged at 25,000 × *g* for 20 minutes to obtain the cytosolic fraction (S25) and P25. Each pellet was resuspended in lysis buffer and analyzed by immunoblotting. Discontinuous Optiprep gradients were used to separate the fractions, as previously described [18]. Isolation of Golgi membranes was performed using a Golgi isolation kit (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instructions.

In vitro IRF3 phosphorylation assays

Cells were disrupted in hypotonic buffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM KCl, 0.5 mM EGTA, 1.5 mM MgCl₂, plus protease inhibitor cocktail); 5 to 15 μ g of P5 or P25 in resuspension buffer (20 mM HEPES-KOH pH 7.4, 10 % glycerol, 0.5 mM EGTA, and protease inhibitor cocktail) were mixed with 1 μ g of recombinant GST-IRF3 (Abnova, Taipei City, Taiwan) and reaction buffer (20 mM HEPES-KOH pH 7.0, 2 mM ATP, 5 mM MgCl₂ and protease inhibitor cocktail) at 30 °C. The mixture was then cleared by centrifugation and the supernatant was used for immunoblotting.

Immunofluorescence

Cells were grown on coverslips. They were fixed by incubation in 4 % paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) for 10 minutes, and then permeabilized by incubation with 0.15 % Triton X-100 in PBS for 15 minutes. Non-specific binding sites were blocked by incubating cells in a solution of 2 % BSA in PBS for 1 hour. The cells were then incubated for 1 hour at room temperature or overnight at 4 °C with the primary antibodies. They were washed three times, for five minutes each, in PBS and were then incubated for 1 hour with the specific Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Nuclei were stained with DAPI (Sigma) and cells were again washed three times with PBS. Images were acquired with a Leica SP5 confocal microscope (Leica

Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a 63× oil immersion fluorescence objective.

DNA transfection and plasmids

HEK293T cells were transfected using Fugene 6 (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions. pcDNA-Myc-TBK1^{K38M} and pcDNA-Myc-TBK1^{K30R/K401R} were obtained by PCR-directed mutagenesis from pcDNAMyc-TBK1. pLEX-TBK1, pLEX-TBK1^{K38M}, and pLEX-TBK1^{K30R/K401R} were kindly provided by Dr. Michael Eck (Department of Cancer Biology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, USA). Finally, plasmids encoding NS3-GFP and OPTN-Flag were kindly donated by Dr. Damien Vitour and Dr. Ivana Munitic, respectively.

Protein extraction, immunoprecipitation and immunoblots

Cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 2 mM sodium pyrophosphate, 25 mM β-glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate) supplemented with protease inhibitor cocktail (Thermo Scientific), and the debris were removed by centrifugation at 10,000 × g and 4 °C. Protein concentration was determined with a micro BCA kit (Thermo Scientific). For immunoprecipitation, the samples were precleared with protein-G-Sepharose beads (Roche) for 30 minutes before immunoprecipitation with 2.5 μg antibodies and additional protein-G-Sepharose beads at 4 °C for 2 hours. Samples were then boiled in SDS sample buffer (Novex, San Diego, CA, USA) containing 10 % β-mercaptoethanol (Sigma Aldrich) and resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The cells were lysed and their ubiquitin conjugate content was analyzed at room temperature in denaturing conditions (8 M urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 % Triton X-100, 1 % NP-40, 20 mM imidazole). Immunoblot analysis was performed with specific antibodies and the antigen-antibody complexes were visualized by chemiluminescence (Immobilon Western, Merck Millipore, Billerica, MA, USA).

Antibodies

The primary antibodies used for immunoblotting were rabbit monoclonal anti-TBK1 (Abcam, Cambridge, UK, Abcam Cat# ab40676 RRID:AB_776632, 1:5000 dilution), rabbit monoclonal anti-phosphorylated TBK1 (phospho S172) (Abcam Cat# ab109272 RRID:AB_10862438, 1:2000), rabbit monoclonal anti-phosphorylated TBK1 (phospho S172) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, Cell Signaling Technology Cat# 5483P RRID:AB_10693472, 1:2000), rabbit monoclonal anti-IRF3 (Cell Signaling Technology Cat# 4302S RRID:AB_1904036, 1:5000), rabbit monoclonal anti-phosphorylated IRF3 (phospho S386) (Abcam Cat# ab76493 RRID:AB_1523836, 1:5000), rabbit

monoclonal anti-phosphorylated IRF3 (phospho S396) (Cell Signaling Technology Cat# 4947S RRID:AB_823547, 1:2000), mouse monoclonal anti-MAVS (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA, Enzo Life Sciences Cat# ALX-804-847 RRID:AB_10539976, 1:2000), rabbit polyclonal anti-TRAF3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-1828 RRID:AB_2209427, 1:1000), rabbit polyclonal anti-HA (Sigma-Aldrich Cat# H6908 RRID:AB_260070, 1:2000), rabbit polyclonal anti-TRIF (Cell Signaling Technology Cat# 4596S RRID:AB_2256555, 1:2000), rabbit polyclonal anti-GAPDH (Sigma-Aldrich Cat# G9545 RRID:AB_796208, 1:20000), rabbit polyclonal anti-KTN (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-33562 RRID:AB_2133047, 1:10000), mouse monoclonal anti-LAMP2 (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-18822 RRID:AB_626858, 1:10000), mouse monoclonal anti-EEA1 (BD Biosciences, East Rutherford, NJ, USA, BD Biosciences Cat# 610456 RRID:AB_397829, 1:10000), rabbit monoclonal anti-Syntaxin6 (Cell Signaling Technology Cat# 2869S RRID:AB_2196500, 1:5000), rabbit polyclonal anti-VDAC (Millipore Cat# AB10527 RRID:AB_10806766, 1:10000), mouse anti-glutathione-S-transferase (BD Biosciences Cat# 554805 RRID:AB_395536, 1:2000), mouse monoclonal anti-Lys-63 specific (Millipore Cat# 05-1313 RRID:AB_1587585, 1:500), mouse monoclonal anti-actin (Sigma-Aldrich Cat# A3853 RRID:AB_262137, 1:10000), rabbit polyclonal anti-optineurin (Abcam Cat# ab23666 RRID:AB_447598, 1:5000), rabbit polyclonal anti-optineurin (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA, Cayman Chemical Cat# 100000 RRID:AB_10078198, 1:4000), mouse monoclonal anti-optineurin (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-166576 RRID:AB_2156554, 1:2000), mouse anti-IKKγ (NEMO) (BD Biosciences Cat# 611306 RRID:AB_398832, 1:2000), rabbit polyclonal anti-ERK1/2 (Cell Signaling Technology Cat# 9102 RRID:AB_330744, 1:5000), mouse monoclonal anti-phosphorylated ERK1/2 (Cell Signaling Technology Cat# 9106 RRID:AB_331768, 1:2000), rabbit polyclonal anti-IκBα (Cell Signaling Technology Cat# 9242 L RRID:AB_823540, 1:5000), mouse monoclonal anti-phosphorylated-IκBα (Cell Signaling Technology Cat# 9246 L RRID:AB_226714, 1:2000), mouse monoclonal anti-GFP (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Switzerland, Roche Cat# 11814460001 RRID:AB_390913, 1:2000), mouse monoclonal anti-GM130 (BD Biosciences Cat# 610822 RRID:AB_398141, 1:4000), and mouse monoclonal anti-giantin (Abcam Cat# ab37266 RRID:AB_880195, 1:2000).

The primary antibodies used for immunofluorescence were rabbit monoclonal anti-phosphorylated TBK1 (phospho S172) (Abcam Cat# ab109272 RRID:AB_10862438, 1:500 dilution), rabbit monoclonal anti-phosphorylated TBK1 (phospho S172) (Cell Signaling Technology Cat# 5483P RRID:AB_10693472, 1:250), mouse monoclonal

anti-IKK ϵ /TBK1 (Cayman Chemical Cat# 13929 RRID: AB_10679144, 1:500), rabbit monoclonal anti-TBK1 (Abcam Cat# ab40676 RRID:AB_776632, 1:500), rabbit monoclonal anti-IRF3 (Cell Signaling Technology Cat# 4302S RRID:AB_1904036, 1:500), rabbit polyclonal anti-IRF3 (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-9082 RRID: AB_2264929, 1:500), mouse monoclonal anti-GM130 (BD Biosciences Cat# 610822 RRID:AB_398141, 1:1000), mouse monoclonal anti-cytochrome c (BD Biosciences Cat# 556432 RRID:AB_396416, 1:1000), mouse monoclonal anti-EEA1 (BD Biosciences Cat# 610456 RRID: AB_397829, 1:500), mouse monoclonal anti-ubiquitin (Millipore Cat# ST1200-100UG RRID:AB_2043482, 1:200), mouse monoclonal anti-giantin (Abcam Cat# ab37266 RRID:AB_880195, 1:1000), rabbit polyclonal anti-optineurin (Abcam Cat# ab23666 RRID:AB_447598, 1:500), rabbit polyclonal anti-optineurin (Cayman Chemical Cat# 100000 RRID:AB_10078198, 1:500), mouse monoclonal anti-optineurin (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-166576 RRID:AB_2156554, 1:500) rabbit polyclonal anti-AZI2 (NAP1) (Abcam Cat# ab65242 RRID:AB_1140792, 1:500), rabbit monoclonal anti-SINTBAD (Cell Signaling Technology Cat# 8605S RRID:AB_10839270, 1:100), rabbit polyclonal anti-giantin (Abcam Cat# ab24586 RRID:AB_448163, 1:400), mouse monoclonal anti-mouse pericentrin (BD Biosciences Cat# 611815 RRID:AB_399295, 1:400) and a rabbit polyclonal anti-pericentrin (Abcam Cat# ab4448 RRID:AB_304461, 1:400).

The primary antibodies used for immunoprecipitation were mouse monoclonal anti-optineurin (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-166576 RRID:AB_2156554), mouse monoclonal anti-GFP (Roche Cat# 11814460001 RRID: AB_390913), and rabbit monoclonal anti-TBK1 (Abcam Cat# ab40676 RRID:AB_776632).

Luciferase assay

HEK293T cells were co-transfected with 50 ng of a construct encoding firefly luciferase under the control of NF- κ B or the IFN- β promoter, and 10 ng of the *Renilla* luciferase pRL-TK plasmid (Promega). The transfections were performed using Fugene 6 (Promega), in accordance with the manufacturer's instructions. Transfected cells were collected and luciferase activity was assessed in the dual-luciferase reporter assay (Promega), on a Fluorostar Optima machine (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Each experiment was carried out in triplicate, with firefly fluorescence units normalized with respect to *Renilla* luciferase fluorescence units.

Retroviral transduction of MEFs

Recombinant retroviruses were produced by the transient transfection of HEK293T cells with the different pLEX-TBK1 plasmids and plasmids containing a cDNA encoding retroviral packaging gene. Supernatants were collected

48 h after transfection, filtered through a 0.45- μ m filter and concentrated with PEG-IT (Cell Signaling). After infection, cells were selected in puromycin (1 μ g/mL) and further passaged in culture.

Transfection with siRNA

HEK293T cells were transfected by the calcium phosphate precipitation method, whereas HeLa cells and MEFs were transfected with the Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. siRNAs were used at a final concentration of 20 nM. Control non-specific siRNAs and the specific siRNAs were purchased from Sigma-Aldrich. The siRNAs used were: OPTN 1 (5' GCUUCAAGAGGCACACAC AdTdT 3'), OPTN 2 (GUUUGAGAUGCAAAGCAAA dTdT), mNEMO (GCGAGUUCAACAAGCUGAAdTdT), OPTN A (GAGUCAUGAGAAUGAGAAAdTdT), OPTN B (CCAUGAAAGGGAGAUUUGAdTdT), OPTN C (CAAAGAAAGAGUUUCAGAdTdT), OPTN D (GAAAG CAUGCUAUCAGAAAdTdT), OPTN E (CCAAGAAUU ACUUCGAACAdTdT), and hNEMO (GAGUCGUUGG AGGCUGCCACUAAGdTdT).

CRISPR/Cas9

OPTN knockout was achieved in HeLa cells with CRISPR/Cas9 technology, by optineurin double nickase plasmid transfection (Santa Cruz) and puromycin selection, according to the manufacturer's protocol.

Real-time quantitative PCR

RNA was extracted from cells in RLT lysis buffer and purified with the QIAGEN RNeasy Mini kit, according to the manufacturer's protocol. RNA quality was checked by measuring the ratio of optical densities at 260 and 280 nm. Total RNA (1 μ g) was used for cDNA synthesis with a Revert Aid H minus First Strand DNA Synthesis kit (Fermentas, Villebon-sur-Yvette, France). cDNA was then amplified by PCR with a LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), using SYBR Green (Fast Start DNA Master SYBR- Green I; Roche Applied Science, Roche Diagnostics). Specific primers were used for IL-6, IFNB1, or GAPDH (as the house-keeping gene), under the following conditions: 95 °C for 15 minutes, 40 cycles of 94 °C for 15 s, and at 55 °C for 30 s, then 72 °C for 30 s. Specific primers were designed with the Universal Probe Library System (Roche Applied Science). The sequences of the primers used were as follows: hIL-6 (Forward: GAAAGTGGCTATGCAG TTTGAA, reverse: GAGGTAAGCCTACACTTTCCA AGA), hIFNB1 (CGACACTGTTCTGTGTTGTCA, GAA GCACAACAGGAGAGCAA), hGAPDH (AGCCACA TC GCTCAGACAC, AATACGACCAAATCCGTTGA CT), mIL-6 (GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA, CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA), mIFNB1 (CAC

AGCCCTCTCCATCAACTA, CATTTCCGAATGTTCGT CCT), and mGAPDH (AGCTTGTCATCAACGGGAAG, TTTGAT GTTAGTGGGGTCTCG). Results are expressed as $2^{-\Delta C_p}$, where C_p is the cycle threshold number. Dissociation curves were analyzed after each run, for each amplicon, to assess the specificity of quantification with SYBR Green.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The concentrations of IFN- β and IL-6 released into the cell culture medium were determined by ELISA, with the Verikine IFN- β kit (PBL Assay Science, Piscataway, NJ, USA) and the Quantikine IL-6 kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) for human or mouse cells, according to the manufacturer's protocol.

Statistical analysis

We carried out *t* tests with Tukey's post hoc analysis to assess the statistical significance of differences (Prism GraphPad Software), and the *P* values obtained are indicated in the figure legends. Differences were considered to be significant if $P < 0.05$. **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $0.001 < P < 0.01$, * $0.01 < P < 0.05$. ns, not significant. The data shown in each histogram are the means \pm SD from three independent experiments.

Additional files

Additional file 1: p-TBK1^{S172} localizes to the Golgi apparatus then migrates to the centrosome after RLR activation. (A) Scheme of the subcellular fractionation procedure for obtaining the various membrane fractions in Figs. 1a, 2a, and Additional file 2A. (B) MEFs were either left unstimulated (control) or infected with Sendai virus (SeV) for 6 h (+ SeV). p-TBK1^{S172} staining was then analyzed by immunofluorescence. The Golgi apparatus was identified by labeling with an antibody raised against giantin. Scale bars, 10 μ m. On the right, enlargement of the framed zone in the overlay. (C) Isolated Golgi membranes from uninfected or SeV-infected MEFs were analyzed by immunoblotting with antibodies against the indicated proteins. ° Corresponds to the p-TBK1 detection from a previous immunoblot. (D) MEFs were either left unstimulated (control) or infected with SeV for 6 or 9 h (+ SeV). p-TBK1^{S172} staining was then analyzed by immunofluorescence. The Golgi apparatus was identified by labeling with an antibody raised against GM130. Scale bars, 10 μ m. On the right, enlargement of the framed zone in the overlay. (E) MEFs were either left unstimulated (control) or infected with SeV for 9 h (+ SeV). p-TBK1^{S172} staining was then analyzed by immunofluorescence. The centrosomes were stained with an antibody raised against pericentrin. Scale bars, 10 μ m. On the right, enlargement of the framed zone in the overlay. (PDF 759 kb)

Additional file 2: The active form of TBK1 localizes to the Golgi apparatus after RLR stimulation. (A) HeLa cells were either left unstimulated or infected with Sendai virus (SeV) for 6 or 8 h. Cells were then fractionated as described in Additional file 1A, and samples were analyzed by immunoblotting with antibodies against the indicated proteins. EEA1, kinectin, LAMP2, GAPDH, syntaxin-6, and VDAC served as loading and purity controls for endosomes, the endoplasmic reticulum, lysosomes, the cytosol, the Golgi apparatus, and mitochondria, respectively. (Ub)n, polyubiquitin. * Indicates non-specific bands. (B–E) HeLa cells were either left unstimulated (control) or infected with SeV for 6 h (+ SeV). The indicated proteins were then analyzed by immunofluorescence staining. The Golgi apparatus was labeled with an antibody against GM130, whereas the mitochondria were identified by immunostaining for cytochrome c. Scale bars, 10 μ m. On the right,

enlargement of the framed zone in the overlay. (F) HeLa cells were either left unstimulated or infected with SeV for 6 or 8 h. Cell lysates (Lys.) were then subjected to immunoprecipitation (IP) with an antibody against TBK1. Samples were then analyzed by immunoblotting with antibodies against the indicated proteins. * Indicates non-specific bands. (PDF 2378 kb)

Additional file 3: Transfection of MEFs with poly(I:C) triggers TBK1 accumulation at the centrosome at late time points. (A) MEFs were either left untreated (MOCK) or transfected with LMW poly(I:C) (5 μ g/mL) for 4 h (trPoly(I:C)). TBK1 staining was then analyzed by immunofluorescence. The Golgi apparatus was labeled with an antibody against GM130, whereas TBK1 was detected with a rabbit monoclonal antibody. Scale bars, 10 μ m. (B–E) MEFs were either left untreated (MOCK) or transfected with HMW poly(I:C) (5 μ g/mL) for 4 h (trPoly(I:C)). The indicated proteins were analyzed by immunofluorescence staining with specific antibodies. The Golgi apparatus was labeled with an antibody against GM130, whereas centrosomes were labeled with an antibody against pericentrin. Scale bars, 10 μ m. On the right, enlargement of the framed zone in the overlay. (PDF 1624 kb)

Additional file 4: The p-TBK1^{S172} in aggregates is ubiquitinated. MEFs were either left untreated (MOCK) or transfected with HMW poly(I:C) (5 μ g/mL) for 4 h (trPoly(I:C)). The indicated proteins were analyzed by immunofluorescence staining with specific antibodies. Scale bars, 10 μ m. (PDF 338 kb)

Additional file 5: OPTN, NAP1 and SINTBAD are present at the Golgi apparatus where OPTN is in complex with active TBK1 after RLR activation. (A, C) The indicated proteins were analyzed by immunofluorescence with specific antibodies in HeLa cells. Anti-OPTN (a), rabbit polyclonal anti-OPTN from Cayman Corp; anti-OPTN (b), rabbit polyclonal anti-OPTN from Abcam; anti-OPTN (c), mouse monoclonal anti-OPTN from Santa Cruz. The Golgi apparatus was stained with a mouse monoclonal anti-GM130 antibody or with a rabbit polyclonal anti-giantin antibody. Scale bars, 10 μ m. (B) HEK293T cells were either left unstimulated or infected with Sendai virus (SeV) for 6 and 8 h. Golgi-enriched fractions were then subjected to immunoprecipitation (IP) with an antibody against OPTN. Samples were then analyzed by immunoblotting with antibodies against the indicated proteins. * Indicates non-specific bands. (PDF 1007 kb)

Additional file 6: OPTN silencing impairs IRF3 signaling after RLR or TLR3 activation. (A) HEK293T cells were transfected with a control nonspecific siRNA (NS) or with five individual OPTN-specific siRNAs (OPTN A, B, C, D and E) or a NEMO-specific siRNA. The cells were then transfected, 48 h later, with an IFN β promoter reporter or with a NF- κ B reporter and the *Renilla* luciferase gene as an internal control. Then, 24 h after transfection, cells were either left unstimulated (Unstim) or infected with Sendai virus (+SeV) for 7 h. Luciferase assays were performed and the results were normalized against *Renilla* luciferase activity. The data shown are means \pm SD from three independent experiments (analysis of variance and comparison with NS siRNA-transfected cells in Student's *t*-test). RLU, relative luminescence units. ns, not significant. (B) HEK293T cells were transfected with a control nonspecific siRNA (NS) or with two individual OPTN-specific siRNAs (OPTN A and OPTN B) or a NEMO-specific siRNA. Then, 72 h later, cells were either left unstimulated or infected with Sendai virus (SeV) for 6 or 8 h. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with antibodies against the indicated proteins. * indicates non-specific bands. (C) As in (B) but with HeLa cells. (D) HEK293T cells were transfected with a control nonspecific siRNA (NS) or with two individual OPTN-specific siRNAs (OPTN A and OPTN B) or a NEMO-specific siRNA. Cells were either left unstimulated (Unstim) or infected with VSV (+VSV) for 7 h. Luciferase assays were performed and the results were normalized against *Renilla* luciferase activity. (E) As in (B) but HEK293T cells were infected with VSV. (F) HEK293T-TLR3 cells were transfected as in (A). Cells were either left unstimulated (Unstim) or stimulated with poly(I:C) (10 μ g/ml) for 7 h. Luciferase assays were then performed. (PDF 703 kb)

Additional file 7: OPTN deficiency does not affect TBK1 ubiquitination. WT or OPTN knockout HeLa cells were either left unstimulated or infected with Sendai virus (SeV) for 6 or 8 h. Cell lysates (Lys.) were subjected to immunoprecipitation (IP) with an antibody against TBK1. Samples were then analyzed by immunoblotting with antibodies against the indicated proteins. ° Corresponds to OPTN detection from a previous immunoblot. (PDF 392 kb)

Additional file 8: Working model. After infection, viral RNAs are sensed by RIG-I in the cytosol or TLR3 in the endosomes. The corresponding adaptors, MAVS and TRIF, trigger the formation of specific signalosomes leading to the ubiquitination of TBK1. At the Golgi apparatus, OPTN recruits ubiquitinated TBK1 via its UBD, leading to the *trans*-autoactivation of this kinase. Activated TBK1 then phosphorylates IRF3, leading to the production of type I IFNs. (PDF 912 kb)

Acknowledgements

We would like to thank Drs G.N. Barber, J. Tschopp, K.A. Fitzgerald, and M.J. Eck for providing cells or reagents. This work was supported by grants from Fondation ARC (Association pour la Recherche contre le Cancer), Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée) and the ANRS (Agence Nationale pour la Recherche sur le SIDA). NZ and MP are supported by fellowships from Université Paris-Sud. LSDC is supported by a fellowship from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Authors' contributions

MP, NZ, LSDC, RL, and DA designed, performed and analyzed the data. AV designed and analyzed the data. DG provided key reagents. DV and IM provided key reagents and analyzed the data. MP and DA wrote the manuscript. All the authors discussed the results. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹INSERM, UMR_S 1197, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France. ²Université Paris-Saclay, Paris, France. ³Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Villejuif, France. ⁴Department of Microbiology and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland. ⁵ANSES, INRA, ENVA, UPEC, UMR_1161 Virology, LabEx IBEID, Maisons-Alfort, France. ⁶Laboratory of Molecular Immunology, Department of Biotechnology, University of Rijeka, Rijeka, Croatia.

Received: 29 June 2016 Accepted: 5 August 2016

Published online: 18 August 2016

References

- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783–801.
- Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140:805–20.
- Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:36–49.
- Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*. 1994;264:1918–21.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:499–511.
- Jiang X, Chen ZJ. The role of ubiquitylation in immune defence and pathogen evasion. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:35–48.
- Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*. 2003;4:491–6.
- Hemmi H, Takeuchi O, Sato S, Yamamoto M, Kaisho T, Sanjo H, Kawai T, Hoshino K, Takeda K, Akira S. The roles of two I-kappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med*. 2004;199:1641–50.
- Perry AK, Chow EK, Goodnough JB, Yeh WC, Cheng G. Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection. *J Exp Med*. 2004;199:1651–8.
- Bonnard M, Mirtsos C, Suzuki S, Graham K, Huang J, Ng M, Itie A, Wakeham A, Shahinian A, Henzel WJ, et al. Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-kappaB-dependent gene transcription. *EMBO J*. 2000;19:4976–85.
- Larabi A, Devos JM, Ng SL, Nanao MH, Round A, Maniatis T, Panne D. Crystal structure and mechanism of activation of TANK-binding kinase 1. *Cell Rep*. 2013;3:734–46.
- Ma X, Helgason E, Phung QT, Quan CL, Iyer RS, Lee MW, Bowman KK, Starovasnik MA, Dueber EC. Molecular basis of Tank-binding kinase 1 activation by transautophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:9378–83.
- Li S, Wang L, Berman M, Kong YY, Dorf ME. Mapping a dynamic innate immunity protein interaction network regulating type I interferon production. *Immunity*. 2011;35:426–40.
- Tu D, Zhu Z, Zhou AY, Yun CH, Lee KE, Toms AV, Li Y, Dunn GP, Chan E, Thai T, et al. Structure and ubiquitination-dependent activation of TANK-binding kinase 1. *Cell Rep*. 2013;3:747–58.
- Goncalves A, Burckstummer T, Dixit E, Scheicher R, Gorna MW, Karayel E, Sugar C, Stukalov A, Berg T, Kralovics R, et al. Functional dissection of the TBK1 molecular network. *PLoS One*. 2011;6:e23971.
- Helgason E, Phung QT, Dueber EC. Recent insights into the complexity of Tank-binding kinase 1 signaling networks: the emerging role of cellular localization in the activation and substrate specificity of TBK1. *FEBS Lett*. 2013;587:1230–7.
- Kachaner D, Genin P, Laplantine E, Weil R. Toward an integrative view of Optineurin functions. *Cell Cycle*. 2012;11:2808–18.
- Alexia C, Poalas K, Carvalho G, Zemirli N, Dwyer J, Dubois SM, Hatchi EM, Cordeiro N, Smith SS, Castanier C, et al. The endoplasmic reticulum acts as a platform for ubiquitylated components of nuclear factor kappaB signaling. *Sci Signal*. 2013;6:ra79.
- Castanier C, Zemirli N, Portier A, Garcin D, Bidere N, Vazquez A, Arnould D. MAVS ubiquitination by the E3 ligase TRIM25 and degradation by the proteasome is involved in type I interferon production after activation of the antiviral RIG-I-like receptors. *BMC Biol*. 2012;10:44.
- Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, Chen ZJ. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell*. 2011;146:448–61.
- Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody TS, Fujita T, Akira S. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*. 2008;205:1601–10.
- Barber GN. STING-dependent cytosolic DNA sensing pathways. *Trends Immunol*. 2014;35:88–93.
- Kachaner D, Filipe J, Laplantine E, Bauch A, Bennett KL, Superti-Furga G, Israel A, Weil R. Plk1-dependent phosphorylation of optineurin provides a negative feedback mechanism for mitotic progression. *Mol Cell*. 2012;45:553–66.
- Gleason CE, Ordureau A, Gourlay R, Arthur JS, Cohen P. Polyubiquitin binding to optineurin is required for optimal activation of TANK-binding kinase 1 and production of interferon beta. *J Biol Chem*. 2011;286:35663–74.
- Heo JM, Ordureau A, Paulo JA, Rinehart J, Harper JW. The PINK1-PARKIN mitochondrial ubiquitylation pathway drives a program of OPTN/NDP52 recruitment and TBK1 activation to promote mitophagy. *Mol Cell*. 2015;60:7–20.
- Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, Sideris DP, Fogel AI, Youle RJ. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*. 2015;524:309–14.
- Munitic I, Giardino Torchia ML, Meena NP, Zhu G, Li CC, Ashwell JD. Optineurin insufficiency impairs IRF3 but not NF-kappaB activation in immune cells. *J Immunol*. 2013;191:6231–40.
- Slowicka K, Vereecke L, McGuire C, Sze M, Maelfait J, Kolpe A, Saelens X, Beyaert R, van Loo G. Optineurin deficiency in mice is associated with increased sensitivity to Salmonella but does not affect proinflammatory NF-kappaB signaling. *Eur J Immunol*. 2016;46(4):971–80.
- Zhao T, Yang L, Sun Q, Arguello M, Ballard DW, Hiscott J, Lin R. The NEMO adaptor bridges the nuclear factor-kappaB and interferon regulatory factor signaling pathways. *Nat Immunol*. 2007;8:592–600.
- Castanier C, Arnould D. Mitochondrial localization of viral proteins as a means to subvert host defense. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:575–83.
- Chauveau E, Doceul V, Lara E, Breard E, Sailleau C, Vidalain PO, Meurs EF, Dabo S, Schwartz-Cornil I, Zientara S, Vitour D. NS3 of bluetongue virus interferes with the induction of type I interferon. *J Virol*. 2013;87:8241–6.
- Han Z, Harty RN. The NS3 protein of bluetongue virus exhibits viroporin-like properties. *J Biol Chem*. 2004;279:43092–7.
- Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, Kim SY, Moody SE, Dunn IF, Schinzel AC, Sandy P, Meylan E, Scholl C, et al. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature*. 2009;462:108–12.
- Liu S, Cai X, Wu J, Cong Q, Chen X, Li T, Du F, Ren J, Wu YT, Grishin NV, Chen ZJ. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science*. 2015;347:aaa2630.

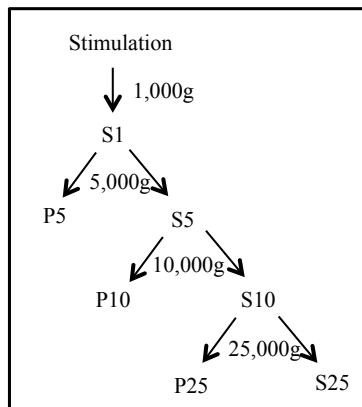
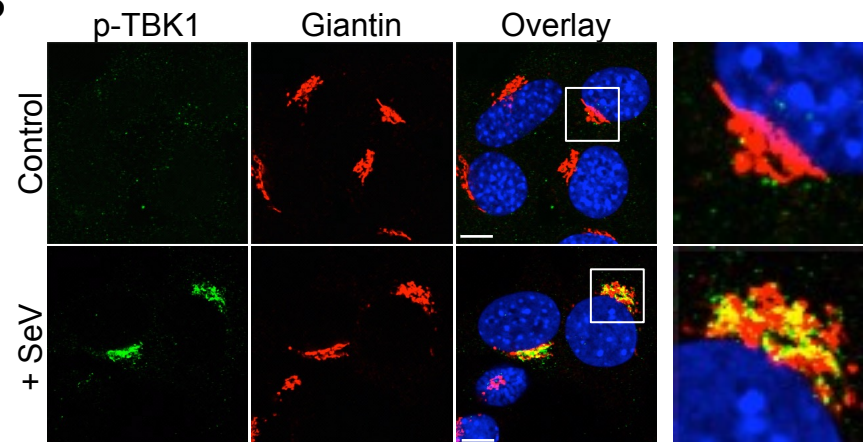
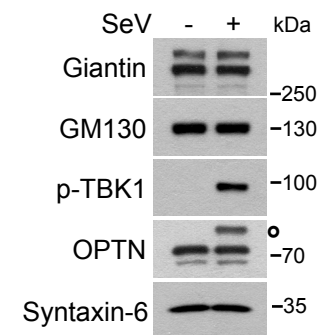
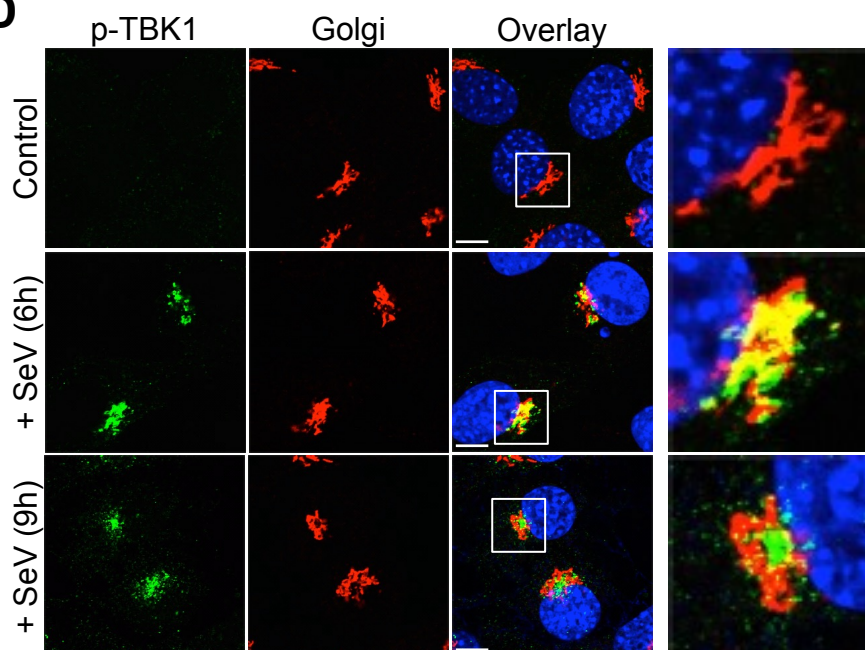
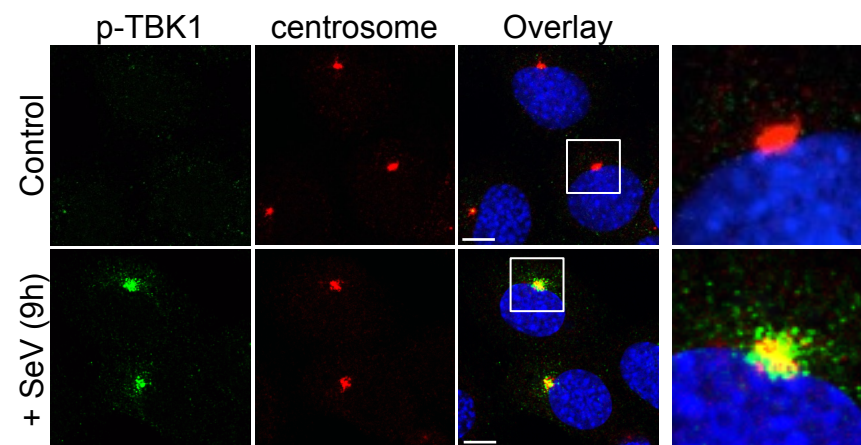
35. Genin P, Cuvelier F, Lambin S, Corte-Real Filipe J, Autrusseau E, Laurent C, Laplantine E, Weil R. Optineurin regulates the interferon response in a cell cycle-dependent manner. *PLoS Pathog.* 2015;11:e1004877.
36. Mankouri J, Fragkoudis R, Richards KH, Wetherill LF, Harris M, Kohl A, Elliott RM, Macdonald A. Optineurin negatively regulates the induction of IFN β in response to RNA virus infection. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000778.
37. Obaid R, Wani SE, Azfer A, Hurd T, Jones R, Cohen P, Ralston SH, Albagha OM. Optineurin negatively regulates osteoclast differentiation by modulating NF- κ B and interferon signaling: implications for Paget's disease. *Cell Rep.* 2015;13(6):1096–102.
38. Unterholzner L, Sumner RP, Baran M, Ren H, Mansur DS, Bourke NM, Randow F, Smith GL, Bowie AG. Vaccinia virus protein C6 is a virulence factor that binds TBK-1 adaptor proteins and inhibits activation of IRF3 and IRF7. *PLoS Pathog.* 2011;7:e1002247.
39. Alff PJ, Sen N, Gorbunova E, Gavrilovskaya IN, Mackow ER. The NY-1 hantavirus Gn cytoplasmic tail coprecipitates TRAF3 and inhibits cellular interferon responses by disrupting TBK1-TRAF3 complex formation. *J Virol.* 2008;82:9115–22.
40. Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov WV, Brady NR, Richter B, Korac J, Waidmann O, Choudhary C, et al. Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science.* 2011;333:228–33.
41. Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol.* 2009;10:1065–72.
42. Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell.* 2009;138:576–91.
43. Sahlender DA, Roberts RC, Arden SD, Spudich G, Taylor MJ, Luzio JP, Kendrick-Jones J, Buss F. Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J Cell Biol.* 2005;169:285–95.
44. Meena NP, Zhu G, Mittelstadt PR, Giardino Torchia ML, Pourcelot M, Arnould D, Ashwell JD, Munitic I. The TBK1-binding domain of optineurin promotes type I interferon responses. *FEBS Lett.* 2016;590:1498–508.
45. Fujita F, Taniguchi Y, Kato T, Narita Y, Furuya A, Ogawa T, Sakurai H, Joh T, Itoh M, Delhase M, et al. Identification of NAP1, a regulatory subunit of I κ B kinase-related kinases that potentiates NF- κ B signaling. *Mol Cell Biol.* 2003;23:7780–93.
46. Ryzhakov G, Randow F. SINTBAD, a novel component of innate antiviral immunity, shares a TBK1-binding domain with NAP1 and TANK. *EMBO J.* 2007;26:3180–90.
47. Zemirli N, Pourcelot M, Dogan N, Vazquez A, Arnould D. The E3 ubiquitin ligase RNF121 is a positive regulator of NF- κ B activation. *Cell Commun Signal.* 2014;12:72.

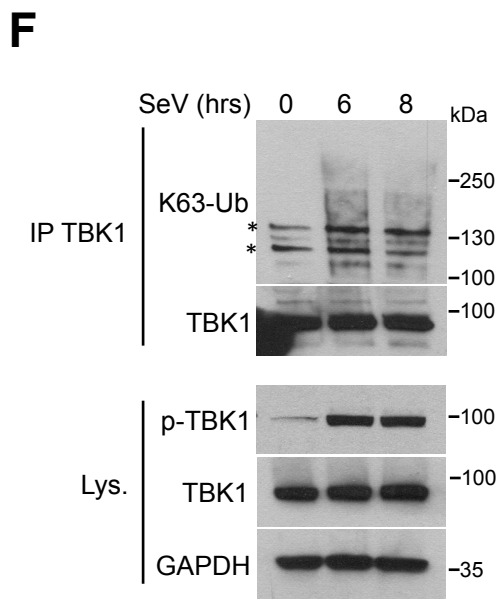
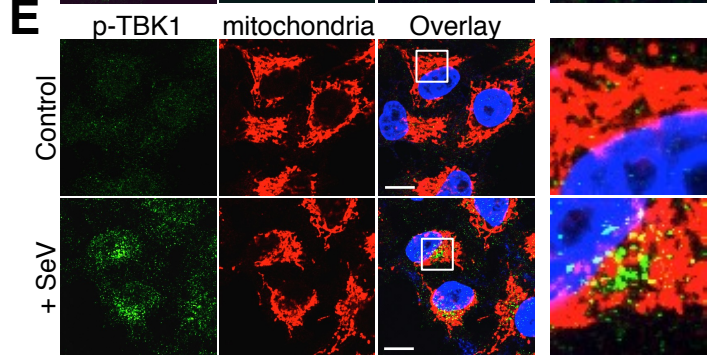
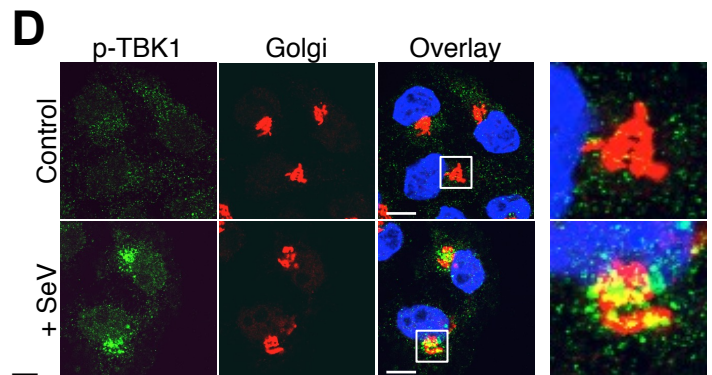
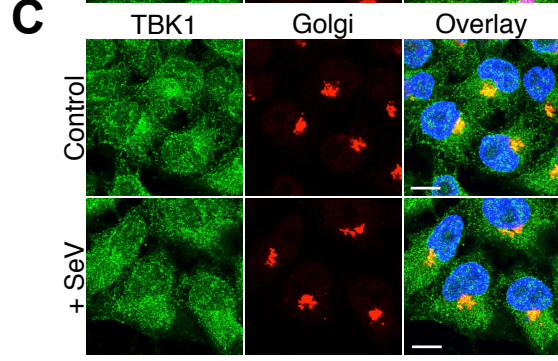
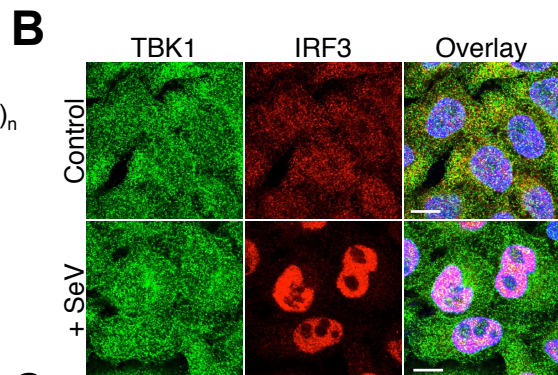
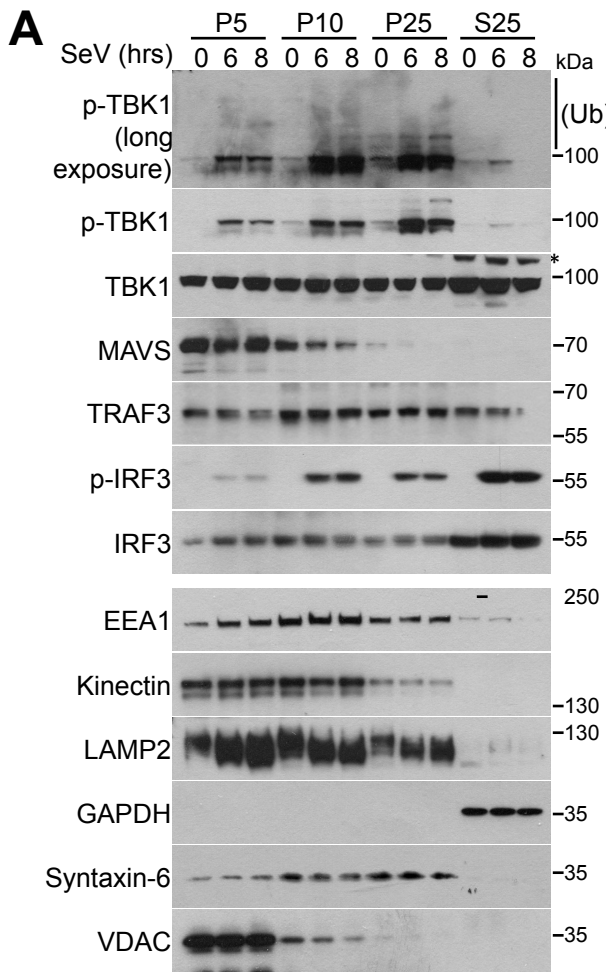
Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

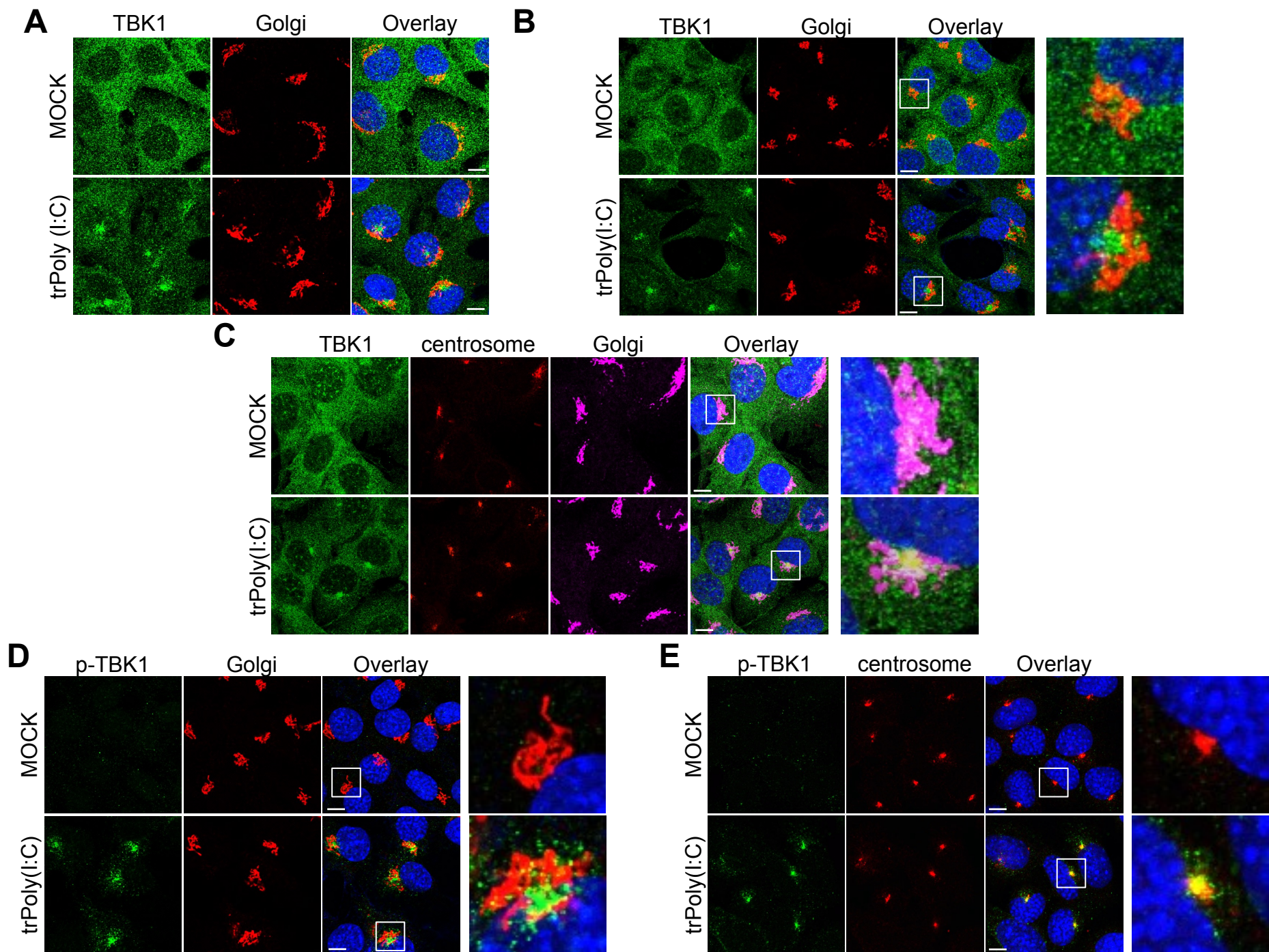
- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

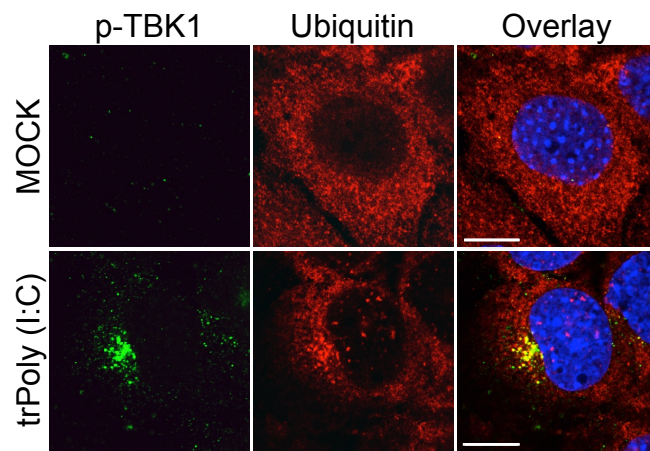
Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



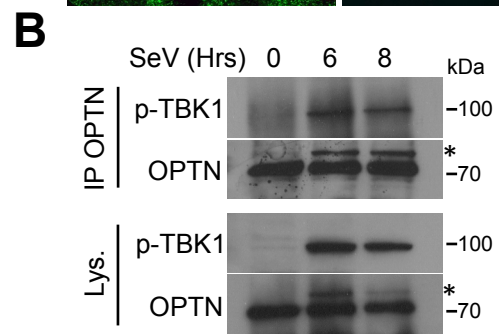
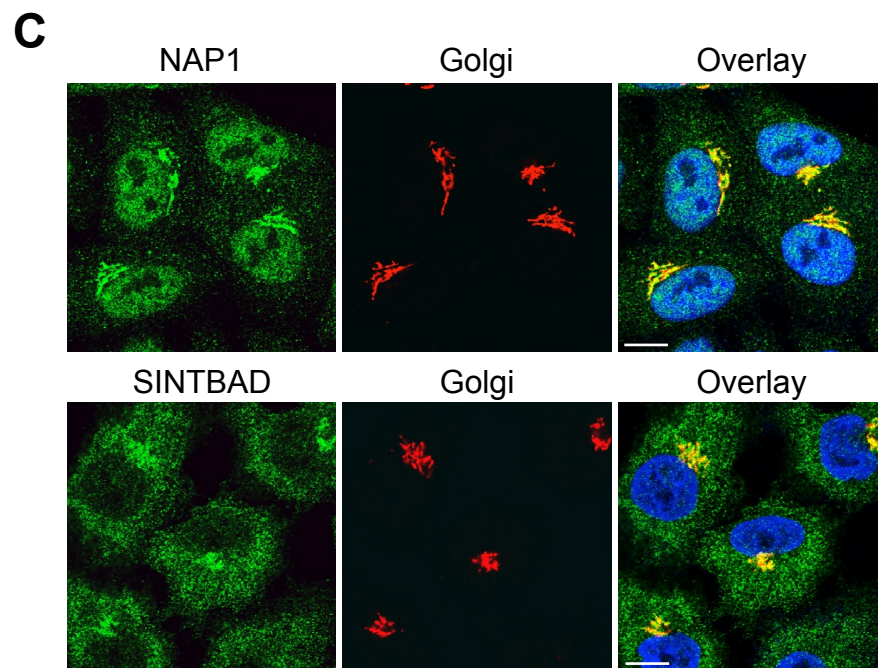
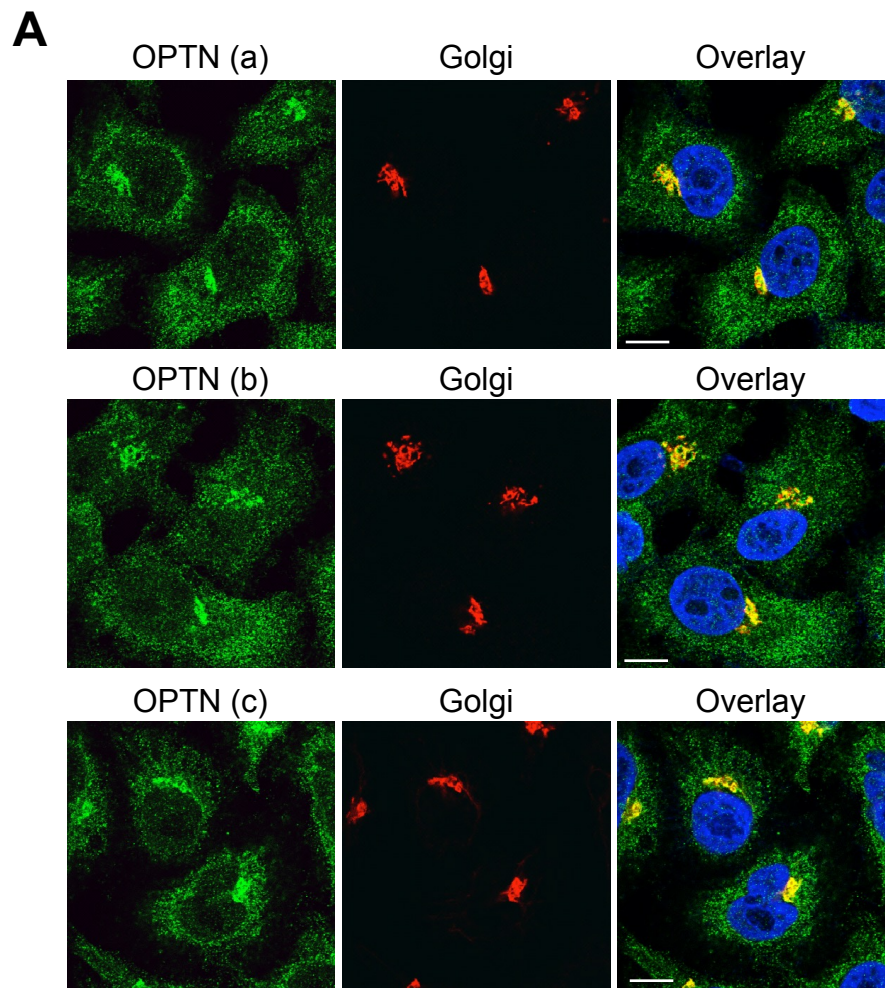
A**B****C****D****E**

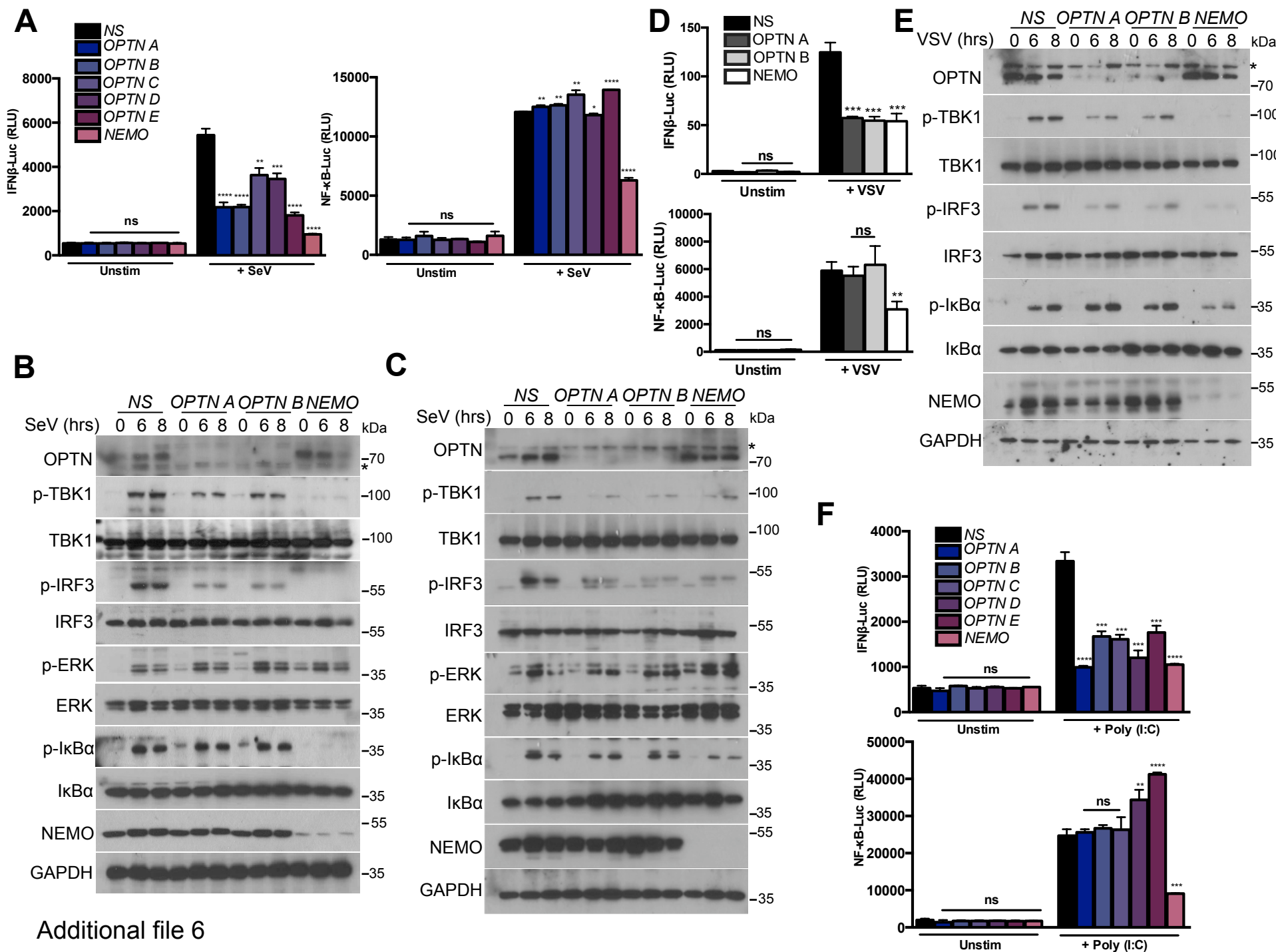


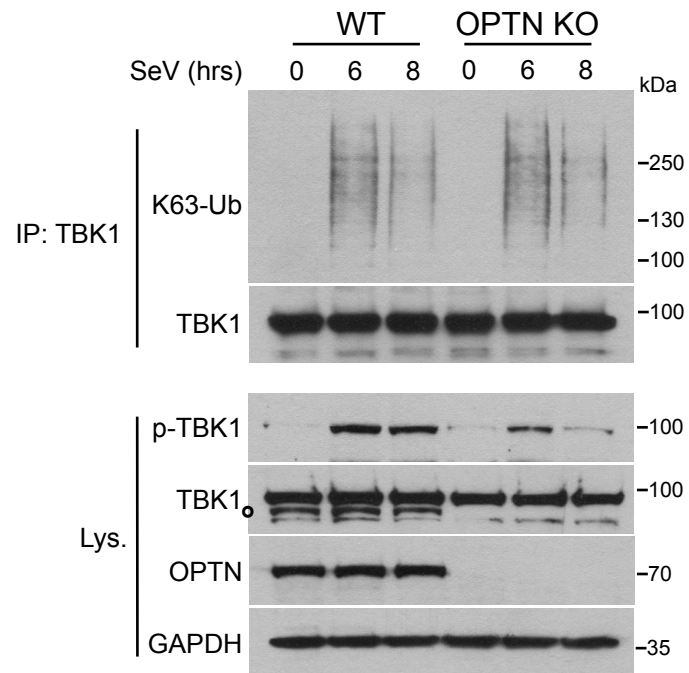




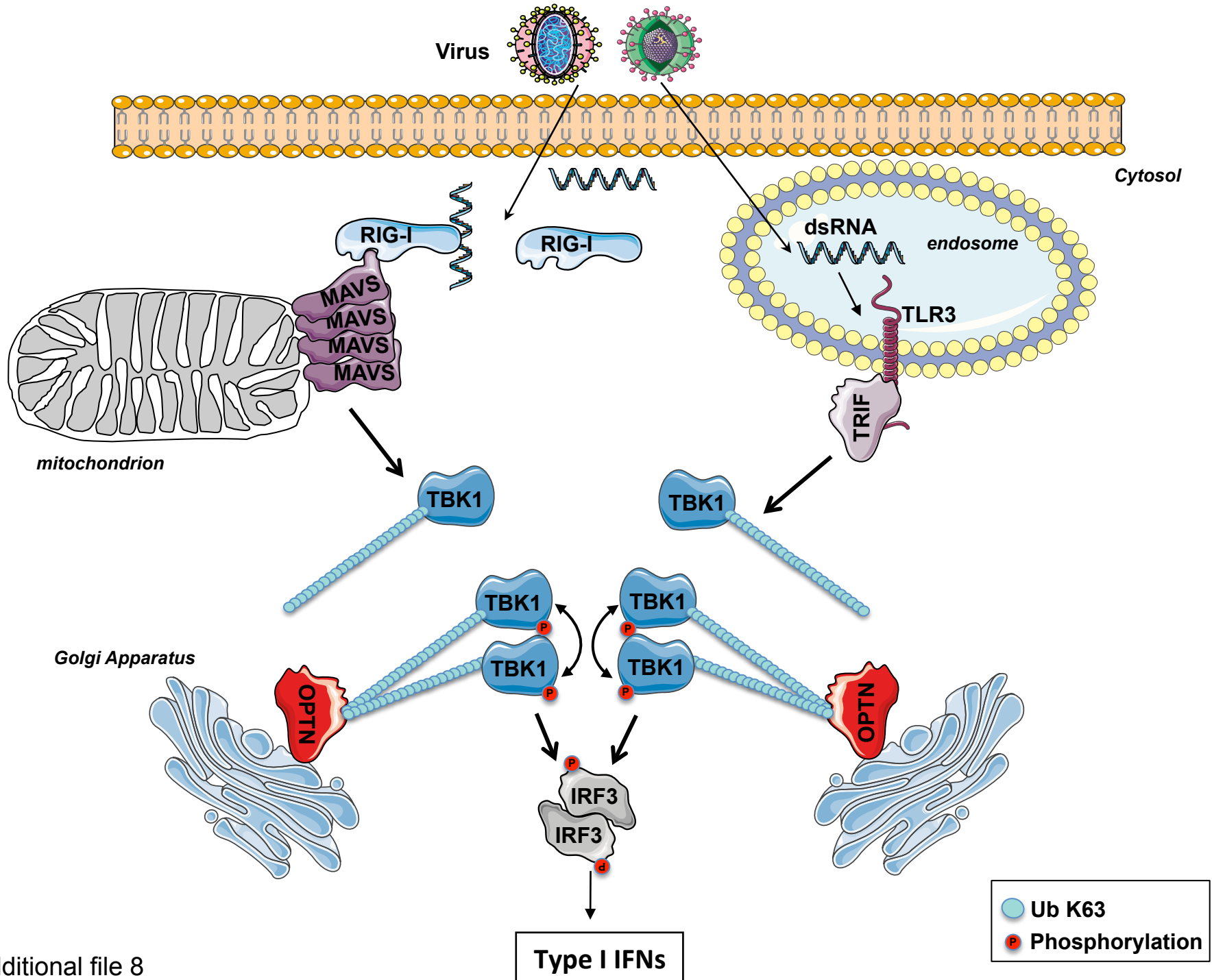
Additional file 4







Additional file 7



Discussion et Perspectives

Lors d'une infection virale, les ARN viraux endocytés sont détectés par le TLR3 tandis que ceux synthétisés et libérés dans le cytoplasme des cellules infectées sont reconnus par les RLRs. La stimulation de l'un ou l'autre de ces récepteurs conduit à l'activation de TBK1, kinase jouant un rôle essentiel dans l'immunité innée antivirale, par la phosphorylation du facteur de transcription IRF3, nécessaire à la production des IFNs de type I. Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents de l'activation de TBK1 ne sont pas clairs.

L'objectif de mon travail de thèse fut de comprendre le mécanisme d'activation de cette voie de signalisation antivirale. De précédents résultats au laboratoire avaient permis de mettre en évidence un relais endomembranaire lors de l'activation du facteur de transcription NF- κ B au cours de l'immunité innée et antivirale. De plus, ce relais membranaire semblait concerner spécifiquement les protéines ubiquitinylées de cette voie de signalisation²⁰⁰. Ainsi mon travail de thèse a consisté à vérifier si un tel relais membranaire s'appliquait également au cours de la voie d'activation de TBK1, et quels étaient les mécanismes moléculaires d'activation des protéines impliquées dans ce potentiel relais.

Localisation de TBK1 au niveau de l'appareil de Golgi

TBK1 est une sérine / thréonine kinase ayant une fonction clé dans plusieurs voies de signalisation cellulaire, y compris la réponse immunitaire innée, l'élimination des bactéries par autophagie et, dans des conditions physiologiques, la croissance et la prolifération cellulaire^{359, 360}. TBK1 est composée d'un domaine kinase (KD) hébergeant son activité catalytique et de trois domaines accessoires : un domaine analogue à l'ubiquitine (ULD), un domaine de dimérisation (DD) et un petit motif d'interaction protéique, en position C-terminale appelé (AB) motif (Figure 19).

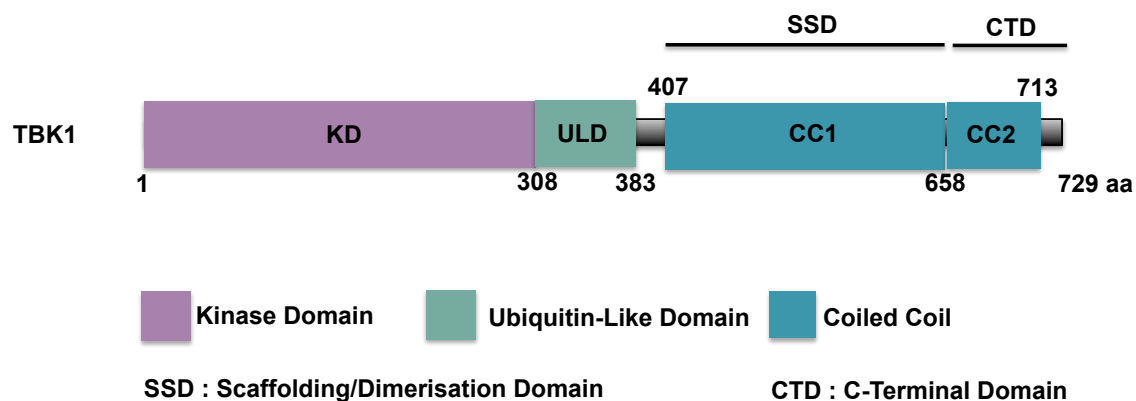


Figure 19 : Structure de TBK1

De manière surprenante, suite à une stimulation des cellules avec l'IL-1 β ou le TNF α , après induction de la mitophagie ou dans les cancers dépendant de KRAS, TBK1 est phosphorylé contrairement à IRF3^{361, 362, 363, 364}. Il a donc été suggéré que l'auto-activation de TBK1 et sa spécificité de substrat sont toutes les deux dépendantes de la distribution subcellulaire de TBK1, avec diverses protéines adaptatrices, chacune dirigeant TBK1 vers des complexes de signalisation distincts donnant lieu à différentes réponses cellulaires^{359, 365, 366}. Conformément à cette hypothèse, nous avons observé que suite à la stimulation des RLRs et du TLR3, la forme active (phosphorylée et ubiquitinylée) de TBK1 est présente au niveau de l'appareil de Golgi, et que son substrat IRF3 est phosphorylé. Des publications ultérieures observent quant à elles une accumulation de TBK1 au niveau de MAVS, à la mitochondrie, après une infection virale³⁶⁴. Nous n'avons actuellement aucune explication pour cette divergence. En effet, suite à ces observations, en plus de nos expériences de fractionnements cellulaire et d'immunofluorescence présentés dans l'article, nous avons, grâce à un kit commercial, isolé les mitochondries où nous ne retrouvons pas de TBK1 actif. De plus, nous ne constatons pas d'interaction entre MAVS et TBK1 ou encore MAVS et IRF3, comme cela avait pu être décrit. Enfin, suite à une réaction *in vitro*, il apparaît que la fraction enrichie en appareil de Golgi de cellules infectées induit fortement la phosphorylation d'IRF3 en comparaison à la fraction enrichie en mitochondrie. Ce résultat confirme ainsi que la forme active de TBK1 est localisée au niveau de l'appareil de Golgi et non aux mitochondries contrairement à ce que l'on pouvait penser. En effet malgré une initiation du signal au niveau de ces dernières, avec le recrutement de l'adaptateur MAVS, un relais endomembranaire au niveau de l'appareil de Golgi est ensuite nécessaire pour une activation optimale de la voie de signalisation.

Dans le cas de la mitophagie, p-TBK1 est recruté au niveau des mitochondries dépolarisées sans phosphorylation d'IRF3³⁶². Aucune accumulation significative de la forme active de TBK1 n'a été détectée au niveau de l'appareil de Golgi après traitement des cellules avec l'IL-1 β ou TNF α , suggérant, en outre, que la présence de p-TBK1 au niveau de l'appareil de Golgi est une condition sine qua non pour la phosphorylation d'IRF3.

D'autres recherches sont nécessaires pour déterminer pourquoi la présence de la forme phosphorylée de TBK1 au niveau de l'appareil de Golgi est requise pour promouvoir la phosphorylation d'IRF3. La localisation au niveau de cet organite, limitrophe du noyau, pourrait constituer un atout pour la signalisation. En effet, une fois activée par TBK1, IRF3 transloque dans le noyau. La réalisation d'un tel processus loin du noyau, augmenterait les chances de rencontre avec des phosphatases ou E3 ubiquitine ligases, qui réguleraient

négativement la signalisation.

La présence de la forme active de TBK1 au niveau de l'appareil de Golgi pourrait également conduire à la stimulation de la voie sécrétoire, via la phosphorylation de substrats spécifiques, permettant la libération des interférons de type I et les cytokines pro-inflammatoires produites après stimulation des PRRs. En effet, l'utilisation combinée de l'immunoprécipitation et de la spectrométrie de masse a permis d'identifier une interaction entre TBK1 et Sec5, l'un des constituants d'un complexe octamérique appelé exocyste³⁶⁷. Ce complexe permet notamment l'arrimage de vésicules intracellulaires au niveau de la membrane plasmique. Du fait de ces constatations, nous avons émis l'hypothèse que TBK1 pourrait phosphoryler Sec5 et ainsi réguler ce complexe. Nos résultats préliminaires suggèrent que Sec5 serait vraisemblablement phosphorylé sur des résidus tyrosines et thréonines. La possibilité que TBK1 puisse intervenir dans la régulation des voies de sécrétion nous est également apparue lors de nos expériences d'immunofluorescence où, plus tardivement au cours de l'infection, nous avons remarqué que le marquage de p-TBK1 apparaissait dans une région périnucléaire proche de l'appareil de Golgi. Dans les cellules de mammifères la position du Golgi est corrélée à celle des microtubules puisque leur dépolymérisation par des agents chimiques (colchicine, nocodazole) entraîne une dispersion du Golgi. C'est pourquoi nous avons supposé que TBK1 pourrait s'accumuler plus précisément au niveau du centrosome, ce que nous avons à ce jour vérifié. Or, une étude qui vient d'être publiée montre que la perturbation du centrosome est corrélée à une diminution de la sécrétion de l'IL6 et l'IL10, suggérant ainsi un rôle critique de cet organite pour la production cytokinique³⁶⁸. Il faudrait maintenant établir un lien entre ces différentes constatations pour éventuellement découvrir un nouveau rôle de TBK1 dans les voies sécrétoires et ajouter un nouveau degré de complexité des réponses immunes.

Certaines études ont également rapporté que d'autres adaptateurs, tels que NAP1 ou SINTBAD, sont impliqués dans l'activation de TBK1 durant les réponses antivirales^{108, 369}. Nous avons constaté que, comme OPTN, NAP1 et SINTBAD sont partiellement localisés au niveau de l'appareil de Golgi, fournissant une preuve supplémentaire du rôle critique de cet organite lors de l'immunité innée. D'autres études sont nécessaires pour déterminer si ces adaptateurs agissent de concert avec l'appareil de Golgi pour promouvoir l'activation de TBK1 et si tel est le cas, par quels mécanismes. En effet, l'observation d'une faible production d'IFN- β mais néanmoins présente dans les cellules déficientes pour OPTN

suggère que des facteurs autres qu' OPTN contribuent à l'activité de TBK1 ou que cette réponse partielle dépend de l'activité de IKK ϵ , qui contrairement à TBK1 n'interagit pas avec OPTN. Il serait intéressant d'établir la proportion relative des différents complexes de TBK1, si ils sont activés sélectivement par différents ligands et s'il peut exister un effet synergique entre eux.

Ubiquitination de TBK1

L'ubiquitination joue un rôle central dans la transmission des signaux nécessaires à l'activation des réponses innées antivirales. Les protéines, ciblées notamment par l'ubiquitination de type K63, sont capables par la suite de se livrer à de nouvelles interactions protéiques avec des molécules contenant des domaines de liaison à l'ubiquitine (UBD), contribuant ainsi à la formation d'un signalosome fonctionnel. Plusieurs protéines, y compris TANK, RIG-I, MAVS et TRAF3 sont sujettes à l'ubiquitination de type K63, lors de l'activation des voies de signalisation initiées en aval des RLRs et du TLR3. Récemment il a été démontré que l'ubiquitination K63 joue un rôle essentiel au cours de l'activation de TBK1^{331, 360}. Une étude de 2012 a révélé l'importance des résidus Lysine 69, 154 et 372 pour l'ubiquitination de cette protéine³²⁸. D'un point de vue structurel, il semble peu probable, pour deux des résidus décrits, qu'ils soient sujets à des modifications. La Lys154 forme des interactions structurelles clés et est quasi universellement conservée parmi toutes les protéines kinases. Une modification de ce résidu pourrait alors perturber le repliement du domaine kinase. La Lys372 est l'un des résidu les plus variables des séquences de TBK1 et IKK ϵ , et l'accès à ce résidu semble être entravée dans le dimère de TBK1³³¹. Après réalisation de mutants de TBK1 pour ces lysines (simples ou doubles mutants) par mutagenèse dirigée, nous avons réalisé des expériences de luciférase à l'aide d'un vecteur exprimant la luciférase sous le contrôle du promoteur de l'IFN β . Contrairement aux résultats attendus, ces mutants étaient toujours capable d'induire la production d'IFNs de type I, suggérant ainsi que d'autres résidus lysines sont impliqués dans l'ubiquitination nécessaire à l'activation de TBK1.

Dans un contexte de transformation cellulaire et de signalisation immunitaire, Zhou *et al.* ont étudié le rôle essentiel de la polyubiquitination K63 dans la régulation d'IKK ϵ ³⁷⁰. Fait intéressant, les deux résidus essentiels pour polyubiquitination d'IKK ϵ , la Lys30 et la Lys401, sont conservés chez son homologue TBK1. L'équipe du Dr. Eck, démontre alors que l'ubiquitination des Lys30 et Lys401 de TBK1 est essentielle pour son activité.

Structurellement ces deux résidus se trouvent sur des faces opposées des monomères mais sont à proximité dans le cadre du dimère catalytiquement actif de TBK1³³¹.

Nous avons ainsi confirmé que l'ubiquitination des Lys30 et Lys401 est essentielle pour l'activité de TBK1; Tout d'abord la surexpression du double mutant ne conduit pas à l'activation de la kinase par trans-autophosphorylation, suggérant ainsi que l'ubiquitination est directement requise pour l'activation de TBK1. De plus la mutation de deux sites d'ubiquitination perturbe la signalisation conduisant à la production de l'IFN- β . Le rôle mécanistique de cette ubiquitination n'a cependant pas été élucidé jusque là. Nous démontrons ici que cette ubiquitination conduit à l'adressage de TBK1 au niveau de l'appareil de Golgi pour une activation optimale, suggérant ainsi que les sites d'ubiquitination de TBK1 (cette kinase possède plus de 50 résidus lysine conservés entre l'homme et la souris) peuvent affecter la distribution subcellulaire de la protéine et la signalisation qui en résulte. Il serait notamment intéressant de déterminer si TBK1 est ubiquitinylée après la dépolarisation mitochondriale, et, le cas échéant, sur quels résidus lysine, pour son adressage et une activation à la mitochondrie pour la mitophagie, tel que décrit récemment^{362, 363}.

Il a été proposé que les E3 ubiquitine ligases Mind Bomb (MIB1 et MIB2) sont impliquées dans l'ubiquitination K63 de TBK1 afin de permettre son activation^{289, 328}. Or entre nos mains et dans nos modèles, l'extinction de MIB1 et MIB2 n'affecte pas l'ubiquitination et donc l'activation de TBK1 après stimulation des RLRs ou du TLR3, suggérant l'implication d'autres E3 ubiquitine ligases dans le processus d'ubiquitination de TBK1. Nous envisageons donc d'identifier ces E3 ubiquitine ligases par spectrométrie de masse. Il serait en effet intéressant, une fois identifiées, de confirmer que leur extinction, conduit à la diminution de l'activation de TBK1 et notamment à un défaut d'adressage de TBK1 au niveau de l'appareil de Golgi.

Optineurine et NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B régule l'expression de pléthore de gènes, impliqués dans divers processus physiologiques notamment la prolifération et la survie cellulaire, l'inflammation ainsi que les réponses immunes³⁷¹. Il n'est donc pas surprenant qu'une dérégulation de ce facteur de transcription soit à l'origine de multiples pathologies telles que le cancer et les maladies auto-immunes, inflammatoires et neurodégénératives. Par conséquent une fine régulation de NF- κ B est nécessaire au maintien de l'homéostasie.

Optineurine (OPTN), également appelée NRP (NEMO Related Protein), présente plus de 53% d'homologie avec la sous-unité régulatrice du complexe IKK « NEMO » (Figure 20). Malgré cette forte similitude, OPTN n'est pas retrouvée dans le même complexe de signalisation du récepteur au TNF qu'IKK β et NEMO et son expression ne peut compenser l'absence de ce dernier dans la voie de signalisation du TNF d'une lignée cellulaire pré-B³⁷². Cependant, plusieurs études suggèrent qu'OPTN serait un régulateur négatif de la voie NF- κ B stimulé par le TNF- α . En effet, Zhu et ses collaborateurs proposent qu'en aval de la stimulation du TNFR, OPTN inhibe l'activation de NF- κ B en rentrant en compétition avec NEMO pour la liaison aux chaînes d'ubiquitine de type K63 catalysées sur RIP1³⁷³. L'effet inhibiteur d'OPTN pourrait également s'exprimer via son interaction avec les DUBs. Il a été rapporté qu'OPTN servirait d'adaptateur permettant ainsi la liaison de CYLD et A20 à leurs substrats ubiquitinylés afin d'inhiber l'activation de NF- κ B en aval de la stimulation du TNFR³⁷⁴. Fait intéressant, l'expression d'OPTN est elle-même régulée par NF- κ B en réponse au TNF, suggérant alors qu'elle pourrait faire partie d'un mécanisme de rétrocontrôle négatif de cette voie de signalisation³⁷⁵. Un autre indice qu'OPTN inhiberait l'activation excessive de NF- κ B est survenu lors de l'étude de deux maladies neurodégénératives humaines, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et le glaucome primitif à angle ouvert³⁷⁶. Un nombre important de mutations d'OPTN associées à une neurodégénération, sont soit d'importantes délétions de la région C-terminal ou des mutations ponctuelles de l'UBD, suggérant ainsi que l'absence de liaison à l'ubiquitine est un mécanisme physiopathologique majeur.

Dans un premier temps, Ashwell et ses collaborateurs ont montré que le domaine UBD, intact, d'OPTN conférait la capacité d'inhiber l'activation de NF- κ B *in vitro*³⁷⁷. Ils ont ensuite étudié le rôle d'OPTN dans la signalisation du TNFR et celle d'autres récepteurs dans un modèle murin dans lequel l'OPTN WT a été remplacé par un mutant dépourvu du domaine UBD. La délétion de la partie C-terminale de cette protéine conduit à une sous-expression de la protéine tronquée, permettant d'étudier l'effet de sa sous-expression. Bien que le développement des différentes cellules immunitaires dépend de NF- κ B, aucune modification de la cellularité ou d'auto-immunité n'a été retrouvée chez ces souris. De plus, suite à la stimulation des lymphocytes T par le TCR, des macrophages et des CD par l'intermédiaire du TNFR ou du TLR4, et des LB via le TLR4 ou le CD40, aucun signe d'altération de l'activation NF- κ B n'a été observé, argumentant fortement contre un rôle d'OPTN dans la régulation de ce facteur de transcription³⁷⁷. Ces résultats suggèrent que les données *in vitro* étaient probablement un artefact de surexpression plutôt qu'une démonstration qu'OPTN était

un régulateur négatif de NF- κ B, les effets « off-target » n'étant pas rares pour les protéines liant l'ubiquitine. Enfin, bien qu'exprimé dans tous les types cellulaires, il n'est pas impossible qu'OPTN présente des fonctions « cellules spécifiques », qui ne sont peut être observables que dans certains neurones ou cellules gliales.

Nos travaux semblent confirmer les résultats obtenus par l'équipe d'Ashwell. En effet, l'extinction d'OPTN par siRNA dans différentes lignées cellulaires (HEK293T, HeLa et MEF) ou par la technologie des Crisp/Cas9 dans des HeLa ne semble pas affecter l'activation du facteur de transcription NF- κ B d'un point de vue protéomique, transcriptomique et sécrétoire, ce après stimulation des RLRs et du TLR3. Effectivement, dans les cellules où l'expression d'OPTN est éteinte, nous n'avons observé aucune modification quant à la phosphorylation I κ B α , qui entraîne sa dissociation du facteur de transcription NF- κ B, traduisant ainsi son activation. La phosphorylation de cet inhibiteur étant un pré-requis à sa dégradation, celle-ci ne présente donc aucune variation. De plus, dans ces mêmes cellules nos expériences de RT-qPCR et d'ELISA montre que la quantité d'IL-6 produite et sécrétée est inchangée, l'IL-6 étant la principale cytokine produite suite à l'activation de NF- κ B. La confirmation de l'ensemble de ces résultats dans les MEF et les BMDM provenant du modèle animal de l'équipe du Dr Ashwell, indique qu'OPTN ne joue aucun rôle clé dans la régulation de la signalisation conduisant à l'activation de NF- κ B.

En accord avec ces résultats, une très récente étude, utilisant des souris OPTN knock-out et leurs cellules, montre que l'OPTN ne joue pas un rôle majeur dans la signalisation NF- κ B³⁷⁸. Suite à l'activation du TNFR et des TLRs, son absence n'a aucune incidence sur l'activation de ce facteur de transcription, ni sur l'induction de l'expression des gènes inflammatoires associée à son activation, *in vivo* et *ex vivo*.

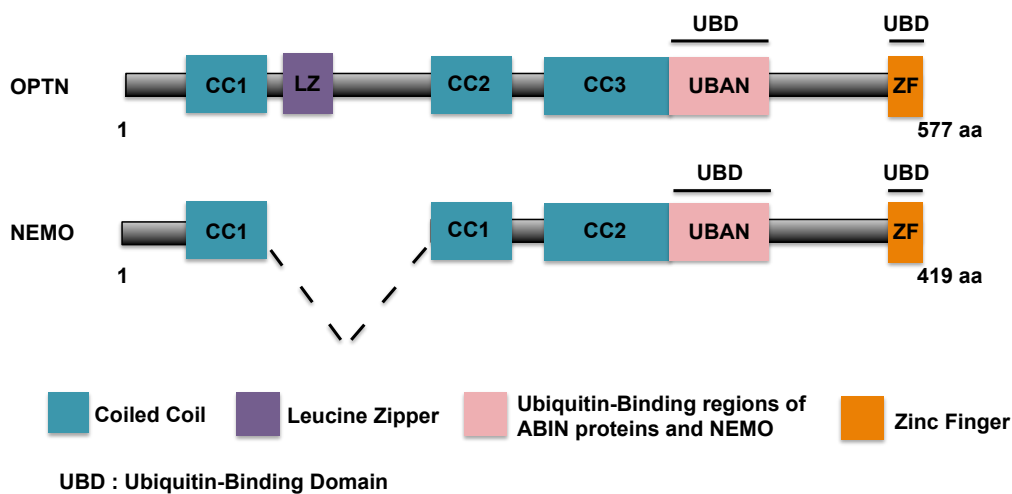


Figure 20 : Structures d'OPTN et NEMO

OPTN, régulateur positif de la voie IFN

Le premier article suggérant une fonction d'OPTN au cours d'une réponse immunitaire antivirale montre l'association de cette protéine avec la kinase TBK1³⁷⁹. Depuis le rôle d'OPTN dans l'assemblage du signalosome de cette kinase a été abordé dans plusieurs études, avec des résultats contradictoires.

L'équipe de Mankouri a tout d'abord constaté que suite à une infection virale, la surexpression d'OPTN dans des cellules HEK293-hTLR3 inhibe, tandis que son extinction transitoire promeut la production d'IFNs de type I³⁸⁰. Ces résultats suggèrent alors qu'OPTN est un régulateur négatif de l'activation de TBK1. L'une des hypothèses émises est qu'au vu de sa forte homologie avec NEMO, OPTN pouvait alors agir comme inhibiteur compétitif de celui-ci. Cependant, deux modèles murins conçus pour supprimer la capacité d'OPTN à se lier à l'ubiquitine, l'un portant une mutation ponctuelle dans l'UBD (OptnD477N) et l'autre dépourvu de la région C-ter, incluant l'UBD et ZF (Optn470T), affirme le contraire en soutenant que la capacité d'OPTN à se lier à l'ubiquitine est nécessaire pour une régulation positive de TBK1. En particulier, dans les macrophages (BMDM) et les cellules dendritiques (BMDC) issus de la moelle osseuse, de ces deux modèles animaux, OPTN est nécessaire à une activation optimale de TBK1 et par conséquent à la sécrétion des IFNs après stimulation du TLR-3, -4 et -9^{377, 381}. Compte tenu des derniers résultats *in vivo*, il semblait que le rôle d'OPTN dans la régulation de TBK1 soit établi, cependant une étude menée par l'équipe du Dr. Weil réitère un rôle négatif possible d'OPTN dans un modèle d'infection virale dans des HeLa. En outre cette étude a proposé un nouveau mécanisme dans lequel OPTN recrute la déubiquitinase CYLD au niveau de TBK1 permettant la déubiquitination de cette kinase et son inhibition³⁸². Etant donné qu'OPTN interagit avec un grand nombre de protéines cellulaires, et que son expression est induite suite à la stimulation des cellules, il est possible que cette protéine participe à d'autres voies de régulation et qu'elle présente différentes activités à des temps différents après stimulation. En outre, compte tenu des écarts entre les résultats *in vivo* et *in vitro*, il est possible que OptnD477N et Optn470T, qui, comme la plupart des mutations trouvées chez les patients présentant une ALS sont incapables de se lier aux chaînes d'ubiquitine, agissent de manière dominante négative.

Dans notre laboratoire, l'extinction d'OPTN par siRNA, dans différentes lignées cellulaires humaines (HEK293, HeLa) et murines (MEF) conduit à une diminution de la phosphorylation et donc de l'activation de TBK1 et de la signalisation en aval, corrélée avec

la diminution de la production des IFNs de type I. Contrairement aux études précédentes utilisant également cette technologie, nous concluons qu'OPTN est un régulateur positif de cette voie de signalisation. Il a été suggéré que la divergence des résultats pouvait s'expliquer par une perte de spécificité de la signalisation causée par la surexpression d'un de ces acteurs ou par un effet off-target de siRNA, conduisant à des conclusions éronnées de la part des équipes utilisant ces techniques. Pour notre part, pour éliminer tout doute quant à un possible effet off-target de nos siRNAs, nous avons également éteint l'expression d'OPTN par la technologie des Crispr/Cas9. De même que précédemment, le knock-out d'OPTN conduit à une diminution de l'activation de la voie IFN et ce d'un point de vue protéomique, transcriptionnel et sécrétoire. Cependant, cette technologie n'est pas à l'abri d'effets off-target, c'est pourquoi il aurait été intéressant de réaliser un rescue de notre modèle afin de démontrer de façon clair que l'effet observé est uniquement du à OPTN. Toutefois, l'utilisation de cellules primaires (BMDM et MEF) provenant d'un modèle murin déficient pour OPTN démontre clairement un rôle primordial de cette adaptateur dans l'activation de TBK1 après stimulation du TLR3 et des RLRs.

Enfin, deux études viennent conforter nos observations, l'une rapporte que les précurseurs d'ostéoclastes de souris mutantes pour OPTN produisent des niveaux anormalement bas d'IFN β en réponse à RANKL ; l'autre, qu'en réponse au Poly(I :C), les BMDM provenant de souris OPTN $^{-/-}$ présentent une altération de la voie IRF conduisant à une faible production des IFNs^{378, 383}.

[OPTN, senseur des chaînes d'ubiquitine de TBK1](#)

Le premier article suggérant une fonction d'OPTN au cours de la réponse antivirale montre que l'extrémité N-terminale de cette protéine peut se lier à TBK1³⁷⁹. Ce site de liaison localisé entre les résidus 1-127 peut vraisemblablement être restreint aux résidus 78-121 d'OPTN_h, site hautement homologue au domaine de liaison de TBK1 avec trois autres protéines adaptatrices, à savoir TANK, NAP1 et SINTBAD, également impliquées dans l'activation d'IRF3 et NF- κ B. Cependant, il a été suggéré que l'interaction entre OPTN et TBK1 était constitutive et indépendante de l'ubiquitination^{380, 381}. Ceci est en contradiction avec le modèle de régulation dynamique de TBK1 dans lequel la stimulation par des PAMPs conduit au recrutement, via des protéines adaptatrices, de la kinase inactive au sein d'un signalosome, entraînant de ce fait une forte concentration locale de celle-ci et à son activation par trans-autophosphorylation³⁵⁹. Nous avons démontré que suite à une stimulation du TLR3

ou des RLRs, un recrutement de TBK1 est observé au niveau d'OPTN, et cela a également confirmé par une récente publication³⁸⁴. Cette interaction inductible suggère que la fonction de protéine échafaudage d'OPTN précède le recrutement de TBK1. En outre, l'ubiquitination de type K63 des lys30 et 401 de TBK1 est un pré-requis pour son activation et OPTN contrairement à NAP1 et SINTBAD, possède des sites de liaison à l'ubiquitine³³¹. Effectivement, de manière semblable à NEMO, OPTN possède dans sa partie C-terminale deux domaines de liaison à l'ubiquitine composés d'un domaine UBAN (Ubiquitin-Binding regions of ABIN proteins and NEMO) ainsi que d'un domaine en doigt de zinc (ZF, Zinc finger) lui conférant la capacité de se lier aux chaînes d'ubiquitine de type K63 et M1^{373, 385} (Figure 20). De plus, une publication a décrit le rôle primordial de l'UBD d'OPTN pour une activation optimale de TBK1 et la production d'IFN³⁸¹. De ce fait, il a été proposé que des adaptateurs, possédant un UBD, pouvaient reconnaître les chaînes d'ubiquitine associées à TBK1 déclenchant ainsi une oligomérisation supérieure de la kinase entraînant finalement sa trans-autophosphorylation³⁸⁶ (Figure 21).

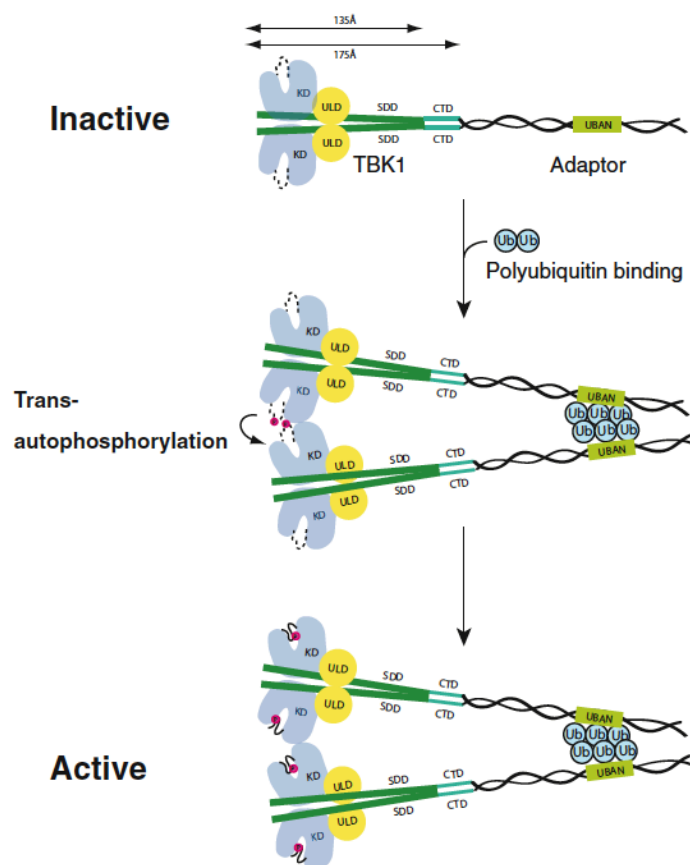


Figure 21 : Modèle d'activation de TBK1³⁸⁶

Compte tenu des observations et du modèle précédent, nous avons émis l'hypothèse qu'OPTN pourrait reconnaître les chaînes d'ubiquitine associées à TBK1, via son UBD. Après co-transfection d'OPTN-Flag et des différentes constructions de TBK1, une immunoprécipitation d'OPTN a été réalisée. Nous avons alors constaté une diminution significative de l'interaction entre OPTN et TBK1 lorsque celui-ci présente un défaut d'ubiquitination (Figure 22). De plus un défaut d'agrégation de TBK1 au niveau de l'appareil de Golgi est observé dans ces mêmes conditions. Il semblerait donc qu'OPTN recrute, via son UBD, TBK1 ubiquitinylé, au niveau de l'appareil de Golgi.

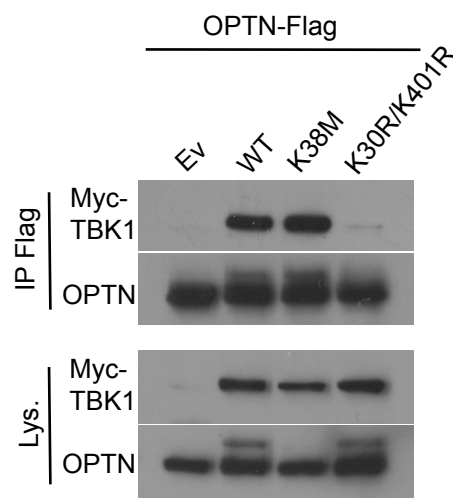


Figure 22 : OPTN, senseur des chaînes d'ubiquitine de TBK1

Des cellules HEK293T ont été co-transfectées par les plasmides OPTN-Flag et les différentes constructions de TBK1. Les lysats cellulaires ont alors été soumis à une immunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre l'étiquette Flag. Les échantillons ont ensuite été analysés par western blot avec les anticorps dirigés contre les protéines indiquées.

Nous sommes désormais dans la mesure de compléter le modèle d'activation de TBK1 : Suite à une infection virale, l'engagement des PRRs et de leurs adaptateurs déclenche une cascade de signalisation menant notamment à l'ubiquitination de TBK1. OPTN reconnaît alors, via son UBD, les chaînes d'ubiquitine associées à TBK1 ayant pour conséquence le recrutement de TBK1 au niveau de l'appareil de Golgi conjointement à son oligomérisation aboutissant finalement à sa trans-autophosphorylation. Une fois totalement activée, cette protéine peut alors exercer son rôle de kinase en phosphorylant IRF3 (Figure 23).

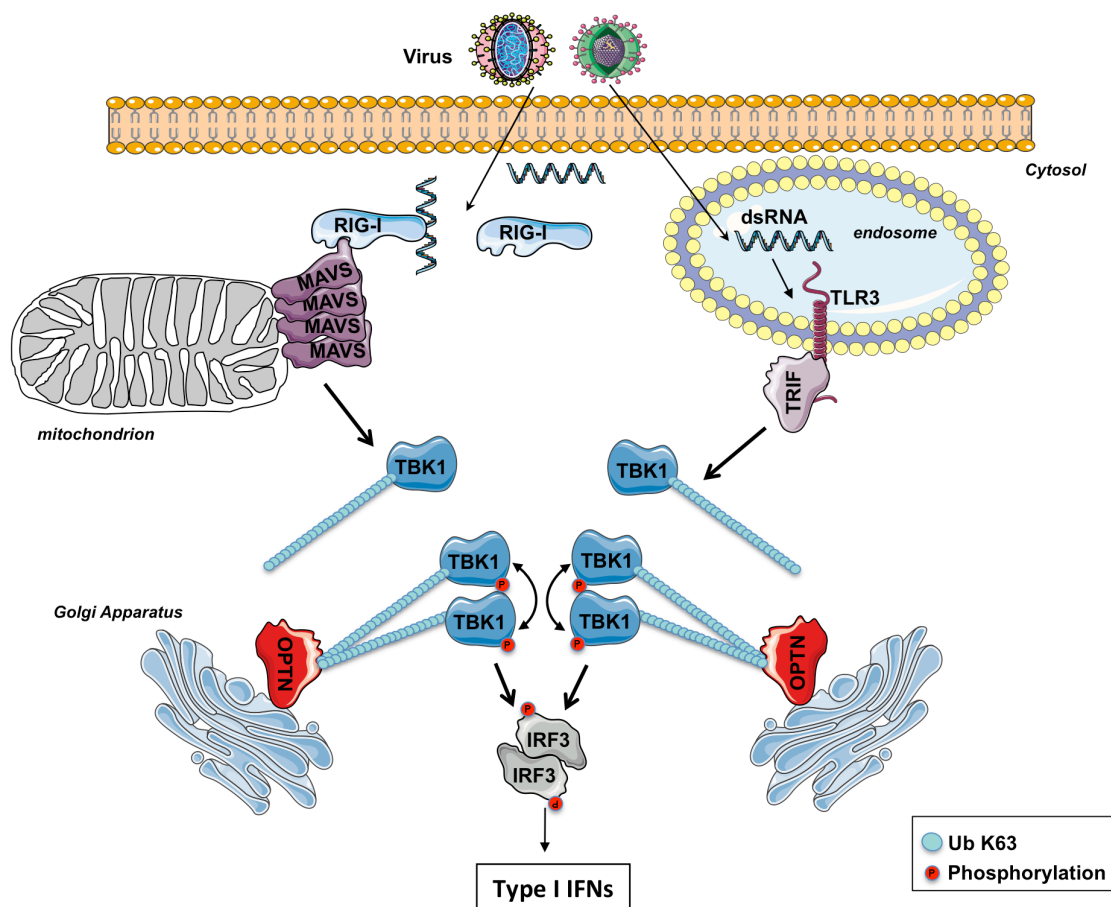


Figure 23 : Mécanisme d'activation de TBK1 suite à l'activation des RLRs et du TLR3

Les résultats actuels suggèrent que ni l'extrémité N-terminale, ni l'UBD seuls sont suffisants pour cette interaction, soutenant ainsi un modèle de liaison bi-partite entre OPTN et TBK1^{381, 384} ; l'interaction en N-terminale étant encore renforcée lors de l'ubiquitination de TBK1. Il est possible que cette interaction bi-partite permette un mécanisme de rétro-action positif entre ces deux protéines, comme récemment proposé lors de la mitophagie où la phosphorylation d'OPTN par TBK1 sur les résidus S473 et S513 augmente sa liaison aux mitochondries ubiquitinylées, qui à son tour amplifie l'activation de TBK1³⁶².

[OPTN, cible de la protéine NS3 du BTV](#)

Le système interféron est une mécanique antivirale puissante et complexe qui permet de circonscrire la propagation virale avant la mise en place d'une réponse immune spécifique. Les virus ont su pour la plupart co-évoluer avec ce système en développant des stratagèmes

originaux afin d'échapper à cette réponse. Ils ont notamment sélectionné une grande diversité de mécanismes pour contrecarrer la voie IFN à la fois au niveau de son induction et de ses effecteurs, témoignant ainsi de l'importance physiologique de cette voie.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons découvert que la protéine NS3 du BTV (BlueTongue Virus) cible OPTN au niveau de l'appareil de Golgi, diminuant ainsi l'activation de TBK1 et la signalisation résultante.

Le BTV ou virus de la fièvre catarrhale appartient à la famille des Reoviridae et au genre Orbivirus. Dix segments d'ARNdb constituent le génome viral qui code pour sept protéines structurales (VP-1 à -7) et cinq protéines non structurales (NS1 à NS4 et NS3A)³⁸⁷. Ce virus est connu depuis de nombreuses années pour être un puissant inducteur des interférons de type I dans de nombreux modèles *in vitro* et *in vivo* provenant de tissus et d'espèces variés. L'implication de RIG-I et MDA5 dans la synthèse d'IFN- β au cours de l'infection par le BTV a récemment été démontrée³⁸⁸. Cependant d'autres PRRs pourraient contribuer à ce processus dans certaines cellules ou espèces. Une étude récente, a en effet montré que le BTV infecte à la fois les pDCs et cDCs ovines mais induit la production d'IFN- α/β uniquement dans les pDCs via un mécanisme qui requiert la maturation des endosomes en absence de réplication virale³⁸⁹. Ils démontrent également que le BTV active la voie de signalisation des IFN- α/β dans les pDCs via MyD88, ainsi que via les kinases PKR et JNK³⁸⁹. C'est résultats indiquent l'existence de réponses cellulaires différentes entre les cellules immunes et non immunes. Ainsi, au cours des premiers stades de l'infection, une forte production systémique d'IFN- α/β et d'autres cytokines serait induite dans des cellules présentatrices d'antigènes spécialisées (principalement des pDCs) par un mécanisme RLR-indépendant qui requiert la réplication virale, puis dans les principales cellules cibles de l'infection, telles que les cellules endothéliales, des PRRs distincts répondent aux produits de la réplication du BTV afin d'induire une réponse antivirale locale.

L'équipe du Dr. Damien Vitour a observé une réduction significative de l'activité luciférase (sous le contrôle du promoteur IFN) dans des cellules infectées avec le BTV-8 démontrant par là même la capacité du virus à bloquer la voie des RLRs³⁹⁰. Afin d'évaluer quelle(s) protéine(s) virale(s) pouvaient être à l'origine de cet effet inhibiteur, l'effet de chaque protéine du BTV-8 a été évalué sur l'activation du promoteur IFN- β après stimulation par RIG-I. De façon intéressante, l'activation du promoteur IFN- β était drastiquement affectée par la surexpression de la protéine NS3³⁹⁰. Notre intérêt pour cette protéine est survenu lorsque nous avons appris qu'elle se localisait au niveau de l'appareil de Golgi, fait que nous avons vérifié par immunofluorescence. Après avoir contrôlé qu'entre nos mains l'expression

de NS3 conduisait également à une diminution de l'activité du promoteur interféron (test luciférase) et par conséquent à une diminution de la phosphorylation et de l'activation de TBK1 et IRF3, nous avons pu émettre l'hypothèse que l'action de NS3 se situait au niveau d'OPTN. En accord avec ce postulat, des expériences avaient montré que NS3 interférait avec la voie de signalisation des RLRs en amont des kinases TBK1/IKK ϵ et au niveau ou en aval de MAVS. En effet, les protéines MAVS, TBK1, IKK ϵ et IRF3-5D (une forme constitutivement active d'IRF3) ont été surexprimées comme activateurs du promoteur IFN- β . Alors que l'action de TBK1, IKK ϵ et IRF3-5D n'était pas ou peu affectée par NS3, ce dernier était en revanche capable de bloquer l'activation du promoteur IFN- β médiée par MAVS³⁹⁰. Nous avons alors entrepris de réaliser des expériences d'immunoprécipitation qui démontrent une interaction entre OPTN et NS3. OPTN et TBK1 forment un complexe de signalisation qui conduit notamment à la production des IFN de type I. Puisque NS3 interagit avec OPTN et perturbe les réponses menées par TBK1 nous avons alors pensé que NS3 pourrait interférer dans l'interaction OPTN-TBK1. Suite à une infection virale, nous avons donc réalisé des expériences d'immunoprécipitation en présence ou en absence de NS3. Dans les cellules exprimant NS3, une forte diminution de l'interaction entre OPTN et TBK1 est observée, suggérant ainsi que cette protéine virale bloque l'interaction de TBK1 avec OPTN. Nous avons enfin établi que les cellules exprimant NS3 présentent un défaut d'agrégation de TBK1 au niveau de l'appareil de Golgi. Ainsi NS3 inhibe la formation du complexe OPTN-TBK1, suite à un défaut de recrutement de TBK1 au niveau de son adaptateur. Il serait maintenant important de définir les domaines d'interactions entre NS3 et OPTN. Pour cela, il serait nécessaire d'évaluer la capacité de NS3 à interagir avec une protéine OPTN déficiente soit pour sa partie N- ou C-Terminale, afin de déterminer si cette protéine virale entre en compétition avec le domaine de liaison de TBK1. Dans le cadre de nos expériences, nous avons exprimé une protéine NS3 taggée, il conviendrait donc de réaliser des infections avec des souches de BTV pour ensuite confirmer que, dans ce cas là, nous observons toujours une diminution de l'interaction de TBK1 avec OPTN et un défaut d'agrégation de celui-ci au niveau de l'appareil de Golgi. Lors de nos expériences de luciférase en présence de NS3, nous n'observons pas une inhibition de l'activation du promoteur IFN, mais plutôt une diminution significative, suggérant ainsi que NS3 n'est en soi pas suffisant pour inhiber complètement la réponse immune. En effet, il a été récemment démontré que la protéine NS4, protéine nucléaire serait un antagoniste des IFNs et un facteur déterminant de la virulence virale³⁹¹. On pourrait alors utiliser des souches de BTV normales ou délétées pour NS3, NS4 ou les deux afin d'observer un possible effet synergique mais également vérifier qu'en absence de NS3,

un retour de l'interaction entre OPTN et TBK1 est possible. A noter qu'il faudrait vérifier que ce mécanisme d'échappement s'applique dans d'autres types cellulaires.

Le fait qu'OPTN soit ciblée par une protéine virale pour diminuer la production des IFN de type I renforce nos constatations selon lesquelles OPTN est un effecteur important dans l'activation de TBK1. Conformément à cette constatation, d'autres virus ont développé des stratégies ciblant les protéines adaptatrices impliquées dans l'activation de TBK1. La protéine C6 du virus de la vaccine se lie aux protéines adaptatrices, TANK, NAP1 et SINTBAD, inhibant ainsi l'activation d'IRF3 et d'IRF7³⁹² et la protéine Gn des hantavirus perturbe quant à elle la formation des complexes TRAF3-TBK1, bloquant ainsi la réponse en aval³⁹³. Il n'est pas impossible que d'autres virus, qui comme le BTV possèdent une de leur protéine au niveau de l'appareil de Golgi puissent également utiliser cette stratégie.

Quand est-il de l'activation d'IRF3 ?

Au cours de cette étude nous avons démontré qu'OPTN recrute TBK1, via ses chaînes d'ubiquitine, au niveau de l'appareil de Golgi où la kinase pourra alors s'activer par trans-autophosphorylation. Cependant nous n'avons pas exploré comment IRF3, substrat de TBK1, atteint ce complexe de signalisation ainsi formé pour être à son tour activé.

Une étude publiée récemment atteste avoir découvert un mécanisme général d'activation de ce facteur de transcription, via les protéines adaptatrices MAVS, STING et TRIF³⁶⁴. Après leur stimulation, chaque adaptateur recrute et active la kinase TBK1, qui va alors les phosphoryler, en retour, au niveau d'un motif consensus. Une fois phosphorylé, ces adaptateurs recrutent à leur tour IRF3, via un domaine conservé de reconnaissance des phosphoprotéines, permettant son activation par TBK1. IRF3 va alors se dissocier et se dimériser avant de transloquer dans le noyau pour induire la production des IFNs³⁶⁴.

Bien que localisé au niveau de l'Appareil de Golgi, il est tout à fait possible que la forme active de TBK1 puisse phosphoryler les adaptateurs décrit ci-dessus afin de favoriser le recrutement et l'activation d'IRF3. En effet, les mitochondries (où est ancré MAVS) et les endosomes (où est recruté TRIF après stimulation du TLR3) par le biais, respectivement, de leur dynamique ou leur trafic, sont continuellement à proximité de l'appareil de Golgi, permettant ainsi à TBK1 de phosphoryler les protéines adaptatrices, processus qui semble nécessaire à l'activation d'IRF3.

En plus d'être, au niveau de l'appareil de Golgi, un senseur des chaînes d'ubiquitine de TBK1, OPTN a également été décrite comme un substrat de TBK1. En effet, sa

phosphorylation sur le résidu Ser177 par TBK1 augmente son association avec LC3 lors de l'autophagie de Salmonella conduisant à une restriction de la prolifération bactérienne intracellulaire³⁹⁴. OPTN est associée à l'appareil de Golgi via Rab8, or leur domaine d'interaction (141-209) inclut la S177. Après activation de TBK1, la phosphorylation d'OPTN pourrait alors perturber son association avec Rab8, permettant alors aux complexes TBK1/OPTN de quitter les membranes golgiennes qui pourrait de ce fait phosphoryler MAVS ou TRIF à la membrane des mitochondries ou des endosomes, respectivement.

Les adaptateurs MAVS, STING et TRIF, tout comme IRF3 sont phosphorylés par TBK1 au niveau d'un motif consensus. Bien qu'OPTN soit également phosphorylée par cette même kinase sur la S177, ce résidu sérine ne fait pas partie d'un tel motif. Cette observation ainsi que celle d'une absence d'interaction entre OPTN et IRF3 nous conduit à penser que cette phosphorylation n'est pas un signal de recrutement d'IRF3 au niveau des complexes OPTN/TBK1. Cette hypothèse est corroborée par l'observation au cours de l'infection, de l'accumulation de p-TBK1 au niveau des centrosomes à des temps tardifs, suggérant ainsi que la kinase activée est libérée des membranes golgiennes après son activation initiale au niveau de cet organe.

Quand est-il des autres voies de signalisation dépendante de TBK1 et OPTN ?

TBK1 et OPTN sont des protéines multifonctionnelles. Fait intéressant, elles forment une entité fonctionnelle non seulement lors de la signalisation de la réponse immune mais également lors de l'autophagie. Une fois phosphorylée par TBK1 sur le résidu S177, OPTN devient un adaptateur autophagique permettant le rapprochement entre LC3, composant des membranes autophagosomales et les cibles de l'autophagie telles que Salmonella, des agrégats de protéines ou encore les mitochondries endommagées^{362, 363, 395}. En particulier, lors de la dépoliarisation de la mitochondrie, l'activation et la localisation de TBK1 au niveau de cet organe, dépend de son interaction avec OPTN et la capacité de celle-ci à se lier aux chaînes d'ubiquitine au niveau mitochondrial³⁶². A son tour, la fonction d'OPTN durant la mitophagie dépend de l'activité kinase de TBK1. En effet, la phosphorylation de la S473 élargie la capacité d'OPTN à reconnaître de multiples chaînes d'ubiquitine qui en combinaison avec celle des résidu S177 et S513 favorise le recrutement et la rétention du complexe OPTN/TBK1 au niveau de la mitochondrie³⁹⁶. De plus, des mutations de TBK1 empêchant son interaction avec OPTN ont récemment été découvertes chez des patients atteints de SLA et les résultats préliminaires suggèrent que ces mutations causent une

déficience fonctionnelle de TBK1 dans l'autophagie plutôt que lors de la signalisation³⁹⁷. Nous ne savons pas, à ce jour, si il existe une diaphonie entre autophagie/mitophagie et les voies de signalisation conduisant à la production des IFNs et/ou si certaines de ces ressources, telles qu'OPTN sont limitées. Il est également possible que les deux événements soient spatialement et/ou temporellement distincts et que l'interaction inductible d'OPTN avec différentes protéines permette une distinction entre les différents événements cellulaires. Notamment, la phosphorylation d'OPTN sur le résidu S177 par une autre kinase, Polo-like kinase 1 (Plk1), provoque la dissociation d'OPTN avec Rab8, autorisant sa translocation nucléaire où elle s'associe à MYPT1, qui en retour antagonise l'activité de Plk1 et permet la division cellulaire³⁹⁸. Il est donc probable que d'autres mécanismes de régulation soient en place pour transduire efficacement les signaux spécifiques d'OPTN, qui peut apparemment subir des modifications post-traductionnelles similaires même lorsqu'elle exerce des fonctions différentes.

Quand est-il d'IKK ϵ , l'homologue de TBK1 ?

La sérine/thréonine kinase IKK ϵ est à la fois un régulateur de l'immunité innée et un oncogène qui est amplifié et surexprimé dans environ 30% des cancers du sein. IKK ϵ favorise la transformation maligne par l'activation de la signalisation NF- κ B. En outre, les cancers du sein qui abritent des amplifications dans le gène IKBKE dépendent de l'expression de la protéine pour leur survie. Bien que partageant 65% d'homologie de séquence avec TBK1, ces deux protéines présentent certaines différences qui ont leur importance. La délétion du gène de TBK1 conduit à une léthalité embryonnaire au 15^{ème} jour en raison de l'activation de l'apoptose, induite par le TNF, dans le foie, alors que les souris déficientes pour IKK ϵ sont viables. Les raisons de cette différence phénotypique sont encore incertaines mais peut refléter en partie l'expression différentielle de ces deux protéines. En effet, alors que TBK1 est constitutivement exprimée dans la plupart des cellules, IKK ϵ est inductible, majoritairement, dans les cellules immunitaires³⁹⁹. En outre, il est possible que ces deux protéines aient des fonctions non redondantes dans d'autres voies de signalisation que celles citées ci-après. IKK ϵ et TBK1 sont malgré tout similaires dans leur capacité à phosphoryler d'une part l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B α et d'autre part les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 responsables de la production des IFNs de type I. La question qui se pose alors est s'ils ont pour autant le même mécanisme d'activation ? Au cours de nos travaux, nous avons tout

d'abord observé que l'extinction d'IKK ϵ , par siRNA, n'affectait que très peu la production d'IFN contrairement à celle de TBK1. La double extinction de ces deux protéines conduit par contre à une inhibition de la réponse IFN. Il a également été démontré que la surexpression d'IKK ϵ , contrairement à celle d'un mutant dead kinase, pouvait restaurer l'activation d'IRF3, dans des cellules déficientes pour TBK1 témoignant ainsi d'une redondance entre ces deux protéines⁴⁰⁰. Malgré tout, certaines preuves semblent indiquer que le mécanisme d'activation de ces deux protéines diffère. Lors de nos travaux de recherche nous avons observé que lors d'une infection virale, la forme active de TBK1 s'accumule dans un premier temps au niveau de l'appareil de Golgi pour ensuite plus tardivement se localiser au niveau des centrosomes. Bien que nous n'ayons pas vérifié la localisation d'IKK ϵ , il semblerait que suite à une infection virale elle soit directement recrutée au niveau du réseau mitochondrial, via MAVS, cela nécessite cependant des investigations supplémentaires⁴⁰¹. Dans un contexte de transformation cellulaire et de signalisation immunitaire, Zhou *et al.* ont démontré qu'IKK ϵ était ubiquitinylé sur les résidus K30 et K401³⁷⁰. Dans le cadre de ma thèse, nous avons démontré que l'ubiquitination de TBK1 sur ces mêmes résidus permettait son recrutement, via OPTN, au niveau de l'appareil de Golgi où il peut alors se trans-autophosphoryler. Il semblerait cependant que ce ne soit pas le cas pour IKK ϵ puisque aucune interaction entre OPTN et cette kinase n'est observée par immunoprécipitation³⁸¹. De plus dans des BMDM OPTN^{D477N}, où la forme sauvage d'OPTN est remplacé par un mutant incapable de se lier aux chaînes d'ubiquitine, une diminution de l'activation de TBK1 est observée contrairement à celle de son homologue, en réponse au LPS, confirmant ainsi qu'OPTN n'est pas impliqué dans l'activation d'IKK ϵ ³⁸¹. Lors de leur étude, Zhou *et al* ont néanmoins montré que l'ubiquitination d'IKK ϵ est essentielle à son activité kinase. En effet, le double mutant pour les lysines 30 et 401 se lie toujours à CYLD mais est incapable de le phosphoryler, lui permettant alors d'exercer sa fonction de déubiquitinase. Il présente également un défaut de recrutement d'IKK β et NEMO.

Contrairement à TBK1, très peu de choses sont connues sur l'activation d'IKK ϵ , il serait donc intéressant de comprendre quels sont les mécanismes engagés, quelle est l'importance relative de cette kinase dans l'activation des IFNs et la complexité de fonctionnement du complexe TBK1/IKK ϵ .

Conclusion

Pris dans leur ensemble, nos résultats apportent de nouvelles évidences quant à l'implication des organites dans la transduction de la signalisation, et illustrent également la complexité de l'activation de la kinase TBK1, élément clé de la réponse antivirale, notamment via le processus d'ubiquitination.

Le système interféron est une mécanique antivirale puissante et complexe qui permet de circonscrire la propagation virale avant la mise en place d'une réponse immune spécifique. L'apport de découvertes fondamentales quant à l'activation de cette machinerie ouvre des perspectives intéressantes en termes de retombées thérapeutiques et/ou vaccinales. En effet, une stratégie antivirale consisterait à utiliser des agonistes des PRRs ou des activateurs des différents protagonistes de la voie IFN, notamment TBK1, pour soutenir cette réponse. Cette connaissance approfondie des voies de signalisation permet également la découverte de nouveaux stratagèmes développés par les virus pour esquiver nos réponses antivirales. On peut donc imaginer cibler les protéines virales qui bloquent la voie IFN afin de restaurer la signalisation et son action antivirale.

Outre son rôle dans l'immunité innée, une signalisation dérégulée de TBK1 est associée à une transformation oncogénique. En effet, il a été montré que TBK1 est impliquée dans la transformation cellulaire induite par Ras et la kinase AKT, dont la signalisation est importante dans la survie cellulaire, est un substrat direct de TBK1. Ainsi suite à la découverte que l'interaction d'OPTN avec TBK1 est inductible, dépendante de l'ubiquitination et essentielle pour l'activation de cette kinase, l'inhibition de ce complexe pourrait être une cible intéressante pour les réponses où TBK1 est hyperactivée comme dans certaines maladies auto-immunes ou certaines formes de cancer.

En plus de l'implication d'OPTN, de nouvelles causes génétiques de la SLA ont été découvertes, notamment TBK1. Le complexe que forme ces deux protéines est alors devenu une cible d'étude intrigante pour cette maladie neurodégénérative. Au vue de l'importance du complexe TBK1/OPTN dans différentes fonctions cellulaires, il est nécessaire de comprendre les mécanismes impliquant ces deux protéines et éventuellement leur connexion, qui aidera sans aucun doute à mieux cerner les causes de la SLA.

Annexes

Annexe 1

Mitochondrial hyperfusion promotes NF-kappaB activation via the mitochondrial E3 ligase Mulan

Zemirli N, Pourcelot M, Ambroise G, Hatchi E, Vazquez A, Arnoult D.

The FEBS journal 2014, **281**(14): 3095-3112.

Mitochondrial hyperfusion promotes NF- κ B activation via the mitochondrial E3 ligase MULAN

Naima Zemirli^{1,2,3,*}, Marie Pourcelot^{1,2,3,*}, Gorbachev Ambroise^{1,2,3}, Emeline Hatchi^{1,2,3}, Aimé Vazquez^{1,2,3} and Damien Arnoult^{1,2,3}

1 INSERM, UMR_S 1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

2 Université Paris-Sud P11, Orsay, France

3 Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Villejuif, France

Keywords

mitochondrial dynamics; MULAN; NF- κ B; SIMH; TRAF2

Correspondence

D. Arnoult, INSERM, UMR_S 1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif 94800, France

Fax: + 33 (0)1 45 59 53 43

Tel: + 33 (0)1 45 59 60 38

E-mail: damien.arnoult@inserm.fr

*These authors contributed equally to this work

(Received 28 March 2014, revised 25 April 2014, accepted 13 May 2014)

doi:10.1111/febs.12846

Mitochondria are dynamic organelles with a morphology resulting from the balance between two opposing processes: fusion and fission. Little is known about the function of mitochondrial fusion, beside its role in the maintenance of mitochondrial DNA. We report here that enforced mitochondrial hyperfusion, due to the expression of a dominant-negative mutant of Drp1 or of MARCH5, promotes NF- κ B activation in a TAK1- and IKK-dependent manner, through the mitochondrial E3 ubiquitin ligase MULAN. The capability of MULAN to activate NF- κ B depends on its RING domain and on the E3 ubiquitin ligase TRAF2. Under physiological conditions, stress-induced mitochondrial hyperfusion (SIMH) is also accompanied by NF- κ B activation, and the prevention of SIMH or the knockdown of MULAN impairs NF- κ B activation. During SIMH, MULAN forms a complex with TRAF2 and modulates its ubiquitylation, signifying that TRAF2 may serve as an ubiquitylated transmitter of NF- κ B signaling in this pathway. Our results suggest that mitochondria, through their dynamics, convert stress signals into a cell response leading to NF- κ B activation.

Structured digital abstract

- [TRAF2 physically interacts](#) with [MULAN](#) by [anti bait coip](#) ([View interaction](#))

Introduction

Mitochondria are dynamic organelles that continually move, fuse and divide [1]. Mammalian cells maintain the shape of their mitochondria through a balance between the opposing processes of mitochondrial fusion and fission. This dynamic behavior is essential for normal mitochondrial function and contributes to fundamental processes, such as development, cell death and aging [2]. The protein machinery regulating mitochondrial fission and fusion is now well characterized [1]. In mammalian cells, dynamin-related protein 1

(Drp1), hFis, mitochondrial fission factor, MiD49 and MiD51 are required for mitochondrial fission [3–6]. Mitofusin 1 (MFN1), mitofusin 2 (MFN2) and optic atrophy 1 (OPA1) are essential for the fusion of mitochondria [7,8]. Drp1, MFN1, MFN2 and OPA1 are dynamin-related GTPases [1].

Mitochondrial fission and fusion seem to be essential for mouse development and for neuronal survival and function in mice and humans, but little is known about the physiological role of mitochondrial

Abbreviations

ActD, actinomycin D; CHX, cycloheximide; Drp1, dynamin-related protein 1; IFN, interferon; IKK, inhibitor of NF- κ B kinase; I κ B, inhibitor of NF- κ B; MEF, mouse embryonic fibroblast; MFN1, mitofusin 1; MFN2, mitofusin 2; mtDNA, mitochondrial DNA; OPA1, optic atrophy 1; SIMH, stress-induced mitochondrial hyperfusion; siRNA, short interfering RNA; TNF, tumor necrosis factor.

dynamics in cell function and survival [1,2]. Mitochondrial fission is required for the selective elimination of depolarized mitochondria [9] and it occurs during apoptosis [10]. Fission of the mitochondrial network due to impaired mitochondrial fusion is often associated with bioenergetic defects due to a loss of mitochondrial DNA (mtDNA) [2]. Mitochondrial fusion is therefore required for mtDNA maintenance, probably because it allows mtDNA exchange between mitochondria. It has also been reported that mitochondria hyperfuse in cells exposed to stresses inhibiting protein synthesis, and this stress-induced mitochondrial hyperfusion (SIMH) has been proposed to constitute an adaptive response to stress [11].

The transcription factor NF- κ B is activated by many inducers, including moderate stresses [12,13]. Each inducer is recognized by a receptor at the cell surface or within the cell, and its binding triggers a specific signaling pathway leading to NF- κ B activation. Each pathway involves the organization of signaling protein complexes, the formation of polyubiquitin chains acting as binding agents on specific transmitters and the action of kinases [12–14]. Nevertheless, all these complexes have a point in common: they recruit and activate, through specific ubiquitylated transmitters, the inhibitor of NF- κ B (I κ B) kinase (IKK) complex, which consists of two catalytic kinases, IKK α and IKK β , and the regulatory subunit NEMO (also known as IKK γ). IKK then phosphorylates the inhibitory I κ B proteins, promoting their Lys48 (K48)-linked ubiquitylation and proteasomal degradation [12–14]. NF- κ B dimers subsequently enter the nucleus, where they initiate the transcription of their target genes, including genes encoding antiapoptotic proteins or proinflammatory cytokines.

Here, we report that hyperfusion of the mitochondrial network (e.g. due to the expression of a dominant-negative form of Drp1 or of MARCH5, or stresses inhibiting protein synthesis) promotes NF- κ B activation through the mitochondrial E3 ubiquitin ligase MULAN. Thus, mitochondrial dynamics convert stress signals into a prosurvival response via NF- κ B activation.

Results

Enforced mitochondrial hyperfusion promotes NF- κ B activation

We searched for new signals emanating from the mitochondrion and leading to NF- κ B activation. We unexpectedly found that the expression of a dominant-negative form of Drp1 (Drp1^{K38A}), a mediator of

mitochondrial fission [2], not only promoted a highly interconnected mitochondrial network (referred to here as mitochondrial hyperfusion), as reported in previous studies [15,16], but also triggered NF- κ B activation, as shown by assessing NF- κ B-driven luciferase reporter activity (Fig. 1A). By contrast, Drp1 expression had no effect on mitochondrial morphology or NF- κ B. For confirmation that mitochondrial hyperfusion did indeed lead to NF- κ B activation, we also expressed a mutant form of the mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 (MARCH5^{H43W}), which has also been reported to promote mitochondrial hyperfusion by altering the subcellular trafficking of Drp1 [17]. MARCH5 overexpression had no effect on the overall organization of the mitochondrial network, but the cells expressing MARCH5^{H43W} had a highly interconnected mitochondrial network and displayed NF- κ B activation (Fig. 1A). Mitochondrial hyperfusion seems to promote NF- κ B activation selectively, because the expression of Drp1^{K38A} or MARCH5^{H43W} did not stimulate the expression of interferon (IFN) β -, interferon-stimulated response element-, NFAT-, AP1- or p53-dependent reporter genes (Fig. 1A and data not shown). As a control, expression of the mitochondrial adaptor MAVS, which is involved in antiviral innate immunity [18], promoted both NF- κ B activation and IFN β promoter activity (Fig. 1A) although it triggered aggregation of the mitochondrial network (data not shown) [19]. Finally, confirming the activation of NF- κ B in response to mitochondrial hyperfusion, nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit was observed in cells with a highly interconnected mitochondrial network after their transfection with constructs encoding Drp1^{K38A} or MARCH5^{H43W} (Fig. 1B).

We then explored the signaling pathway involved in NF- κ B activation in response to mitochondrial hyperfusion, by knocking down the expression of several key proteins of the NF- κ B pathway with specific short interfering RNAs (siRNAs) (Fig. 2). Knocking down the expression of different members of the IKK complex (the catalytic kinases IKK α and IKK β and the regulatory subunit NEMO [20]) inhibited mitochondrial hyperfusion-induced NF- κ B activation (Fig. 1C). The IKK complex is activated by phosphorylation of the IKK β subunit by the kinase TAK1 [14]. Thus, in the absence of TAK1, but not of RIP1, NIK, IKK ϵ or TBK1, other kinases reportedly involved in some NF- κ B signaling pathways [13], NF- κ B activation was hampered following transfection with constructs encoding mutant forms of Drp1 and MARCH5 (Fig. 1D).

NF- κ B activation requires the nondegradative K63-linked polyubiquitylation of key transmitters. These

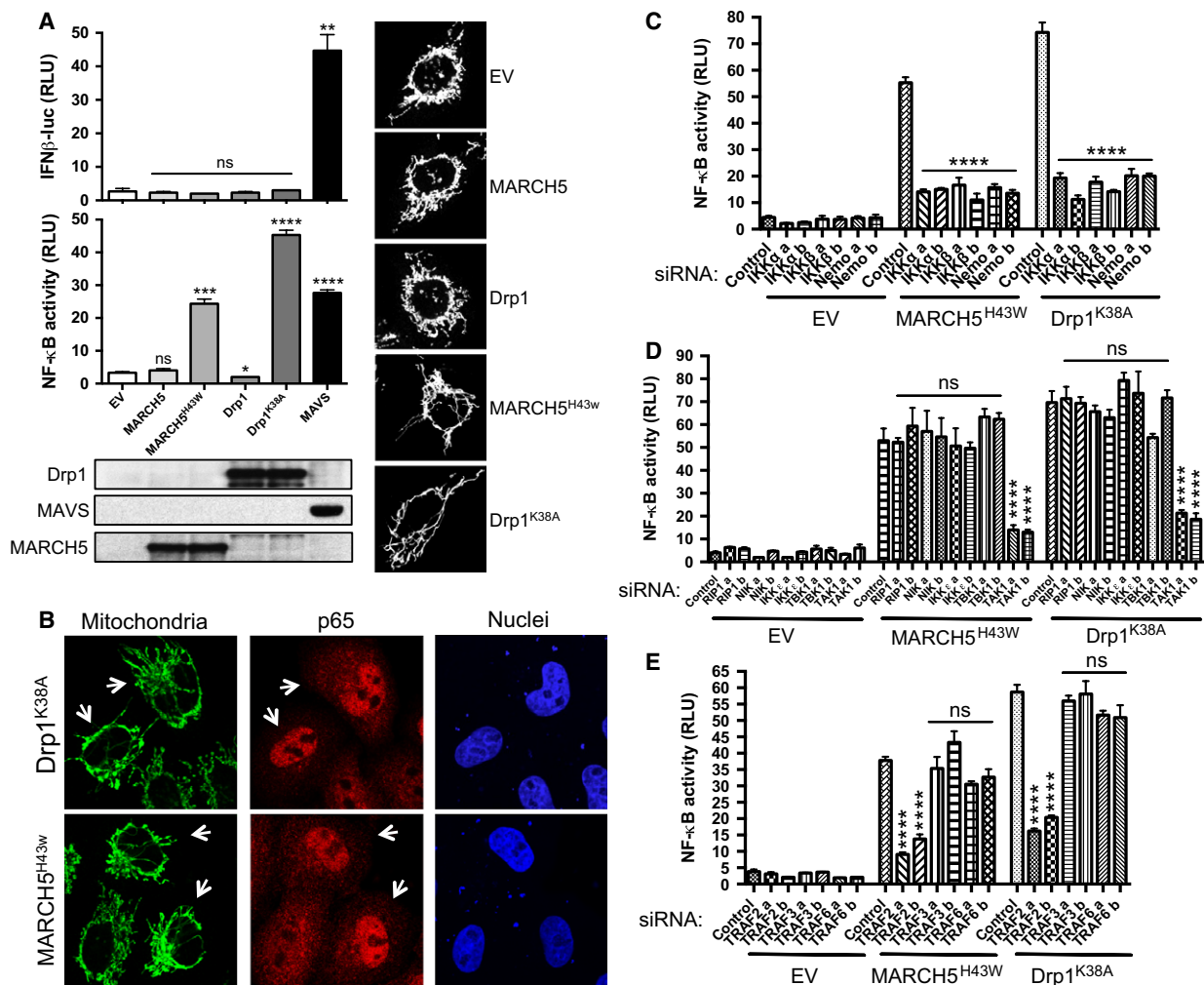


Fig. 1. NF- κ B activation triggered by mitochondrial hyperfusion. (A) HEK 293T cells were transfected with either an IFN β promoter reporter or with an NF- κ B reporter, together with the *Renilla* luciferase gene as an internal control. The cells were also transfected with an empty vector (EV) or with a plasmid encoding MARCH5, MARCH5^{H43W}, Drp1, Drp1^{K38A} or MAVS. Luciferase assays were performed 24 h after transfection and the results were normalized against *Renilla* luciferase activity. The data shown are means \pm SD from three independent experiments (analysis of variance by Student's *t*-tests). ns, not significant; RLU, relative luminescence units. Mitochondrial morphology is shown, together with the levels of the protein encoded by the genes used for transfection. (B) HeLa cells were transfected with a plasmid encoding Drp1^{K38A} or MARCH5^{H43W}. Mitochondrial morphology and the nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit were assessed by immunofluorescence methods, 16 h later. Arrows indicate the transfected cells. (C–E) HEK 293T cells transfected with a control nonspecific siRNA or with the indicated siRNAs, were also transfected 48 h later with an NF- κ B reporter and with an empty vector (EV) or with a plasmid encoding MARCH5^{H43W} or Drp1^{K38A}, to promote mitochondrial hyperfusion. Luciferase assays were performed 24 h after the second transfection and the results were normalized against *Renilla* luciferase activity. The data shown are the means \pm SD from three independent experiments. *****P* < 0.0001 with respect to cells transfected with the control siRNA (ANOVA). ns: not significant.

stimulus-specific ubiquitylated transmitters of NF- κ B signaling serve as a platform for the recruitment and activation of the IKK complex [13,14]. Several E3 ubiquitin ligases are involved in their ubiquitylation. In several pathways leading to NF- κ B activation, TRAF2, TRAF3 or TRAF6 is responsible for catalyzing the polyubiquitylation of the transmitters of NF- κ B signaling [13,14]. In our model, we found that

TRAF2 was mainly required for a proper mitochondrial hyperfusion-induced NF- κ B activation (Fig. 1E).

We recently reported that a relay through metadherin, an endoplasmic reticulum-anchored protein, was required for an optimal NF- κ B activation during innate and adaptive immunity [21]. Interestingly, this endoplasmic reticulum relay also seems to be involved in mitochondrial hyperfusion-induced NF- κ B activation,

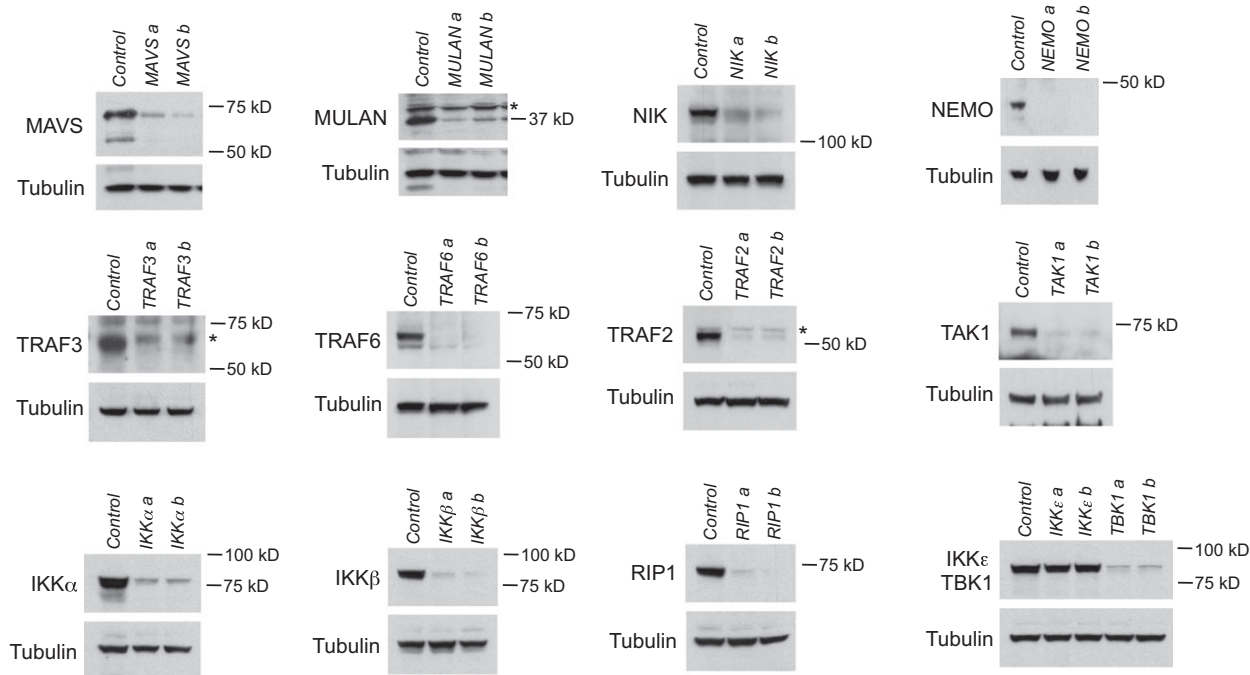


Fig. 2. Efficiency of the used siRNAs. HEK 293T cells were transfected with a control nonspecific siRNA or with the indicated siRNAs. Knockdown of the targeted protein was assessed 72 h later, by immunoblotting cell extracts. Tubulin was used as a loading control.

because metadherin knockdown hampered NF- κ B activation after the transfection of cells with constructs encoding the mutant forms of Drp1 and MARCH5 (data not shown).

Mitochondrial hyperfusion-induced NF- κ B activation is dependent on MULAN

As mentioned above, some E3 ubiquitin ligases are involved in the polyubiquitylation of the transmitters of NF- κ B signaling, transducing the information leading to NF- κ B activation. We therefore hypothesized that mitochondrial dynamics might be linked to NF- κ B via the involvement of a mitochondrial E3 ubiquitin ligase in this process. There are 46 genes encoding for E3 ubiquitin ligases with at least one transmembrane domain in the human genome [22], but only four of these enzymes are localized at the mitochondria in normal conditions: MARCH5, TRIM59, MULAN and RNF144b [23]. We assessed whether knocking down the expression of any of these E3 ligases inhibited NF- κ B activation after the induction of mitochondrial hyperfusion. Only the absence of MULAN decreased NF- κ B activation in response to the expression of Drp1^{K38A} or MARCH5^{H43W} (Fig. 3A and data not shown), suggesting that this E3 ubiquitin ligase is involved in

mitochondrial hyperfusion-induced NF- κ B activation. Interestingly, MULAN (mitochondrial ubiquitin ligase activating NF- κ B, also called MAPL [24]) has been reported to promote NF- κ B activation after transfection [22,25]. MULAN consists of two predicted transmembrane domains and a C-terminal RING finger domain exposed to the cytosol, which is critical for ubiquitin transfer activity [22]. It has been suggested that MULAN regulates mitochondrial dynamics [22], but, in our hands, the loss of MULAN resulted in no obvious changes to the morphology of the mitochondrial network (Fig. 4). The RING domain of MULAN resembles those of c-IAPs [26], and c-IAPs are known to participate in the polyubiquitylation of the transmitter RIP1, to propagate NF- κ B activation following TNFR1 stimulation [27,28]. As previously reported [22,25], MULAN specifically triggered NF- κ B activation (Fig. 3B) and the ability of MULAN to activate this transcription factor was dependent on the catalytic activity of its RING domain, because the MULAN^{C339A} mutant gave significantly lower levels of NF- κ B activation (Fig. 3B). Indeed, based on the available RING finger protein structure [29,30], replacement of the Cys339 residue with an alanine was predicted to prevent Zn²⁺ coordination, thereby impeding the overall function of the RING domain.

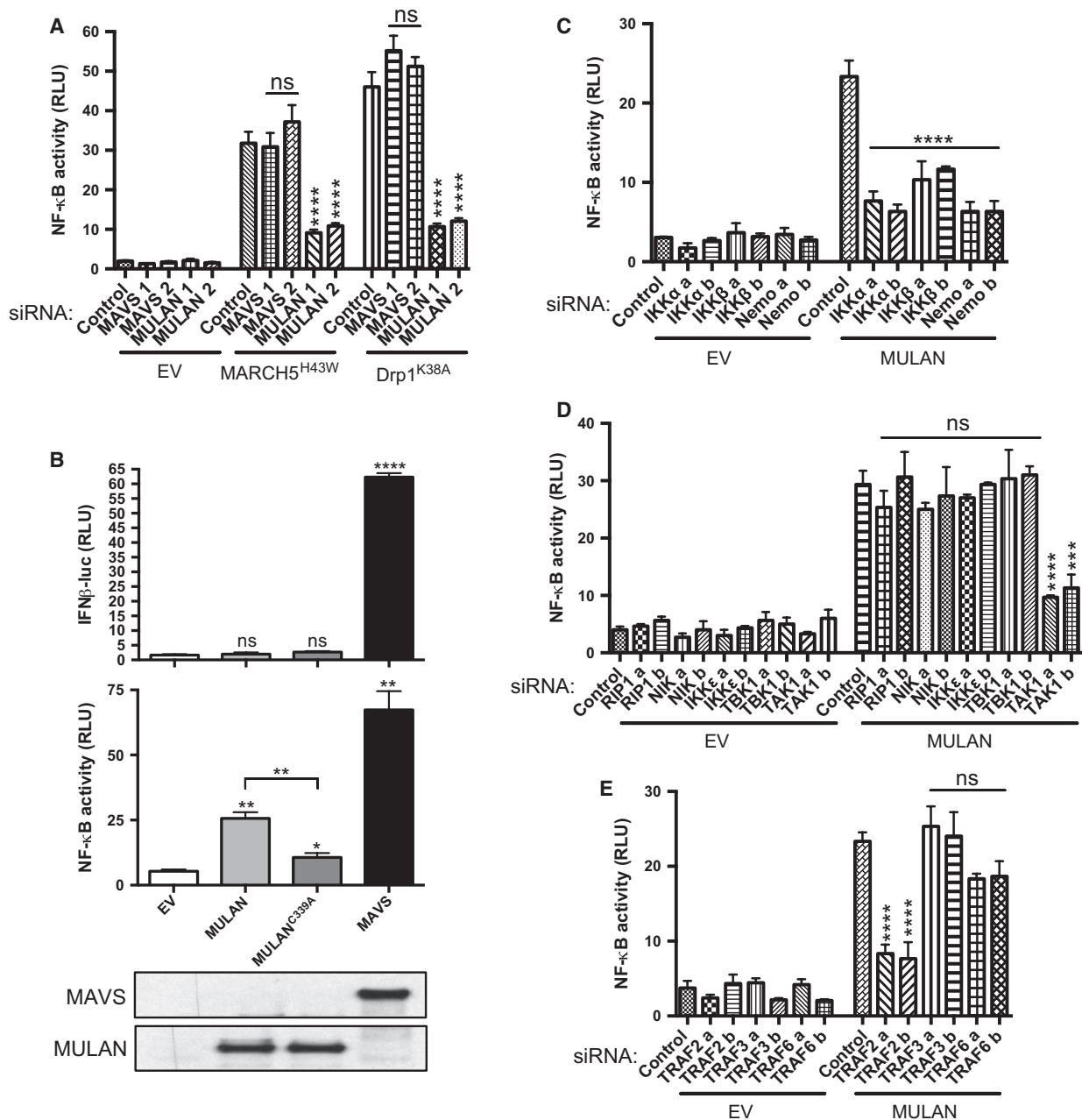


Fig. 3. Involvement of MULAN in mitochondrial hyperfusion-induced NF-κB activation. (A) HEK 293T cells were transfected with a control nonspecific siRNA or with siRNAs against MAVS or MULAN. The cells were then transfected, 48 h later, with a NF-κB reporter and with the *Renilla* luciferase gene as an internal control, and with either an empty vector (EV) or with a plasmid encoding MARCH5^{H43W} or Drp1^{K38A} to promote mitochondrial hyperfusion. Luciferase assays were performed 24 h after transfection and the results were normalized against *Renilla* luciferase activity. The data shown are means ± SD from three independent experiments. RLU, relative luminescence units. *****P* < 0.0001 versus cells transfected with the control siRNA (ANOVA). ns, not significant. (B) HEK 293T cells were transfected with either an IFNβ promoter reporter or with an NF-κB reporter, together with the *Renilla* luciferase gene as an internal control. The cells were also transfected with either an empty vector (EV) or with a plasmid encoding MULAN or MULAN^{C39A}. Luciferase assays were performed 24 h after transfection and the results were normalized against *Renilla* luciferase activity. The data shown are means ± SD from three independent experiments (Student's *t*-test). (C–E) HEK 293T cells transfected with a control nonspecific siRNA or with the indicated siRNAs were also transfected 48 h later with an NF-κB reporter and with an empty vector (EV) or with a plasmid encoding MULAN. Luciferase assays were performed 24 h after the second transfection and the results were normalized against *Renilla* luciferase activity. The data shown are means ± SD from three independent experiments. *****P* < 0.0001, ****P* < 0.001 versus cells transfected with the control siRNA (ANOVA). ns, not significant.

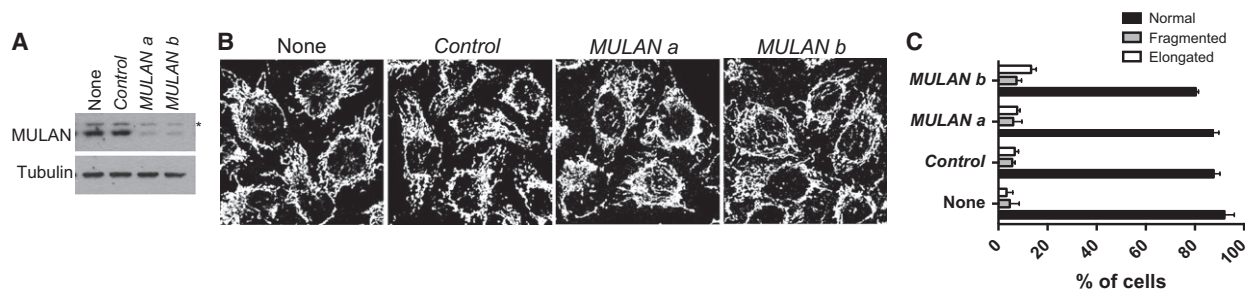


Fig. 4. The knockdown of MULAN does not affect mitochondrial morphology. (A) HeLa cells were transfected with a control nonspecific siRNA or with siRNAs raised against MULAN. MULAN knockdown was assessed 72 h later, by immunoblotting cell extracts. (B, C) mitochondrial morphology was then evaluated on the basis of immunofluorescence.

We explored the signaling involved in the NF- κ B activation triggered by MULAN, by knocking down the expression of genes encoding several proteins of the NF- κ B pathway with specific siRNAs. MULAN appeared to require the E3 ubiquitin ligase TRAF2, TAK1 and IKK to induce NF- κ B activation (Fig. 3C–E), as observed after expression of the Drp1^{K38A} or MARCH5^{H43W} mutant to promote mitochondrial hyperfusion (Fig. 1C–E). Together, our results suggest that enforced mitochondrial hyperfusion triggers NF- κ B activation through the E3 ubiquitin ligases MULAN and TRAF2, and through the canonical pathway involving the TAK1–IKK axis [13].

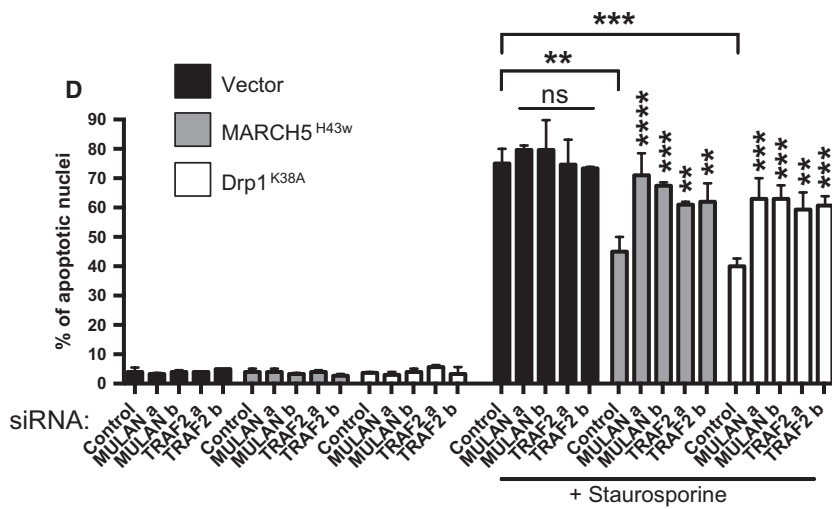
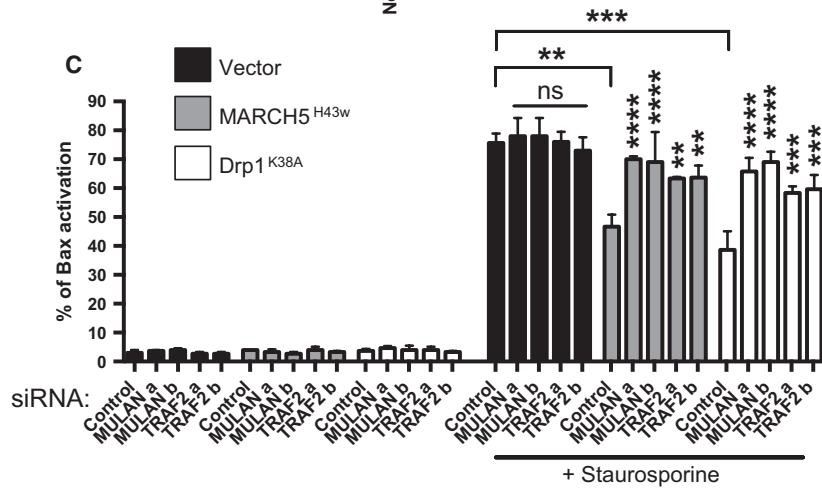
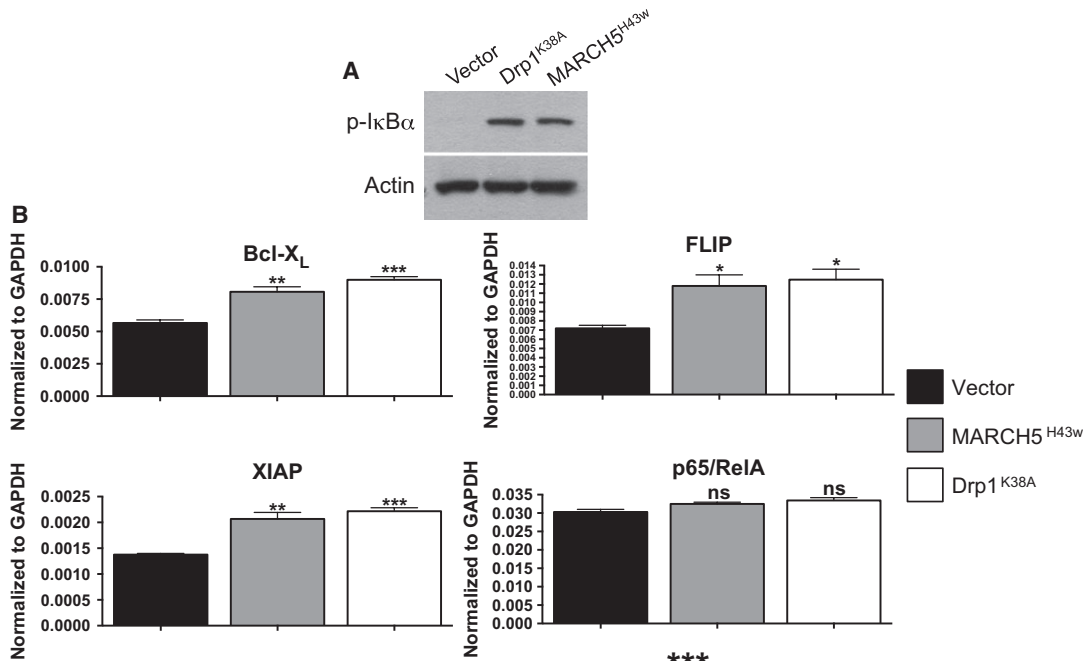
MULAN and TRAF2 are required for the antiapoptotic function of Drp1^{K38A} and MARCH5^{H43W}

The expression of Drp1^{K38A} or MARCH5^{H43W} prevents mitochondrial fission after an apoptotic signal, but it also inhibits cytochrome *c* release and cell death [15,31]. Although it is hotly debated [32], it has been proposed that mitochondrial fission is essential for mitochondrial outer membrane permeabilization and downstream cytochrome *c* release [10,15]. Moreover,

expression of the dominant-negative form of Drp1 has been reported to prevent Bax activation in response to nitric oxide in neurons [33]. Importantly, the expression of Drp1^{K38A} or MARCH5^{H43W} promoted NF- κ B activation (Figs 1 and 5A), and this transcription factor induces the expression of antiapoptotic genes such as those encoding Bcl-X_L, XIAP or FLIP (Fig. 5B) [34]. This suggests that Drp1^{K38A} and MARCH5^{H43W} may prevent apoptosis through NF- κ B activation and the downstream expression of antiapoptotic genes.

We then assessed the antiapoptotic activity of Drp1^{K38A} or MARCH5^{H43W} in control nonspecific, MULAN- or TRAF2-specific siRNA-transfected cells, because the knockdown of MULAN or TRAF2 expression prevents NF- κ B activation after transfection with the mutant constructs (Figs 1E and 3A). In Drp1^{K38A}- or MARCH5^{H43W}-transfected cells, the inhibition of Bax activation and the apoptosis following treatment with staurosporine were significantly impaired when the expression of MULAN or TRAF2 was knocked down (Fig. 5C,D). These observations suggest that the capability of Drp1^{K38A} and MARCH5^{H43W} to prevent apoptosis is linked at least partly to their roles in activating NF- κ B due to the mitochondrial hyperfusion that they induce.

Fig. 5. The knockdown of MULAN or TRAF2 expression prevents the anti-apoptotic effects of Drp1^{K38A} and MARCH5^{H43W}. (A) HeLa cells were transfected with vector encoding YFP or with a plasmid encoding YFP-tagged MARCH5^{H43W} or YFP-tagged Drp1^{K38A} to promote mitochondrial hyperfusion. Twenty-four hours later, NF- κ B activation was assessed with the detection of p-I κ B α by immunoblotting cell extracts. Actin was used as a loading control. (B) HeLa were transfected as in (A). Twenty-four hours later, the expressions of Bcl-X_L, FLIP, XIAP and p65/RelA were assessed by RT-qPCR and normalized to GAPDH. The data shown are means \pm SD from three independent experiments. *** P < 0.001, **0.001 < P < 0.01, *0.01 < P < 0.05 versus cells transfected with the empty vector (Student's *t*-test). ns, not significant. (C) HeLa cells were transfected with a control nonspecific siRNA or with siRNAs against MULAN or TRAF2. The cells were transfected 48 h later, with a vector encoding YFP or with a plasmid encoding YFP-tagged MARCH5^{H43W} or YFP-tagged Drp1^{K38A}. Then, 24 h later, cells were left untreated or were treated with staurosporine (2 μ M) for 8 h in the presence of zVAD-fmk to prevent apoptosis. The percentage of the YFP-positive cells displaying Bax activation was then assessed on the basis of immunofluorescence using a Bax antibody (clone 6A7) that only recognizes the active form of Bax [42]. The data shown are the means \pm SD from three independent experiments, with 300 cells per condition. **** P < 0.0001, *** P < 0.001, **0.001 < P < 0.01 versus cells transfected with the control siRNA (ANOVA). ns, not significant. (D) As in (C) but with the percentage of apoptotic nuclei in the YFP-positive cells determined by Hoechst staining.



NF- κ B activation is associated with stress-induced mitochondrial hyperfusion

It has been reported that mitochondria hyperfuse and form a highly interconnected network in cells exposed to a number of stress stimuli preventing protein synthesis, such as cycloheximide (CHX), actinomycin D (ActD) and UV irradiation (UV-C); this process was named 'stress-induced mitochondrial hyperfusion' (SIMH) [11]. We investigated whether this SIMH was accompanied by NF- κ B activation. UV-C is known to promote NF- κ B activation [35]. We investigated whether treatment with ActD or CHX could promote both SIMH and NF- κ B activation. As initially reported [11], treatment with ActD or CHX induced SIMH, and this mitochondrial hyperfusion was also associated with NF- κ B activation, as indicated by the nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit (Fig. 6A). As previously described [11], morphological changes in the mitochondria were first detected 2–3 h after the induction of stress, and this process became stronger with time, peaking at 6–9 h with the formation of highly interconnected mitochondria (Fig. 6B). The nuclear translocation of p65 occurred concomitantly with mitochondrial hyperfusion (Fig. 6B). Similar results were obtained for cells treated with ActD (data not shown). The occurrence of mitochondrial hyperfusion in the absence of protein synthesis (CHX is a reversible inhibitor of translation, whereas ActD prevents transcription) ruled out the possibility of the highly interconnected mitochondrial network being formed as a consequence of the transcriptional activity of NF- κ B. Finally, the slow degradation of the NF- κ B inhibitor I κ B α after treatment with CHX confirmed that mitochondrial hyperfusion was associated with NF- κ B activation (Fig. 6C).

We then investigated the possible role of SIMH in the observed activation of NF- κ B. For this purpose, we investigated NF- κ B activation in OPA1-deficient cells, comparing the results obtained with those for wild-type cells, because OPA1 has been shown to be required for SIMH [11]. As previously described [11], SIMH did not occur in OPA1 $^{-/-}$ mouse embryonic fibroblasts (MEFs) after treatment with CHX for few hours (Fig. 7A), but nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit was also found to be partially inhibited, as demonstrated by comparison with wild-type MEFs (Fig. 7A,B). Moreover, the slower degradation of I κ B α in OPA1 $^{-/-}$ than in wild-type MEFs confirmed the requirement of SIMH for an optimal NF- κ B activation (Fig. 7C). The lack of OPA1 had no effect on the rapid activation of NF- κ B after tumor necrosis factor (TNF) α treatment (Fig. 8), suggesting

that the molecular machinery responsible for NF- κ B activation was not affected in these cells. Finally, confirming that NF- κ B activation was decreased in SIMH incompetent cells after CHX treatment, the expression of Bcl-X_L, the resistance to staurosporine-induced apoptosis (after a period of recovery to get rid of the inhibitory effect of CHX on the protein synthesis) and the secretion of the NF- κ B target gene TNF α were reduced in the OPA1 $^{-/-}$ MEFs in comparison with wild-type MEFs (Fig. 7D–F).

MULAN is involved in NF- κ B activation during SIMH

Because mitochondrial hyperfusion-induced NF- κ B activation is dependent on MULAN (Fig. 3), we hypothesized that this E3 ubiquitin ligase might be required for the NF- κ B activation detected during SIMH (Fig. 6). The antibody directed against MULAN that we obtained did not cross-react with murine MULAN. We therefore knocked down MULAN levels by transfecting HEK 293T cells with specific siRNAs. We then assessed the impact of MULAN loss on NF- κ B activation following CHX treatment. As in MEFs, CHX treatment in HEK 293T cells promoted a slow activation of NF- κ B, as demonstrated by monitoring the degradation of I κ B α (Fig. 9A). This degradation was delayed in MULAN siRNA-transfected cells (Fig. 9B). The impact of MULAN silencing on NF- κ B activation was also assessed by investigating the nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit. MULAN siRNA-transfected cells displayed lower levels of nuclear translocation for p65 than control cells (Fig. 9C–E). SIMH took place after CHX treatment in cells displaying MULAN knockdown, whereas NF- κ B activation was impaired (Fig. 9C,D), suggesting that MULAN plays a role downstream from SIMH in NF- κ B activation. Finally, to confirm a role of MULAN in NF- κ B activation during SIMH, we observed that the expression of Bcl-X_L, the resistance to staurosporine-induced apoptosis and the secretion of TNF α were diminished in MULAN siRNA-transfected cells after CHX treatment (Fig. 9F–H).

Because TRAF2 was found to be required for the activation of NF- κ B by MULAN (Fig. 3E), we hypothesized that these two E3 ubiquitin ligases are part of the same complex, promoting NF- κ B activation, during SIMH. We then immunoprecipitated TRAF2 and demonstrated a time-dependent recruitment of MULAN after the induction of SIMH (Fig. 10A) suggesting that these two proteins integrate the same complex after SIMH induction. When OPA1 expression was knocked down to suppress SIMH, the

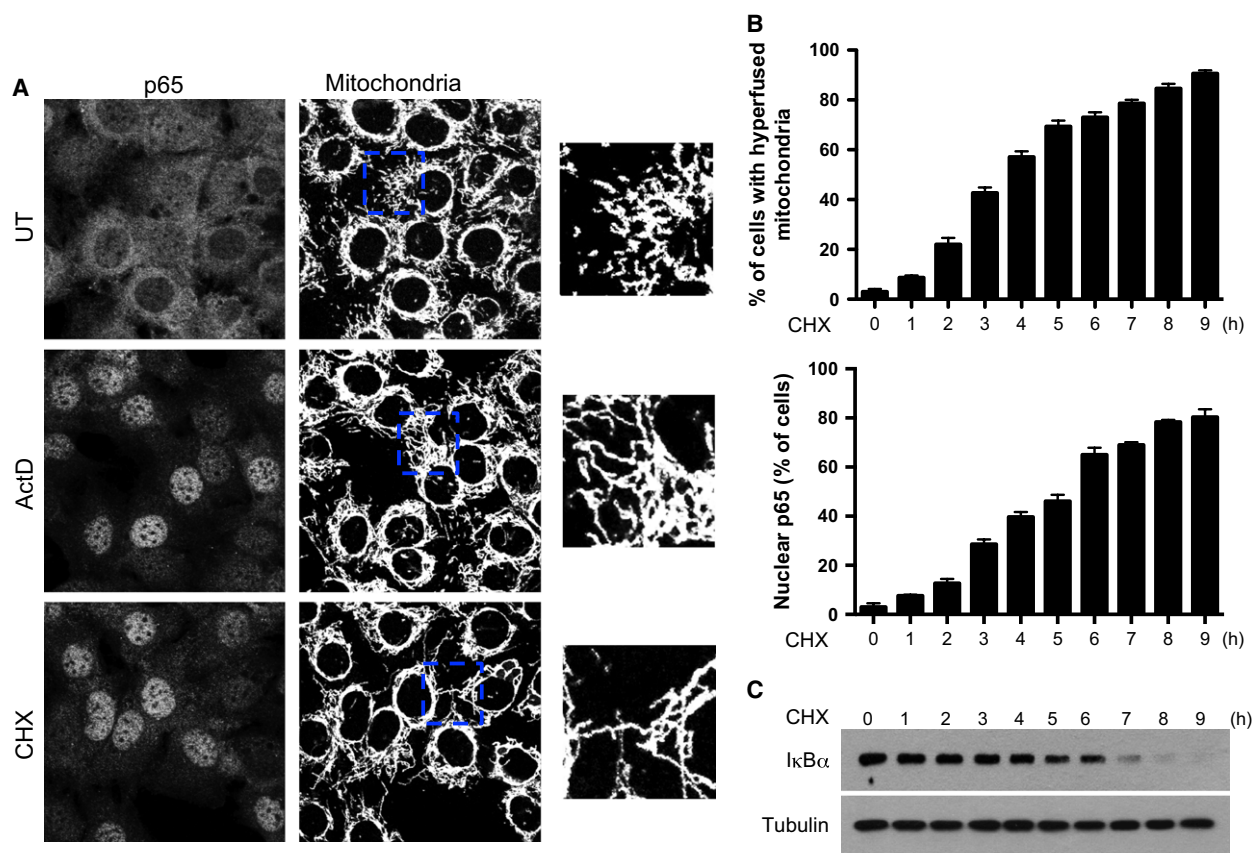


Fig. 6. Stress-induced mitochondrial hyperfusion is accompanied by an activation of NF- κ B. (A) Wild-type MEFs were either left untreated (UT) or were exposed to $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ actinomycin D (ActD) or $10 \mu\text{M}$ cycloheximide (CHX) for 9 h. The nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit and mitochondrial morphology [mitochondria stained with anti-(cytochrome *c*)] were assessed by immunofluorescence. Representative images are shown, with the boxed areas enlarged on the right. (B) Quantification, over time, of MEFs exposed to $10 \mu\text{M}$ CHX and with very long, connected, tubular (hyperfused) mitochondria (upper histogram) or with nuclear p65 (lower histogram). (C) Wild-type MEFs were exposed to $10 \mu\text{M}$ CHX. Cell extracts were then analyzed by immunoblotting, to assess the degradation of I κ B α at various time points. Tubulin was used as a loading control.

association between TRAF2 and MULAN was impaired (Fig. 10B), indicating a requirement for mitochondrial network fusion for the formation of a TRAF2-MULAN complex to ensure NF- κ B activation. Finally, the level of ubiquitylation of TRAF2 was investigated during SIMH, in the presence and the absence of MULAN. In cells transfected with MULAN siRNA, TRAF2 was significantly less ubiquitylated than in control cells after the induction of SIMH, suggesting a role for MULAN in the polyubiquitylation of TRAF2 in this pathway (Fig. 10C).

Discussion

The activation of pro-apoptotic Bcl-2 members, such as Bax or Bak, in response to strong stress signals promotes mitochondrial outer membrane permeabilization. This leads to the release into the cytosol of

mitochondrial apoptogenic factors, such as cytochrome *c*, which triggers caspase activation, leading to apoptosis [36]. By contrast, following moderate stress responses of various types, leading to protein synthesis inhibition, cells undergo SIMH and become more resistant to apoptosis [11]. It has been suggested that the increase in mitochondrial ATP production that accompanies SIMH constitutes an adaptive prosurvival response to stress [11], but our findings suggest that SIMH also stimulates an antiapoptotic pathway involving NF- κ B activation, because this transcription factor induces the expression of antiapoptotic genes, such as those encoding Bcl-X_L, XIAP or FLIP [34]. Indeed, we found that SIMH was associated with NF- κ B activation, and that mitochondrial dynamics and NF- κ B were linked via the mitochondrial E3 ubiquitin ligase MULAN, for which a knockdown of expression was shown to inhibit SIMH-induced NF- κ B activation.

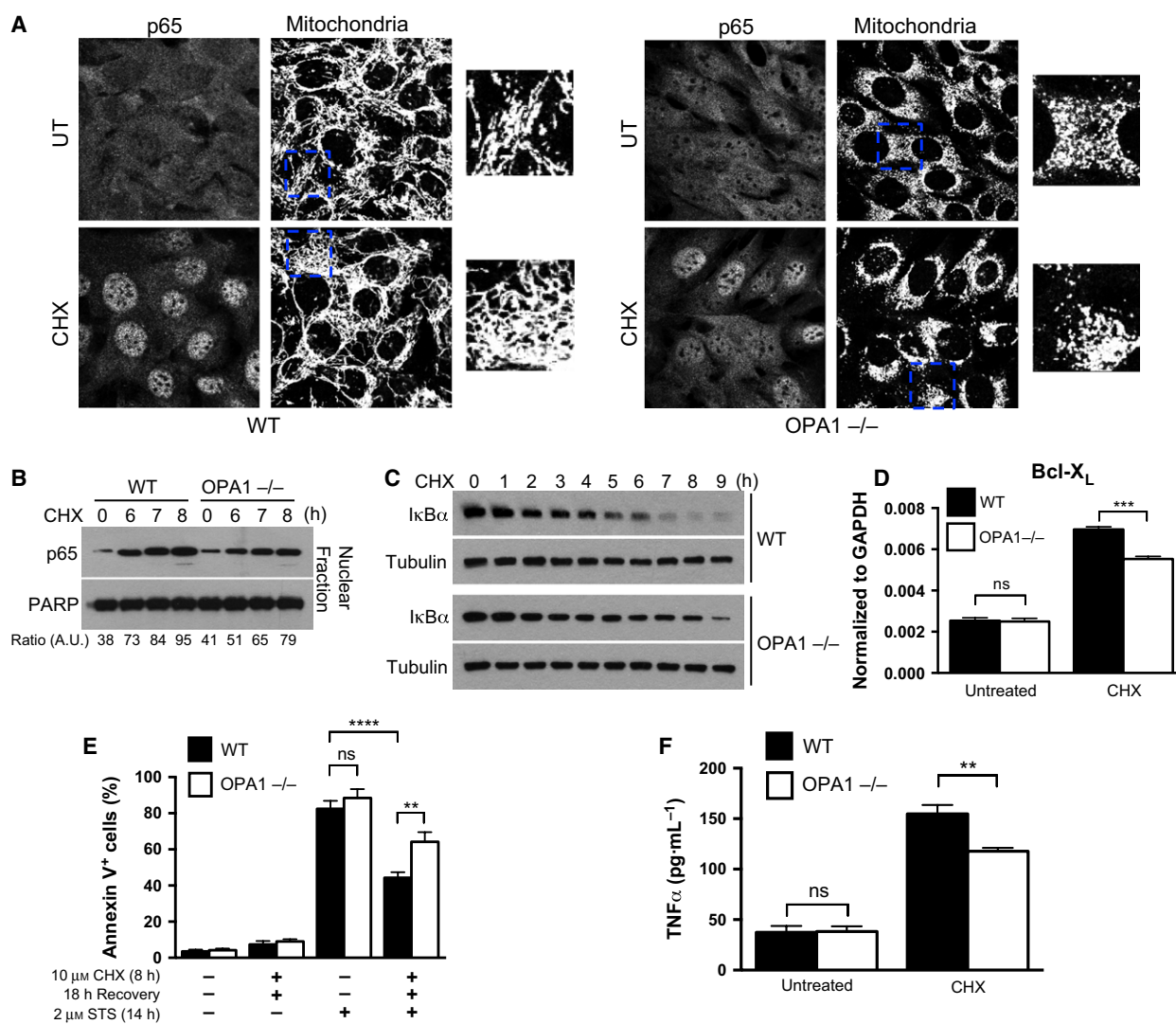


Fig. 7. The inhibition of SIMH impairs NF- κ B activation. (A) WT or OPA1^{-/-} MEFs were either left untreated (UT) or were exposed to 10 μ M CHX for 9 h. Nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit and mitochondrial morphology were assessed by immunofluorescence. Representative images are shown, with the boxed areas enlarged on the right. (B) WT or OPA1^{-/-} MEFs were either left untreated or exposed to 10 μ M CHX for 6, 7 or 8 h. Nuclear extracts were then analyzed by immunoblotting, to evaluate nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit. The nuclear protein PARP served as a loading control. The pixel intensity of each band was quantified using IMAGEJ software and the ratio p65/PARP was calculated and represented in arbitrary units (AU). (C) WT or OPA1^{-/-} MEFs were exposed to 10 μ M CHX. The degradation of I κ B α was then assessed in cell extracts, by immunoblotting at different time points. Tubulin was used as a loading control. (D) WT or OPA1^{-/-} MEFs were either left untreated or exposed to 10 μ M CHX for 9 h. Bcl-X_L expression was then measured by RT-qPCR and normalized to GAPDH. The data shown are means \pm SD from three independent experiments. *** P < 0.001 versus the WT cells (Student's t -test). ns, not significant. (E) WT or OPA1^{-/-} MEFs were either left untreated or exposed to 10 μ M CHX for 8 h. The cells were then washed with NaCl/P_i and incubated in fresh medium for a 18 h period of recovery. Next, cells were treated with 2 μ M staurosporine (STS) for 14 h. In all cases, the cells were harvested and stained with annexin V FITC for flow cytometric analysis. The data shown are means \pm SD from three independent experiments. **** P < 0.0001, **0.001 < P < 0.01 versus WT cells (Student's t -test). ns, not significant. (F) WT or OPA1^{-/-} MEFs were either left untreated or exposed to 10 μ M CHX for 9 h. The cells were then washed with NaCl/P_i and incubated in new medium. The secretion of TNF α was measured by ELISA 18 h later. The data shown are means \pm SD from three independent experiments. **0.001 < P < 0.01 versus WT cells (Student's t -test). ns, not significant.

Nevertheless, although we have determined that NF- κ B activation is linked to SIMH, the overall NF- κ B activation as a consequence of stress stimuli preventing

protein synthesis is likely not only dependent of the SIMH. For instance, UV treatment has been reported to promote SIMH [11] and NF- κ B activation in part

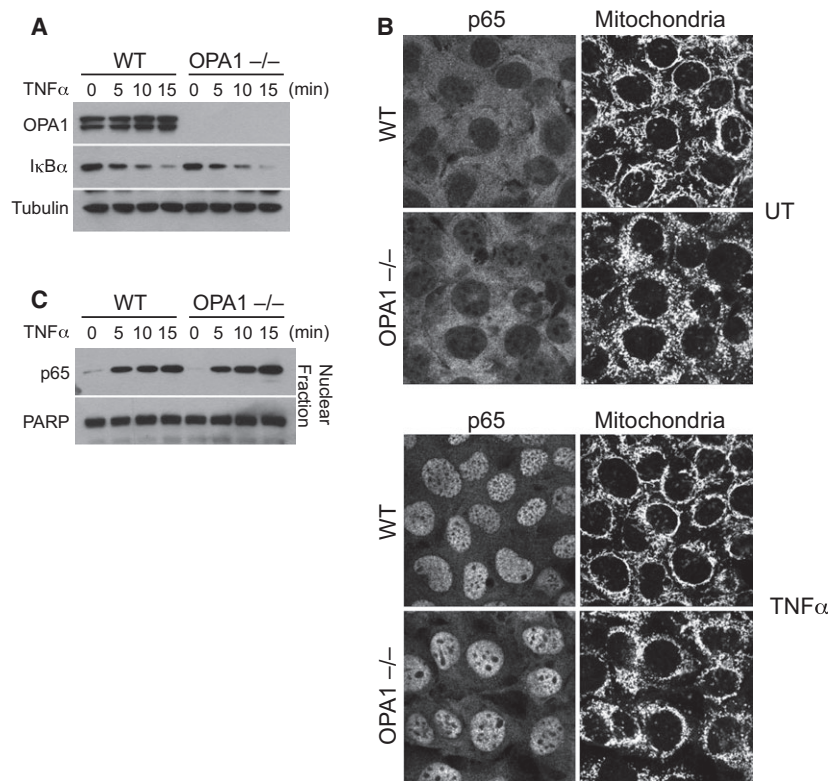


Fig. 8. The loss of OPA1 does not affect NF- κ B activation upon TNFR stimulation. (A) WT and OPA1^{-/-} MEFs were treated with TNF α (10 ng·mL⁻¹) for 0, 5, 10 or 15 min. The cell extracts were analyzed by immunoblotting, as indicated. (B) WT or OPA1^{-/-} MEFs were treated with TNF α (10 ng·mL⁻¹) for 0 or 15 min. Nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit and mitochondrial morphology were then assessed by immunofluorescence. (C) WT or OPA1^{-/-} MEFs were either left untreated or exposed to TNF α (10 ng·mL⁻¹) for 0, 5, 10 or 15 min. Nuclear extracts were then analyzed by immunoblotting, to evaluate nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit. The nuclear protein PARP served as a loading control.

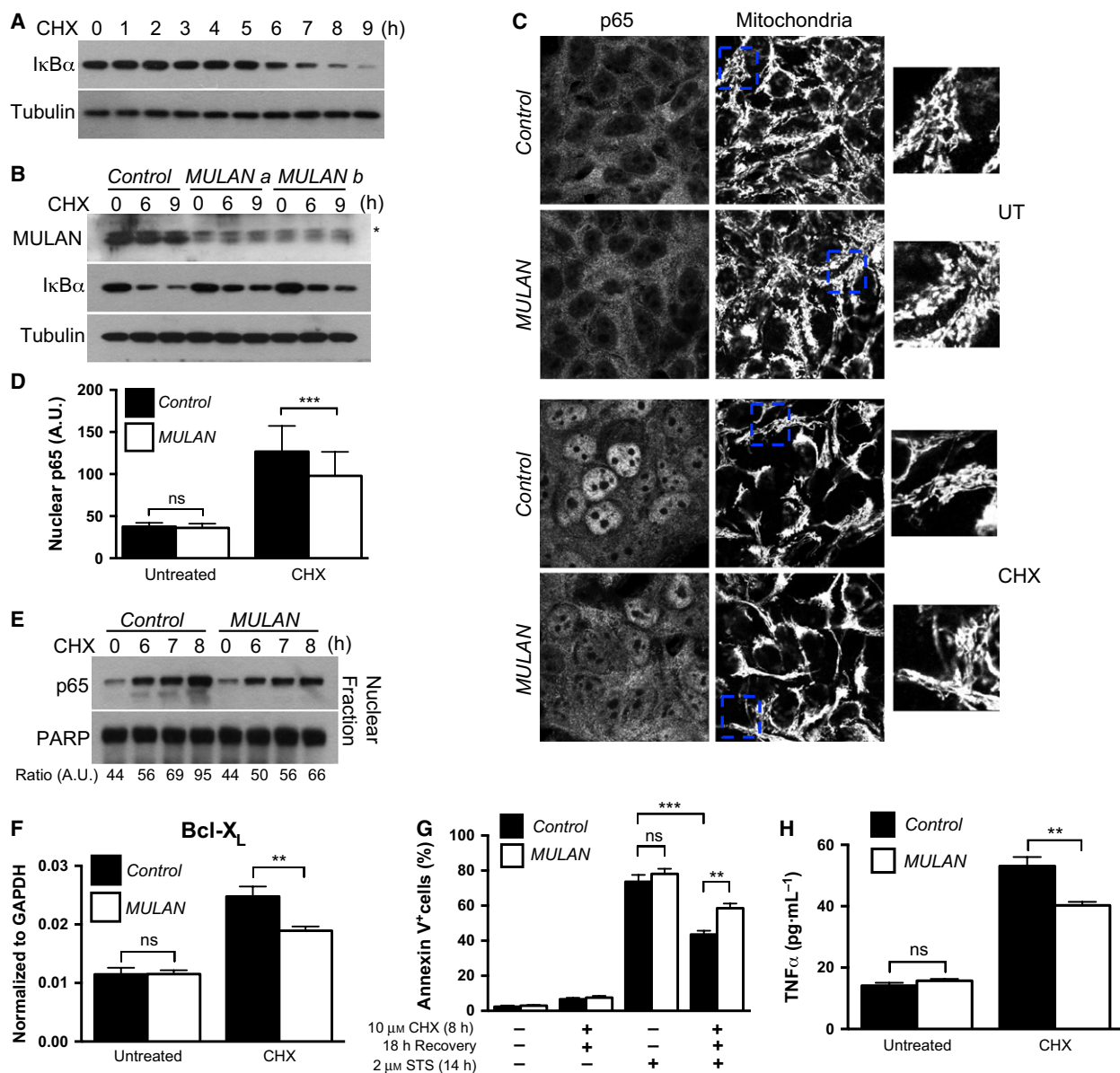
through MULAN (our unpublished data), but DNA damage is also well known to promote NF- κ B activation through ATM and a post-translational modification of NEMO [37]. Similarly, ActD or CHX treatment that triggers SIMH probably also promotes NF- κ B activation independently of the mitochondrial dynamics and MULAN, explaining therefore the fact that, in OPA1^{-/-} cells or after MULAN knockdown, the modulation in NF- κ B activation is modest.

MULAN is anchored in the mitochondrial outer membrane [22,26] and has been reported to promote NF- κ B activation when overexpressed [22,25]. We show here that the ability of this protein to promote NF- κ B activation is dependent on its RING domain. Because the RING domain of MULAN resembles those of IAPs [26] and c-IAPs are important effectors of NF- κ B activation through the promotion of polyubiquitylation for the transmitters of the NF- κ B pathway [27,28], MULAN probably regulates the activation of this transcription factor in a similar way. Following TNFR1 activation, c-IAPs and TRAF2/5 induce the polyubiquitylation of RIP1, and the ubiquitin chains linked to RIP1 play a key role in IKK activation by the kinase TAK1 [13,14]. In our hands, MULAN required TRAF2 to activate NF- κ B in a TAK1- and IKK-dependent manner. However, whereas TRAF2 co-immunoprecipitated with MU-

LAN during SIMH, it remains unclear whether MULAN binds directly to TRAF2 or whether MULAN and TRAF2 form a complex with a transmitter of the NF- κ B pathway, as for the RIP1/c-IAPs/TRAF2 complex, following TNFR1 stimulation [13,14].

SIMH and the ensuing activation of NF- κ B result from stress signals inhibiting protein synthesis (UV-C, CHX, ActD, etc.). The transcriptional activity of NF- κ B is thus impaired in these conditions. Nevertheless, cells exposed to this stress signal for prolonged periods eventually die by apoptosis (indeed, UV-C, CHX and ActD are known to be good inducers of apoptosis). This implies that the prosurvival effect of SIMH, due to increases in ATP production [11] or NF- κ B activation (this study), is effective only for brief periods of stress. More prolonged periods of exposure to stress instead result in apoptosis. Finally, one interesting question that remains unanswered concerns the way in which the inhibition of protein synthesis is 'sensed' within the mitochondria to promote SIMH.

Based on our results, we propose the following working model (Fig. 10D). After a moderate stress leading to protein synthesis inhibition (UV, CHX, ActD, etc.), SIMH takes place, promoting MULAN activation. The resulting hyperfusion of the mitochondrial network involves OPA1 and the mitochondrial inner membrane protein SLP-2, a member of the



SPFH family (prohibitin/stomatins/flotillin/Hflk) of putative scaffolding proteins, as previously reported [11]. It remains unclear how SIMH activates MULAN, and this aspect merits further exploration. MULAN then triggers the polyubiquitylation of a transmitter of the NF- κ B pathway. The TAK1/TABs and IKK complexes are recruited to the polyubiquitin chains. TAK1 phosphorylates IKK β , which in turn, promotes NF- κ B activation by inducing the phosphorylation and proteasome degradation of I κ B α . Free NF- κ B dimers then migrate into the nucleus to exert their transcriptional effects. The ubiquitylated transmitter of this NF- κ B signaling pathway may be TRAF2, which we found to interact with MULAN and to be less ubiquitylated in

the absence of MULAN during SIMH. TRAF2 functions as a polyubiquitylated transmitter of the NF- κ B pathway in B cells, following engagement of the TNFR family member CD40 [38], providing support for the idea that TRAF2 may act as a polyubiquitylated transmitter during SIMH.

It was recently shown that, during autophagy, mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability [39]. The reported mitochondrial elongation during autophagy seems to be similar to the mitochondrial hyperfusion observed when protein synthesis is blocked, suggesting that MULAN may be activated during autophagy. Interestingly, there seems to be a link between the NF- κ B signaling pathway and

Fig. 9. Involvement of MULAN in NF- κ B activation during SIMH. (A) HEK 293T cells were exposed to 10 μ M CHX. The degradation of I κ B α was then assessed in cell extracts by immunoblotting at different time points. Tubulin was used as a loading control. (B) HEK 293T cells were transfected with a control nonspecific siRNA or with siRNAs raised against MULAN. Then, 72 h later, the cells were either left untreated or treated with 10 μ M CHX for 6 or 9 h. Cell extracts were then analyzed by immunoblotting, as indicated. Tubulin was used as a loading control. * indicates a probable nonspecific band. (C) HEK 293T cells were transfected with a control non specific siRNA or with a siRNA against MULAN. Then, 72 h later, the cells were either left untreated (UT) or exposed to 10 μ M CHX for 9 h. Mitochondrial morphology and nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit were assessed by immunofluorescence. Representative images are shown, with the boxed areas enlarged on the right. The pixel intensity of the nuclear signal of p65 in 50 cells in each condition was quantified using IMAGEJ software in (D). *** $P < 0.001$, versus cells transfected with the control siRNA. ns, not significant; AU, arbitrary unit. (E) HEK 293T cells were transfected for 72 h with a control non specific siRNA or with a siRNA against MULAN. Nuclear extracts were then analyzed by immunoblotting, to evaluate nuclear translocation of the p65 NF- κ B subunit after exposure to 10 μ M CHX for 6, 7 and 8 h. The nuclear protein PARP served as a loading control. The pixel intensity of each band was quantified using IMAGEJ software and the ratio p65/PARP was calculated and represented in arbitrary units (AU). (F) HEK 293T cells were transfected with a control non specific siRNA or with a siRNA against MULAN. Seventy-two hour later, the cells were either left untreated or exposed to 10 μ M CHX for 9 h. Bcl-X_L expression was then measured by RT-qPCR and normalized to GAPDH. The data shown are means \pm SD from three independent experiments. ** $0.001 < P < 0.01$ versus cells transfected with the control siRNA (Student's *t*-test). ns, not significant. (G) HEK 293T cells were transfected with a control non specific siRNA or with a siRNA against MULAN. Then, 72 h later, the cells were either left untreated or exposed to 10 μ M CHX for 8 h. Then the cells were washed with NaCl/P_i and incubated in fresh medium for a 18 h period of recovery. Next, cells were treated with 2 μ M staurosporine (STS) for 14 h. In all cases, the cells were harvested and stained with annexin V FITC for flow-cytometric analysis. The data shown are means \pm SD from three independent experiments. *** $P < 0.001$, ** $0.001 < P < 0.01$ versus cells transfected with the control siRNA (Student's *t*-test). ns, not significant. (H) HEK 293T cells were transfected with a control non specific siRNA or with a siRNA against MULAN. Then, 72 h later, the cells were either left untreated or exposed to 10 μ M CHX for 9 h. The cells were then washed with NaCl/P_i and incubated in new medium. The secretion of TNF α was measured by ELISA 18 h later. The data shown are means \pm SD from three independent experiments. ** $0.001 < P < 0.01$ versus cells transfected with the control siRNA (Student's *t*-test). ns, not significant.

the induction of autophagy, because constitutively active IKK subunits have been shown to stimulate autophagy and to transduce multiple signals operating in starvation-induced autophagy, including the phosphorylation of AMPK and JNK [40]. The involvement of MULAN in autophagy, through its capability to activate NF- κ B, should thus be explored further.

In conclusion, our results shed light on a new function of mitochondria in the activation of the transcription factor NF- κ B, as a result of SIMH, via the E3 ubiquitin ligase MULAN. Our findings demonstrate that, over and above their role in bioenergetics and cell death, mitochondria are also organelles responsible for the sensing of stress signals and their conversion into biological responses.

Experimental procedures

Cell culture and reagents

MEFs and HEK 293T cells were cultured in standard conditions. HEK 293T cells were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). OPA1^{-/-} and the corresponding wild-type MEFs [41] were provided by D.C. Chan (Division of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, CA, USA). CHX, ActD and staurosporine were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Protein extraction and immunoblot analysis

Cells were lysed in lysis buffer (20 mM Tris/HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 2 mM sodium pyrophosphate, 10% glycerol, 25 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate) supplemented with Complete protease inhibitor mixture (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France). After incubation on ice for 10 min, a soluble extract was obtained by centrifugation at 11 000 *g* for 10 min at 4 °C. The lysate (20 μ g) was boiled in SDS sample buffer and resolved by SDS/PAGE. Immunoblot analysis was performed with specific antibodies and the antigen-antibody complexes were visualized by chemiluminescence (Immobilon Western, Merck Millipore, Billerica, MA, USA).

Subcellular fractionation

For immunoblot analysis of the nuclear translocation of p65, 5–10 $\times 10^6$ cells were washed with 1 \times NaCl/P_i and incubated for 5 min at 4 °C in 200 μ L buffer A (10 mM Hepes pH 7.4, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF and Complete protease inhibitor cocktail). Plasma membranes were solubilized by incubation with 12.5 μ L of 10% Igepal (Sigma) for 5 min at 4 °C. Nuclei were collected by centrifugation at 600 *g* and washed twice with buffer A. Nuclear proteins were then extracted by incubation with 30 μ L buffer B (20 mM Hepes pH 7.4, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM

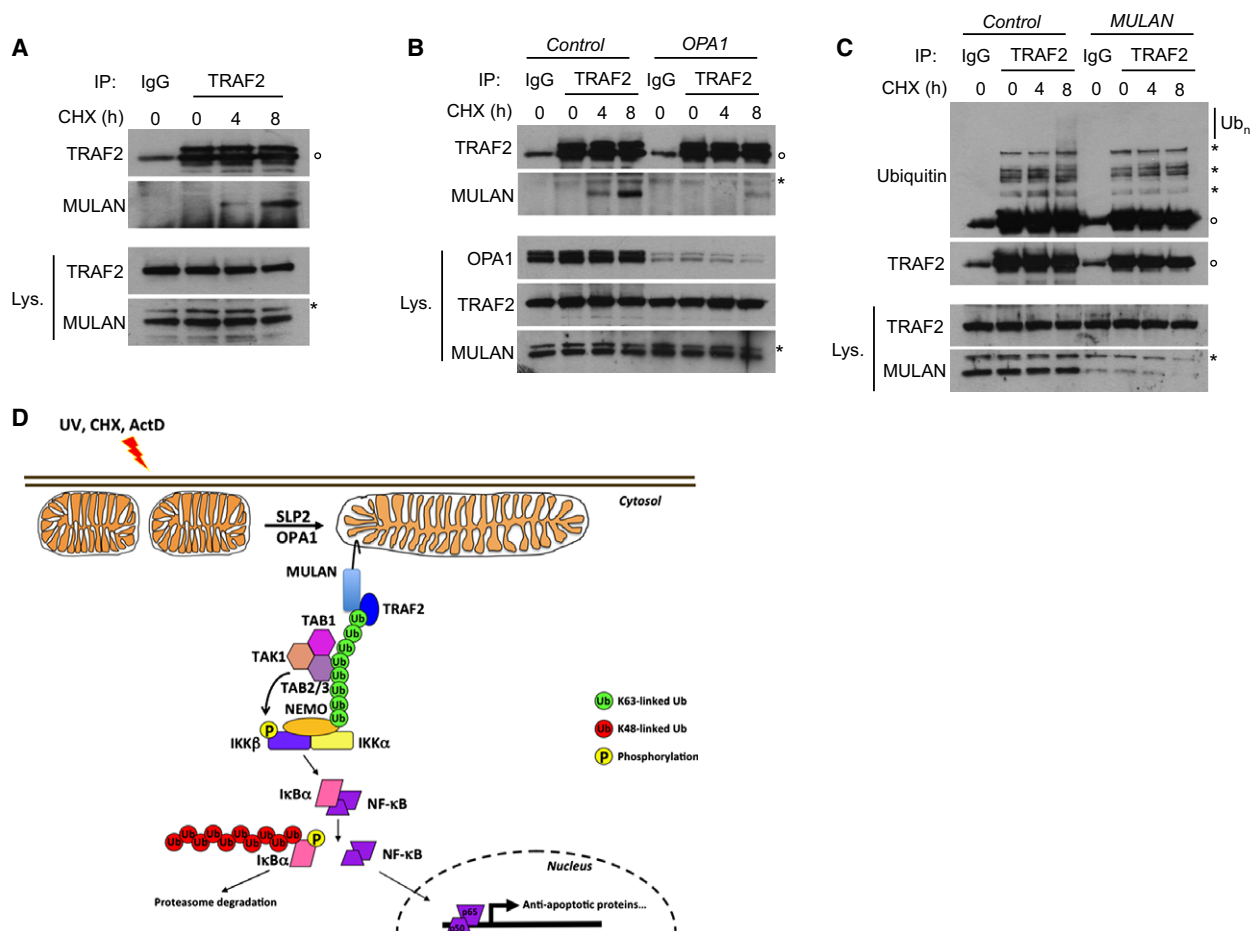


Fig. 10. MULAN and TRAF2 integrate the same complex during SIMH. (A) HEK 293T cells were either left untreated or exposed to 10 μ M CHX for 4 or 8 h. Cell lysates (Lys) were subjected to immunoprecipitation (IP) with an antibody raised against TRAF2 or with a control IgG. Samples were then analyzed by immunoblotting with antibodies against the indicated proteins. \circ IgG heavy chains. * probable non specific band. (B) HEK 293T cells were transfected for 72 h with a control non specific siRNA or with a siRNA against OPA1. Cells were then treated as in (A). \circ IgG heavy chains. * probable non specific band. C, HEK 293T cells were transfected for 72 h with a control non specific siRNA or with a siRNA against MULAN, then treated and analyzed as in (A). \circ IgG heavy chains. * probable non specific band. Ub_n, polyubiquitylation; D, working model, see discussion for description.

NaF, and Complete protease inhibitor cocktail), with shaking. Nuclear extracts were cleared by centrifugation at 13 000 *g* and analyzed by immunoblotting.

Antibodies

The primary antibodies used for immunoblotting were as follows: mouse monoclonal anti-(Drp1/Dlp1) (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA, clone 8; 1 : 4000 dilution), mouse monoclonal anti-(Cardif/MAVS) (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA, clone Adri-1; 1 : 5000), rabbit polyclonal anti-(MULAN/MAPL) (kindly provided by Dr H.M. McBride, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Canada; 1 : 5000), rabbit polyclonal anti-MARCH5 (kindly provided by Dr R.J. Youle, NIH/

NINDS, Bethesda, MD, USA; 1 : 2000), mouse monoclonal anti-tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, clone 10D8; 1 : 5000), rabbit polyclonal anti-I κ B α (Cell Signaling Technology, Danvers, USA; 1 : 5000), rabbit polyclonal anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology, C-20; 1 : 5000), mouse monoclonal anti-PARP (BD Biosciences, clone C2-10; 1 : 4000), mouse monoclonal anti-TRAF2 (Santa Cruz Biotechnology, clone F-2; 1 : 5000), mouse monoclonal anti-OPA1 (BD Biosciences, clone 18; 1 : 5000), mouse monoclonal anti-ubiquitin (Santa Cruz Biotechnology, clone P4D1; 1 : 1000), rabbit polyclonal anti-NIK (Santa Cruz Biotechnology, H-248; 1 : 1000), mouse monoclonal anti-(IKK γ /NEMO) (BD Biosciences, clone C73-764; 1 : 2000), rabbit polyclonal anti-TRAF3 (Santa Cruz Biotechnology, H-122; 1 : 1000),

mouse monoclonal anti-TRAF6 (Santa Cruz Biotechnology, clone D-10; 1 : 5000), rabbit polyclonal anti-TAK1 (Cell Signaling Technology; 1 : 2000), mouse monoclonal anti-IKK α (BD Biosciences, clone B78-1; 1 : 2000), mouse monoclonal anti-IKK β (BD Biosciences, clone F18-1875; 1 : 2000), mouse monoclonal anti-RIP1 (BD Biosciences, clone 38/RIP; 1 : 4000). The antibody used for the immunoprecipitation of endogenous TRAF2 was a mouse monoclonal anti-TRAF2 Ig (Santa Cruz Biotechnology, clone F-2). The primary antibodies used for immunofluorescence microscopy were rabbit polyclonal anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology, C-20; 1 : 500), mouse monoclonal anti-cytochrome *c* (BD Biosciences, clone 6H2.B4; 1 : 800) and mouse monoclonal anti-Bax (clone 6A7; 1 : 200; Sigma-Aldrich).

Transfections and plasmids

HEK 293T and HeLa cells were transfected using Fugene 6 (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The various plasmids used, encoding Drp1, Drp1^{K38A}, MARCH5, MARCH5^{H43W}, MULAN or MULAN^{C339A}, were kindly provided by R.J. Youle.

Luciferase assays

Cells were plated in 24-well plates. On the second day, cells were cotransfected with 200 ng of the plasmid of interest and 50 ng of a construct encoding firefly luciferase under the control of the IFN β promoter or driven by three copies of an NF- κ B enhancer, and 10 ng of the *Renilla* luciferase pRL-TK plasmid (Promega). Transfected cells were collected and luciferase activity was assessed in the Dual-luciferase reporter assay (Promega), on a Fluorostar Optima machine (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Each experiment was carried out in triplicate. For each sample, the number of firefly luciferase luminescence units was divided by the number of *Renilla* luciferase luminescence units to obtain the number of relative luminescence units (RLU).

Immunoprecipitation

Cell lysates were prepared in lysis buffer C (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5% glycerol, 1% Triton X-100, and 1% Nonidet P-40) supplemented with Complete protease inhibitor cocktail and incubated on ice for 20 min. Soluble proteins were subjected to immunoprecipitation with an anti-TRAF2 (2 μ g·mL⁻¹), or mouse anti-IgG serum as a control. An aliquot of the total lysate was included as a control. After incubation for 1 h, 20 μ L of equilibrated protein G-agarose beads (Roche Molecular Biochemicals) were added. The mixture was incubated for 1 h to allow immunoprecipitation to occur. The beads were then washed three times with buffer C. Immune complexes were resolved by SDS/PAGE and immunoblotted.

Immunofluorescence microscopy

Cells grown in LabTek (Fisher Scientific, Illkirch, France) chambers were fixed by incubation for 10 min in 4% paraformaldehyde, and then permeabilized by incubation with 0.15% Triton X-100 in NaCl/P_i for 15 min. The cells were then incubated for 1 h in blocking buffer (2% BSA in NaCl/P_i) and then with the primary antibodies. The cells were washed three times, for 10 min each, in NaCl/P_i, then incubated for 1 h with Alexa Fluor secondary antibodies. Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Images were acquired with a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a \times 63 oil immersion fluorescence objective.

Small interfering RNA (siRNA)

For the downregulation of proteins, we transfected HEK 293T cells for 72 h, with siRNA oligomers at a final concentration of 20 nM, by the calcium phosphate precipitation method. HeLa cells were transfected with siRNAs (20 nM) using oligofectamine (Life Technologies). We purchased the specific siRNAs and the control nonspecific siRNA from Sigma Aldrich. The references of the siRNA oligomers used are as follows: MULAN a (SASI_Hs01_00083230), MULAN b (SASI_Hs01_00083231), MAVS a (SASI_Hs01_00128708), MAVS b (SASI_Hs01_00128711), NIK a (SASI_Hs01_00141408), NIK b (SASI_Hs01_00141410), IKK γ /NEMO a (SASI_Hs02_00321554), IKK γ /NEMO b (SASI_Hs02_00321555), IKK α a (SASI_Hs01_00206922), IKK α b (SASI_Hs01_00206923), IKK β a (SASI_Hs01_00156170), IKK β b (SASI_Hs01_00156172), TRAF2 a (SASI_Hs01_00095954), TRAF2 b (SASI_Hs01_00095956), TRAF3 a (SASI_Hs02_00335396), TRAF3 b (SASI_Hs02_00335397), TRAF6 a (SASI_Hs01_00116390), TRAF6 b (SASI_Hs01_00116391), RIP1 a (SASI_Hs01_00071803), RIP1 b (SASI_Hs01_00071805), TAK1 a (SASI_Hs01_00234777), TAK1 b (SASI_Hs01_00234778), IKK ϵ a (SASI_Hs01_00107520), IKK ϵ b (SASI_Hs01_00107521), TBK1 a (SASI_Hs01_00062066), TBK1 b (SASI_Hs01_00062067) and OPA1 (SASI_Hs01_00152069).

Real-time quantitative PCR

RNA was extracted from cells using RLT lysis buffer and purified using a QIAGEN RNeasy Mini kit according to the manufacturer's protocol. RNA quality was checked by measuring the ratio of optical densities at 260 and 280 nm. A total of 1 μ g of total RNA was used for cDNA synthesis using a Revert Aid H minus First Strand DNA Synthesis kit (Fermentas, Villebon-sur-Yvette, France). cDNA was amplified by PCR with a LightCycler 480 (Roche Diagnostics) using SYBR Green (Fast Start DNA Master SYBR-Green I; Roche Applied Science, Roche Diagnostics).

Specific primers were used for Bcl-X_L, XIAP, FLIP, p65/RelA, or the mean value GAPDH as housekeeping gene, under the following conditions: 95 °C for 15 min, 40 cycles at 94 °C for 15 s and at 55 °C for 30 s, then 72 °C for 30 s. Specific primers were designed by Universal Probe Library System (Roche Applied Science). The sequences of the primers used are as follows: hBcl-X_L (Forward: AG CCTTGGATCCAGGAGAA, reverse: AGCGGTTGAA GCGTTCTCT); mBcl-X_L (CTGGCTAGGAGCCCTTCAG, AGGGATGAGACAGGCCAAG); hFLIP (TCCTGAA CAGTACTATTTTCGTGTGA, AGCATGAGATATAAAA TGAAAAGAAGG); hXIAP (TTTTGGGACATGGATA TACTCAGTT, AGCACTTTACTTTATCACCTTCACC), p65/RelA (TCATGAAGAAGAGTCTTTCAGC, GGAT GACGTAAAGGGATAGGG); hGAPDH (AGCCACATC GCTCAGACAC, AATACGACCAAATCCGTTGACT); mGAPDH (AGCTTGTCATCAACGGGAAG, TTTGAT GTTAGTGGGGTCTCG).

Results were expressed as $2^{-\Delta C_p}$, where C_p is the cycle threshold number. Dissociation curves were analyzed after each run for each amplicon to assess the specificity of the quantification when using SYBR Green.

Assessment of apoptosis by flow cytometry

Phosphatidylserine exposure was detected using Annexin V FITC kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. After apoptosis induction, Annexin V labeling was measured using an Accuri flow cytometer.

ELISA

Cells were plated in 24-well plates at a cell density of 2×10^5 cells per well. Eighteen hours after CHX treatment, supernatants of cells were collected and ELISA assay was performed following the manufacturer's protocol (Quantikine ELISA, mouse or human TNF α , R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Statistical analysis

Two-way ANOVA tests with *post hoc* Tukey's analysis were used to assess the statistical significance of differences (GRAPHPAD PRISM software), and *P*-values are indicated in the figure legends. In some cases, as indicated data were compared in Student's *t*-tests. Differences were considered to be significant if $P < 0.05$. **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $0.001 < P < 0.01$, * $0.01 < P < 0.05$. ns, not significant.

Acknowledgements

We would like to thank Drs R.J. Youle and H.M. McBride for kindly providing plasmids and antibodies. We also thank Dr N. Bidere for his advices and

comments on our manuscript. We are also very grateful to Lola Lecru for her assistance in RT-qPCR. This work was supported by grants from La Ligue contre le cancer (Equipe Labellisée), l'association pour la recherche contre le cancer (ARC) and Université Paris Sud XI.

Author contributions

Planned the experiments: NZ, MP, DA. Performed the experiments: NZ, MP, GA, EH, DA. Analyzed data: AV, DA. Wrote the paper: DA.

References

- 1 McBride H & Scorrano L (2013) Mitochondrial dynamics and physiology. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 148–149.
- 2 Chan DC (2006) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* **125**, 1241–1252.
- 3 James DI, Parone PA, Mattenberger Y & Martinou JC (2003) hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* **278**, 36373–36379.
- 4 Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ & Mihara K (2010) Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* **191**, 1141–1158.
- 5 Palmer CS, Osellame LD, Laine D, Koutsopoulos OS, Frazier AE & Ryan MT (2011) MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep* **12**, 565–573.
- 6 Smirnova E, Griparic L, Shurland DL & van der Bliek AM (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **12**, 2245–2256.
- 7 Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B & Scorrano L (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 15927–15932.
- 8 Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM & Chan DC (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* **305**, 858–862.
- 9 Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G *et al.* (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* **27**, 433–446.
- 10 Martinou JC & Youle RJ (2011) Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell* **21**, 92–101.
- 11 Tondera D, Grandemange S, Jourdain A, Karbowski M, Mattenberger Y, Herzig S, Da Cruz S, Clerc P,

- Raschke I, Merkwirth C *et al.* (2009) SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* **28**, 1589–1600.
- 12 Baltimore D (2011) NF- κ B is 25. *Nat Immunol* **12**, 683–685.
- 13 Napetschnig J & Wu H (2013) Molecular basis of NF- κ B signaling. *Annu Rev Biophys* **42**, 443–468.
- 14 Skaug B, Jiang X & Chen ZJ (2009) The role of ubiquitin in NF- κ B regulatory pathways. *Annu Rev Biochem* **78**, 769–796.
- 15 Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL & Youle RJ (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* **1**, 515–525.
- 16 Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN & van der Bliek AM (1998) A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* **143**, 351–358.
- 17 Karbowski M, Neutzner A & Youle RJ (2007) The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J Cell Biol* **178**, 71–84.
- 18 Seth RB, Sun L, Ea CK & Chen ZJ (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- κ B and IRF 3. *Cell* **122**, 669–682.
- 19 Castanier C, Garcin D, Vazquez A & Arnoult D (2010) Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Rep* **11**, 133–138.
- 20 Israel A (2010) The IKK complex, a central regulator of NF- κ B activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000158.
- 21 Alexia C, Poalas K, Carvalho G, Zemirli N, Dwyer J, Dubois SM, Hatchi EM, Cordeiro N, Smith SS, Castanier C *et al.* (2013) The endoplasmic reticulum acts as a platform for ubiquitylated components of nuclear factor κ B signaling. *Sci Signal* **6**, ra79.
- 22 Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, Matsuda A, Reddy VA, Orth A, Chanda SK, Batalov S & Joazeiro CA (2008) Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* **3**, e1487.
- 23 Neutzner A, Benard G, Youle RJ & Karbowski M (2008) Role of the ubiquitin conjugation system in the maintenance of mitochondrial homeostasis. *Ann NY Acad Sci* **1147**, 242–253.
- 24 Neuspiel M, Schauss AC, Braschi E, Zunino R, Rippstein P, Rachubinski RA, Andrade-Navarro MA & McBride HM (2008) Cargo-selected transport from the mitochondria to peroxisomes is mediated by vesicular carriers. *Curr Biol* **18**, 102–108.
- 25 Bae S, Kim SY, Jung JH, Yoon Y, Cha HJ, Lee H, Kim K, Kim J, An IS, Um HD *et al.* (2012) Akt is negatively regulated by the MULAN E3 ligase. *Cell Res* **22**, 873–885.
- 26 Zhang B, Huang J, Li HL, Liu T, Wang YY, Waterman P, Mao AP, Xu LG, Zhai Z, Liu D *et al.* (2008) GIDE is a mitochondrial E3 ubiquitin ligase that induces apoptosis and slows growth. *Cell Res* **18**, 900–910.
- 27 Bertrand MJ, Milutinovic S, Dickson KM, Ho WC, Boudreault A, Durkin J, Gillard JW, Jaquith JB, Morris SJ & Barker PA (2008) cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell* **30**, 689–700.
- 28 Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G & Chen ZJ (2006) Activation of IKK by TNF α requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* **22**, 245–257.
- 29 Bottomley MJ, Stier G, Pennacchini D, Legube G, Simon B, Akhtar A, Sattler M & Musco G (2005) NMR structure of the first PHD finger of autoimmune regulator protein (AIRE1). Insights into autoimmune polyendocrinopathy–candidiasis–ectodermal dystrophy (APECED) disease. *J Biol Chem* **280**, 11505–11512.
- 30 Katoh S, Hong C, Tsunoda Y, Murata K, Takai R, Minami E, Yamazaki T & Katoh E (2003) High precision NMR structure and function of the RING-H2 finger domain of EL5, a rice protein whose expression is increased upon exposure to pathogen-derived oligosaccharides. *J Biol Chem* **278**, 15341–15348.
- 31 Fang L, Hemion C, Goldblum D, Meyer P, Orgul S, Frank S, Flammer J & Neutzner A (2012) Inactivation of MARCH5 prevents mitochondrial fragmentation and interferes with cell death in a neuronal cell model. *PLoS One* **7**, e52637.
- 32 Sheridan C & Martin SJ (2010) Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion* **10**, 640–648.
- 33 Yuan H, Gerencser AA, Liot G, Lipton SA, Ellisman M, Perkins GA & Bossy-Wetzel E (2007) Mitochondrial fission is an upstream and required event for bax foci formation in response to nitric oxide in cortical neurons. *Cell Death Differ* **14**, 462–471.
- 34 Ben-Neriah Y & Karin M (2011) Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat Immunol* **12**, 715–723.
- 35 Devary Y, Rosette C, DiDonato JA & Karin M (1993) NF- κ B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science* **261**, 1442–1445.
- 36 Youle RJ & Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 47–59.
- 37 McCool KW & Miyamoto S (2012) DNA damage-dependent NF- κ B activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *Immunol Rev* **246**, 311–326.

- 38 Matsuzawa A, Tseng PH, Vallabhapurapu S, Luo JL, Zhang W, Wang H, Vignali DA, Gallagher E & Karin M (2008) Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex. *Science* **321**, 663–668.
- 39 Gomes LC, Di Benedetto G & Scorrano L (2011) During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* **13**, 589–598.
- 40 Criollo A, Senovilla L, Authier H, Maiuri MC, Morselli E, Vitale I, Kepp O, Tasdemir E, Galluzzi L, Shen S *et al.* (2010) The IKK complex contributes to the induction of autophagy. *EMBO J* **29**, 619–631.
- 41 Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C & Chan DC (2007) OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* **178**, 749–755.
- 42 Hsu YT & Youle RJ (1997) Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* **272**, 13829–13834.

**The E3 ubiquitin ligase
RNF121 is a positive
regulator of NF-kappaB
activation**

Zemirli N, Pourcelot M, Dogan N, Vazquez A, Arnoult D.

Cell communication and signaling : CCS 2014, 12: 72

SHORT REPORT

Open Access

The E3 ubiquitin ligase RNF121 is a positive regulator of NF- κ B activation

Naima Zemirli^{1,2,3}, Marie Pourcelot^{1,2,3}, Neslihan Dogan^{1,2,3}, Aimé Vazquez^{1,2,3} and Damien Arnoult^{1,2,3*}

Abstract

Background: The nuclear factor κ B (NF- κ B) family members regulate several biological processes as cell proliferation and differentiation, inflammation, immunity and tumor progression. Ubiquitination plays a key role in NF- κ B activation and the ubiquitylated transmitters of the NF- κ B signaling cascade accumulate in close proximity to endomembranes.

Findings: We performed an unbiased siRNA library screen targeting the 46 E3 ubiquitin ligases bearing transmembrane domains to uncover new modulators of NF- κ B activation, using tumor necrosis factor- α (TNF- α) receptor (TNFR) stimulation as a model. We report here the identification of a new Golgi Apparatus-resident protein, RNF121, as an enhancer of NF- κ B promoter activity through the catalytic function of its RING domain. From a molecular standpoint, while knocking down RNF121 did not alter RIP1 ubiquitination and IKK activation, the proteasomal degradation of I κ B α was impaired suggesting that this E3 ubiquitin ligase regulates this process. However, RNF121 did not directly ubiquitinate I κ B α While they were found in the same complex. Finally, we discovered that RNF121 acts as a broad regulator of NF- κ B signaling since its silencing also dampens NF- κ B activation following stimulation of Toll-Like Receptors (TLRs), Nod-Like Receptors (NLRs), RIG-I-Like Receptors (RLRs) or after DNA damages.

Conclusions: These results unveil an unexpected role of Golgi Apparatus and reveal RNF121 as a new player involved in the signaling leading to NF- κ B activation.

Keywords: NF- κ B, Ubiquitination, E3 ubiquitin ligase, Golgi apparatus, Innate immunity

Findings

The transcription factor NF- κ B plays pivotal roles in the regulation of a plethora biological processes, including cell proliferation and differentiation, innate and adaptive immunity, inflammation and tumor progression [1,2]. NF- κ B is a homo or heterodimer constituted with subunits belonging to the Rel family and the NF- κ B dimers are sequestered in the cytosol by a member of the Inhibitor of κ B (I κ B) family [2,3].

NF- κ B is activated by many inducers. Each inducer is recognized by a receptor at the cell surface or within the cell, and its binding triggers a specific signaling pathway leading to NF- κ B activation [2,3]. Each pathway involves the organization of signaling protein complexes, the formation of polyubiquitin chains acting as binding agents on specific transmitters and the action of kinases [4,5]. Nevertheless, all these complexes have a point in common:

they recruit and activate, through specific ubiquitylated transmitters, the inhibitor of NF- κ B (I κ B) kinase (IKK) complex, which consists of two catalytic kinases, IKK α and IKK β , and the regulatory subunit NEMO (also known as IKK γ) [6]. IKK then phosphorylates the inhibitory I κ B proteins, promoting their Lys⁴⁸ (K⁴⁸)-linked ubiquitination and proteasomal degradation [7]. NF- κ B dimers subsequently enter the nucleus, where they initiate the transcription of their target genes, including genes encoding pro-inflammatory cytokines or anti-apoptotic proteins [1].

As we recently reported an accumulation of the ubiquitylated transmitters leading to NF- κ B activation to the endomembrane fraction [8], we set up a siRNA screen with two oligoribonucleotides against each of the 46 membrane spanning E3 ubiquitin ligases [9] (Additional file 1) to uncover new regulators of NF- κ B activation, using tumor necrosis factor- α (TNF- α) receptor (TNFR) stimulation as a model. Indeed, engagement of TNFR promotes a rapid NF- κ B activation through the recruitment to the receptor of the adaptor protein TRADD together with the E3 ubiquitin ligases c-IAPs and TRAF2, which

* Correspondence: damien.arnoult@inserm.fr

¹INSERM, UMR_S 1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif 94800, France

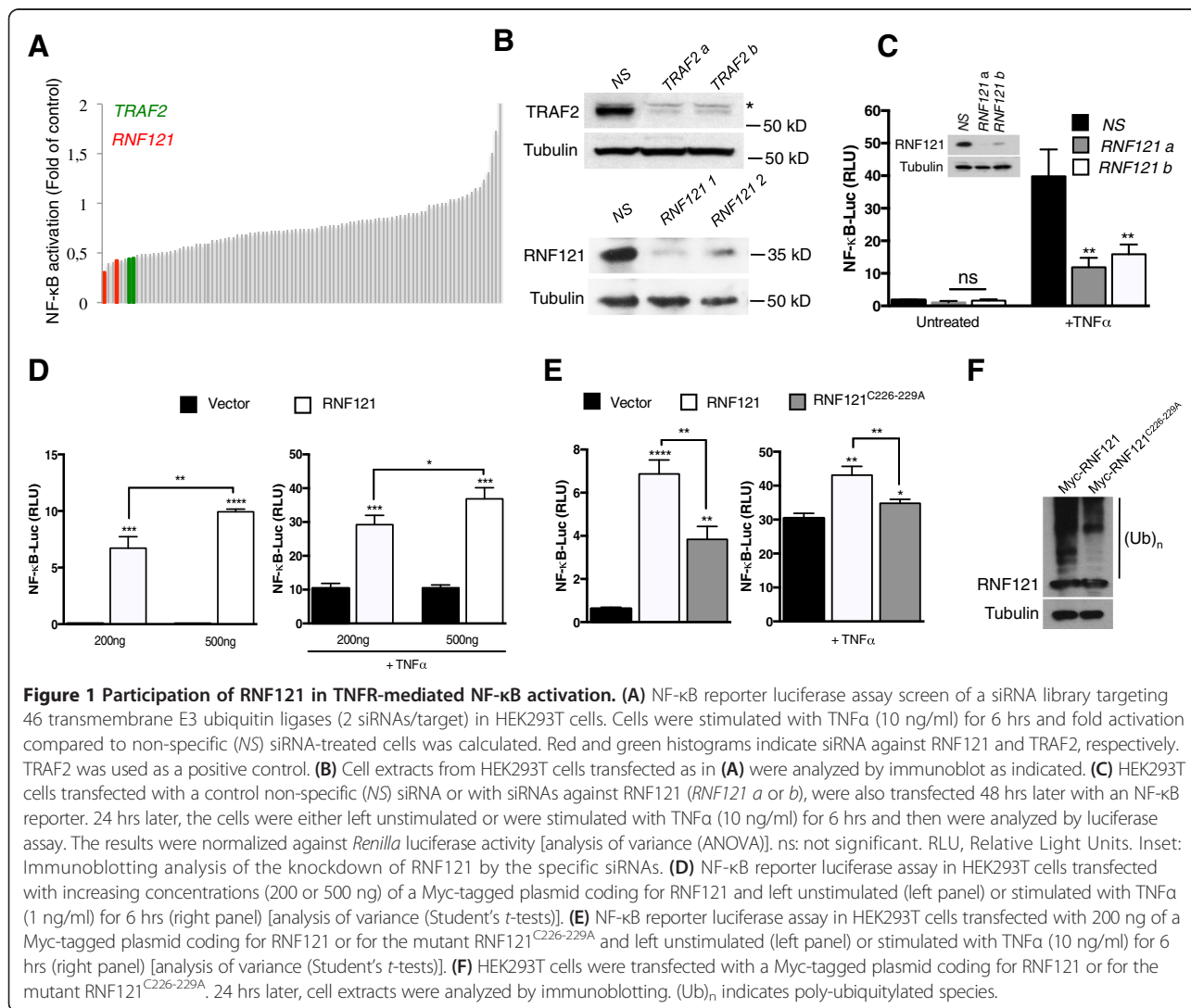
²Université Paris-Sud P11, Orsay 91400, France

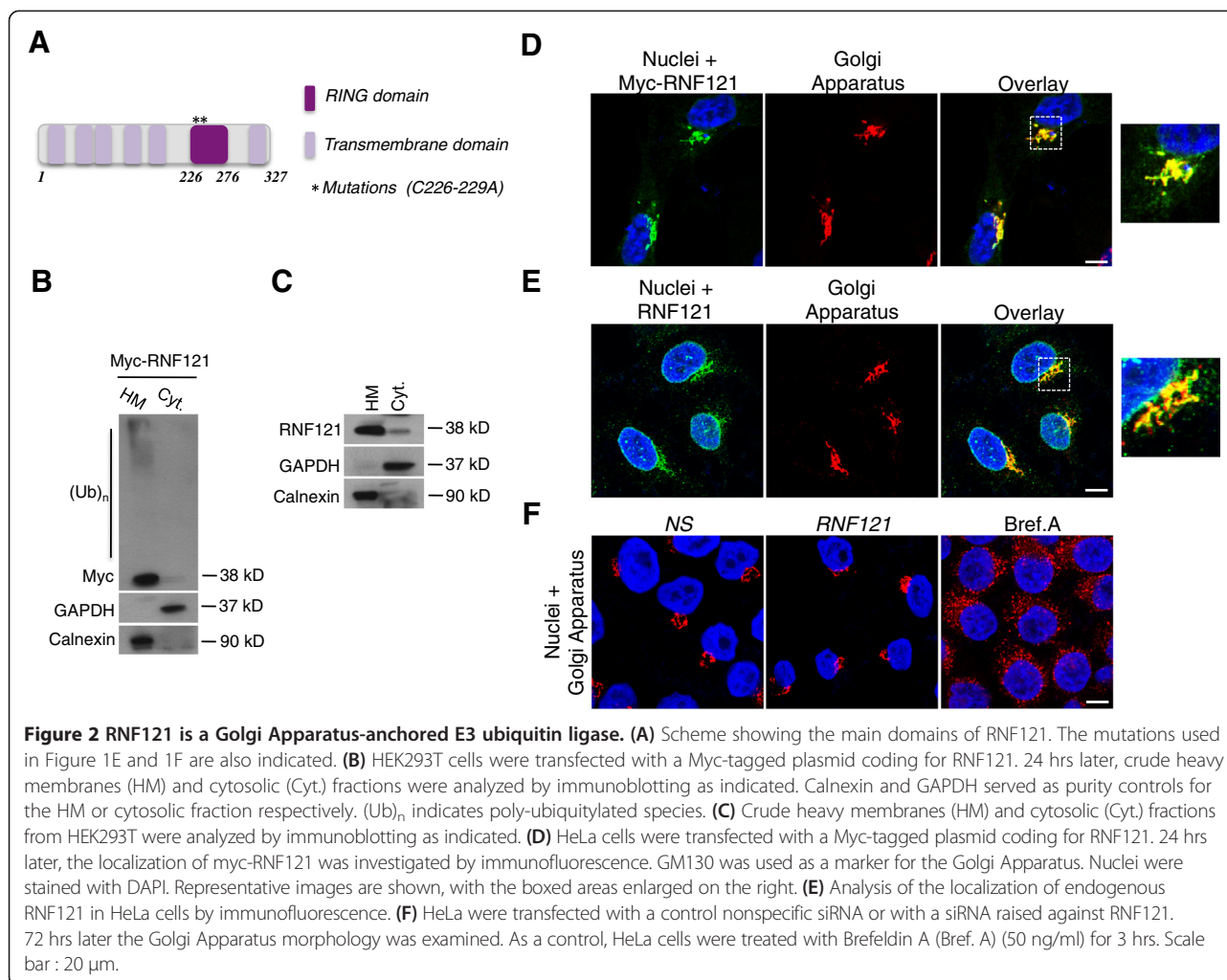
Full list of author information is available at the end of the article

are responsible for catalyzing the polyubiquitination of the kinase RIP1 that acts as a specific ubiquitylated transmitter for this pathway [10]. The impact of the knock down of the 46 membrane spanning E3 ubiquitin ligases was assessed in a gene reported assay and silencing of the key regulator of TNFR-mediated NF- κ B TRAF2 was used as a control (Figure 1A, B; see Additional file 2 for detailed Methods description). Among the top hits was RNF121 (Figure 1A). RNF121 is part of a chromosomal band (11q13) that may contain a high penetrance gene for breast cancer [11]. We then used two additional siRNA sequences against RNF121 and confirmed that TNFR-mediated NF- κ B activation was decreased, further validating the results from our initial screen (Figure 1C). Interestingly, the enforced expression of RNF121 activated NF- κ B and NF- κ B activation following TNFR stimulation was potentiated in a dose dependent-manner (Figure 1D). RNF121 specifically triggered NF- κ B activation because it did not stimulate the expression of IFN β -, ISRE-, NFAT-,

API- or p53-dependent reporter genes (data not shown). The ability of RNF121 to activate NF- κ B was dependent on the catalytic activity of its RING domain, because the RNF121^{C226-229A} mutant gave significantly lower levels of NF- κ B activation (Figure 1E). Based on the available RING finger protein structure [12,13], the replacement of the cys-226 and 229 residues with an alanine was predicted to prevent Zn²⁺ coordination, thereby impeding the overall function of the RING domain as assessed by the level of auto-ubiquitination (Figure 1F).

RNF121 is a 327 amino acids protein with a RING domain, and six transmembrane domains that have reported to anchor the protein at the endoplasmic reticulum (ER) in the nematode [14] (Figure 2A). Accordingly, both ectopically expressed and endogenous RNF121 were detected in fractions enriched with intracellular organelles (Figure 2B and C). Next, analysis of the cellular localization of RNF121 by immunofluorescence showed that Myc-tagged or endogenous RNF121 specifically co-localized

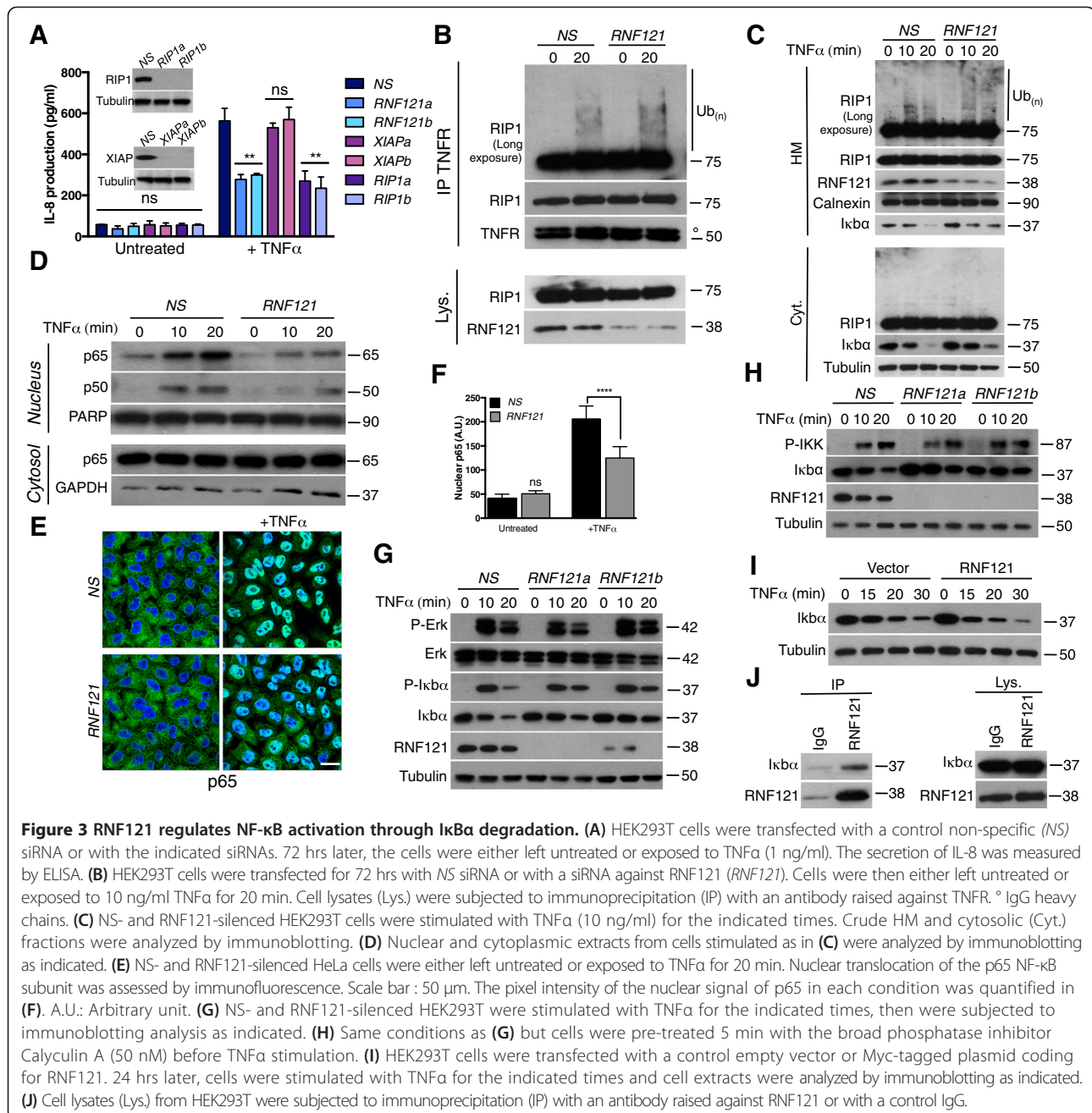




with the Golgi Apparatus (Figure 2D and E). Finally, while RNF121 appeared to be anchored in the Golgi Apparatus, silencing of this protein did not seem to affect the morphology of this organelle unlike a Brefeldin A treatment (Figure 2F), and the cell viability was not significantly modified (data not shown).

While RNF121 and RNF175 are close homologs (Additional file 3A), silencing of RNF175 had no overt effect on TNFR-mediated NF-κB activation (Additional file 3B) suggesting a specificity of RNF121 in this pathway. Next, as for RIP1, RNF121 silencing impaired the secretion of the cytokine IL-8, a target gene of NF-κB [1], further confirming the participation of RNF121 in TNFR-mediated NF-κB activation (Figure 3A). RNF121 silencing also sensitized cells to TNFα-mediated cell death (Additional file 4) confirming again the involvement of RNF121 in NF-κB activation as NF-κB protects from TNFα-mediated cell death through the expression of anti-apoptotic proteins [1]. Because ubiquitination of RIP1 is the central event in TNFR signaling [4,5,10], we next investigated whether RNF121

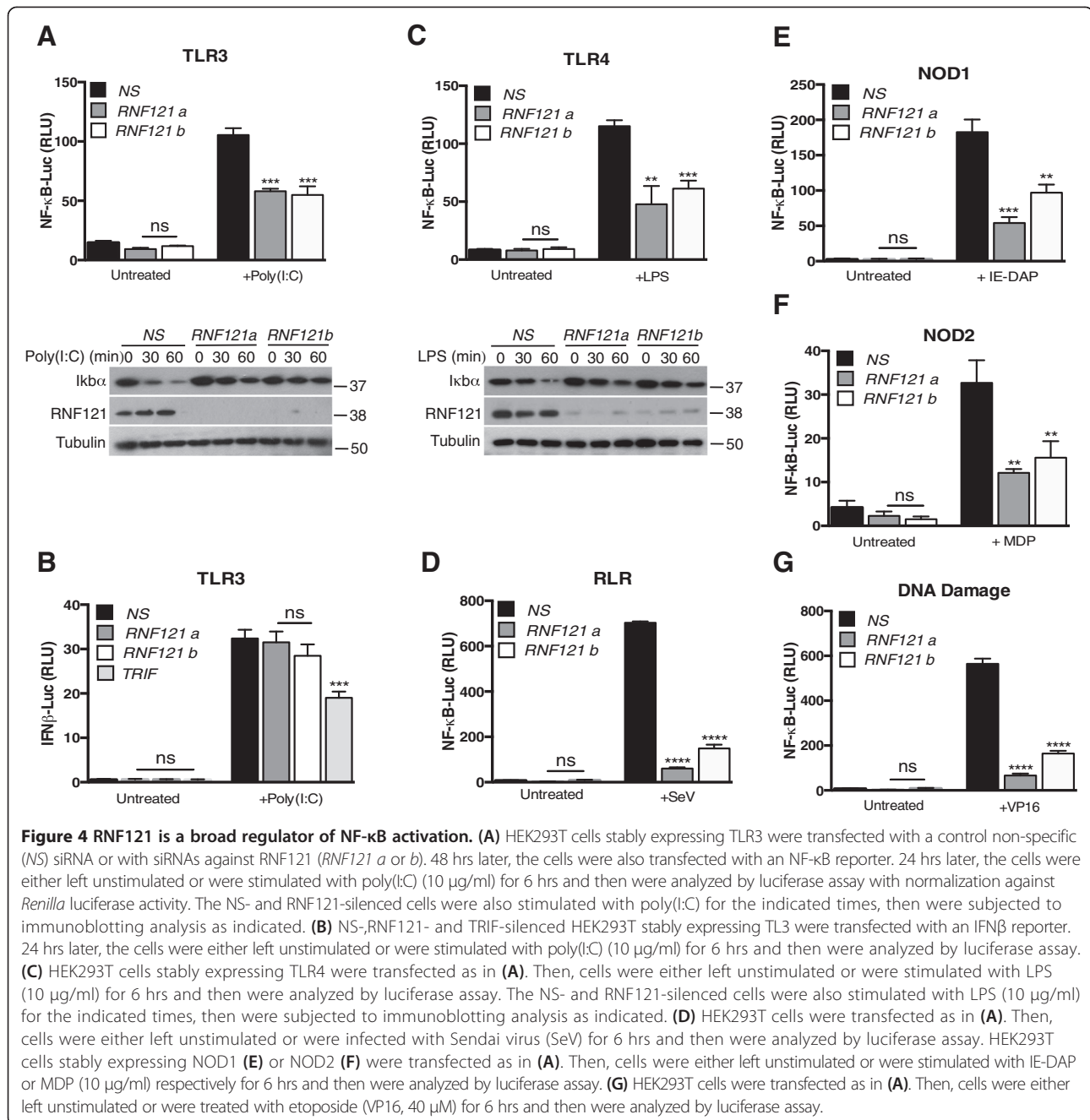
silencing impacts this process. Immunoprecipitation of the TNFR indicated that RIP1 ubiquitination is not altered when RNF121 was knocked down (Figure 3B) and the accumulation of ubiquitylated RIP1 in the heavy membrane fraction was not impeded [8] (Figure 3C). Unexpectedly, RIP1 deubiquitination in RNF121-silenced cells seemed to be delayed (Figure 3C). Nevertheless and as expected, cell fractionation experiments showed reduced p65/p50 NF-κB dimer levels in nuclear fractions from RNF121-silenced cells (Figure 3D) and the decreased relocation of p65 into the nuclei was confirmed by confocal microscopy (Figure 3E and F). These observations were in agreement with the finding that the proteasomal degradation of IκBα was hampered (Figure 3C, G, H and Additional file 5). Nevertheless, as for the MAPKs extracellular signal-regulated kinase (ERK), IκBα phosphorylation was not inhibited when RNF121 was knocked down (Figure 3G) in accord with the observation that activation of the IKK complex was not reduced either (Figure 3H). Together, these results suggested that RNF121 is likely implicated in the control of the proteasomal degradation of



IκBα. Accordingly, ectopic expression of RNF121 accelerated IκBα degradation following TNFα exposure (Figure 3I). Immunoprecipitation of endogenous RNF121 demonstrated that both proteins are in the same complex (Figure 3J) and a pool of IκBα co-localized with RNF121 (Additional file 6). However, RNF121 did not seem to induce the ubiquitination of IκBα (Additional file 7A and B) likely because both proteins did not directly interact (Additional file 7A and C).

As RNF121 seemed to regulate IκBα degradation, a general feature in the process of NF-κB activation [3,7], we then investigated whether RNF121 silencing affects

NF-κB activation upon stimulation of innate immunity receptors [15]. We observed that RNF121 silencing also inhibited IκBα degradation and ensuing NF-κB activation following Toll-Like-Receptor 3 (TLR3) stimulation with poly (I:C) (Figure 4A) while it had no effect on the stimulation of the IFNβ promoter (Figure 4B) confirming the specificity of RNF121 in the NF-κB pathway. Similarly, RNF121 knock down impaired NF-κB activation after stimulation of Toll-Like-Receptor 4 (TLR4), retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I), nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 (NOD1)



and NOD2 with lipopolysaccharide (LPS), viral RNAs, γ-D-Glu-mDAP from peptidoglycan (IE-DAP) or muramyl dipeptide (MDP) respectively (Figure 4C, D, E and F). Finally, in cells exposed to the DNA-damaging agent etoposide, which relies on NEMO SUMOylation and phosphorylation to convey NF-κB activity [16], the transcription factor activation was reduced again (Figure 4G), suggesting that RNF121 acts as a broad regulator of NF-κB signaling.

In summary, we provide evidence that RNF121, a Golgi apparatus-anchored E3 ubiquitin ligase, participates in

NF-κB activation. When overexpressed, RNF121 promotes NF-κB activity. While ubiquitination of specific key transmitters is required for the NF-κB signaling [2-5], our data indicate that ubiquitination of RIP1 (Figure 3B and C), IRAK1 or RIP2 (data not shown) following the stimulation of TNFR, TLR4 or NOD1 respectively, was not affected when RNF121 was silenced. Moreover, although the phosphorylation of both IKK and its target IκBα was normal in RNF121 siRNA-transfected cells, IκBα degradation and the resulting p65/p50 NF-κB dimers redistribution were impaired.

These observations suggest that RNF121 is involved in the proteasomal degradation of I κ B α [7].

Further works are required to delineate the molecular framework employed by RNF121 to regulate I κ B α degradation. I κ B α degradation involves a K⁴⁸-linked ubiquitination [7] that is mediated by a specific E3 ubiquitin ligase SCF ^{β -TrCP} [17-19]. The F-box component of this E3, β -TrCP, recognizes the I κ B α degron formed following phosphorylation by IKK and thus couples I κ B α phosphorylation to ubiquitination [7]. While endogenous RNF121 and I κ B α were found in the same immuno-complex (Figure 3J), RNF121 did not appear to directly ubiquitinate I κ B α (Additional file 7A). We then hypothesize that RNF121 controls SCF ^{β -TrCP} function on I κ B α in a complex through ubiquitination and this aspect merits future exploration. Indeed, the Nedd8 ubiquitin-like molecule regulates the assembly and catalytic activity of the SCF complex [20]. Interestingly, a significant pool of β -TrCP co-localized with the Golgi Apparatus where is anchored RNF121 (Additional file 8) and in preliminary experiments, endogenous RNF121 and β -TrCP were detected in the same complex (data not shown). However, we do not rule out the hypothesis that RNF121 also modulates the ubiquitination of other proteins of the SCF complex as Skp1, Cul1 or Rbx1/Roc1 [7].

In conclusion, over and above its previously known roles, Golgi Apparatus seems to be also involved in NF- κ B activation via the E3 ubiquitin ligase RNF121.

Additional files

Additional file 1: Design of the siRNA library.

Additional file 2: Methods description.

Additional file 3: RNF175, a close homolog of RNF121, does not regulate NF- κ B activation.

Additional file 4: RNF121 silencing sensitizes cells to TNF α -mediated apoptosis.

Additional file 5: RNF121 silencing delays I κ B α degradation.

Additional file 6: A pool of I κ B α co-localizes with RNF121.

Additional file 7: RNF121 does not directly ubiquitinate I κ B α . (P Δ O 597 κ β)

Additional file 8: Intracellular localization of β -TrCP.

Abbreviations

AP-1: Activator protein 1; ERK: Extracellular signal-regulated Kinases; IFN: Interferon; I κ Bs: Inhibitors of NF- κ B; IKK: I κ Bs kinase; ISRE: IFN stimulated response element; MAPK: Mitogen-activated protein Kinase; NFAT: Nuclear factor of activated T-cells; NEMO: NF- κ B essential modulator; NF- κ B: Nuclear factor- κ B; NLR: NOD-Like Receptor; NOD: Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein; RIG-I: Retinoic acid-inducible gene I; RIP1: Receptor interacting protein 1; RLR: RIG-I-like receptor; RNF121: Ring finger protein 121; TLR: Toll-like receptor; TNF α : Tumor necrosis factor α ; TRADD: TNF Receptor type 1-associated death domain protein; TRAF: TNF receptor-associated factor.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

NZ designed and conducted most experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. MP, ND conducted experiments and analyzed the data. AV analyzed the data. DA conceived the project, conducted experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We thank N. Bidère, E. Hatchi, K. Poalas and G. Ambrose for helpful discussions. This work was supported by grants from Fondation ARC, Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée) and ANRS. NZ and MP are supported by fellowships from Université Paris Sud.

Author details

¹INSERM, UMR_S 1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif 94800, France.

²Université Paris-Sud P11, Orsay 91400, France. ³Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Villejuif 94800, France.

Received: 13 May 2014 Accepted: 21 October 2014

Published online: 12 November 2014

References

1. Ben-Neriah Y, Karin M: Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat Immunol* 2011, **12**:715–723.
2. Hayden MS, Ghosh S: NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 2012, **26**:203–234.
3. Napetschnig J, Wu H: Molecular basis of NF- κ B signaling. *Annu Rev Biophys* 2013, **42**:443–468.
4. Bhoj VG, Chen ZJ: Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 2009, **458**:430–437.
5. Skaug B, Jiang X, Chen ZJ: The role of ubiquitin in NF- κ B regulatory pathways. *Annu Rev Biochem* 2009, **78**:769–796.
6. Israel A: The IKK complex, a central regulator of NF- κ B activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010, **2**:a000158.
7. Kanarek N, Ben-Neriah Y: Regulation of NF- κ B by ubiquitination and degradation of the I κ Bs. *Immunol Rev* 2012, **246**:77–94.
8. Alexia C, Poalas K, Carvalho G, Zemirli N, Dwyer J, Dubois SM, Hatchi EM, Cordeiro N, Smith SS, Castanier C, Le Guelte A, Wan L, Kang Y, Vazquez A, Gavard J, Arnould D, Bidere N: The Endoplasmic Reticulum Acts as a Platform for Ubiquitylated Components of Nuclear Factor κ B Signaling. *Sci Signal* 2013, **6**:ra79.
9. Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, Matsuda A, Reddy VA, Orth A, Chanda SK, Batalov S, Joazeiro CA: Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* 2008, **3**:e1487.
10. Walczak H: TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunol Rev* 2011, **244**:9–28.
11. Rosa-Rosa JM, Pita G, Gonzalez-Neira A, Milne RL, Fernandez V, Ruivenkamp C, van Asperen CJ, Devilee P, Benitez J: A 7 Mb region within 11q13 may contain a high penetrance gene for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009, **118**:151–159.
12. Bottomley MJ, Stier G, Pennacchini D, Legube G, Simon B, Akhtar A, Sattler M, Musco G: NMR structure of the first PHD finger of autoimmune regulator protein (AIRE1). Insights into autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) disease. *J Biol Chem* 2005, **280**:11505–11512.
13. Katoh S, Hong C, Tsunoda Y, Murata K, Takai R, Minami E, Yamazaki T, Katoh E: High precision NMR structure and function of the RING-H2 finger domain of EL5, a rice protein whose expression is increased upon exposure to pathogen-derived oligosaccharides. *J Biol Chem* 2003, **278**:15341–15348.
14. Darom A, Bening-Abu-Shach U, Broday L: RNF-121 is an endoplasmic reticulum-membrane E3 ubiquitin ligase involved in the regulation of beta-integrin. *Mol Biol Cell* 2010, **21**:1788–1798.
15. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006, **124**:783–801.
16. McCool KW, Miyamoto S: DNA damage-dependent NF- κ B activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *Immunol Rev* 2012, **246**:311–326.
17. Spencer E, Jiang J, Chen ZJ: Signal-induced ubiquitination of I κ B α by the F-box protein Slimb/ β -TrCP. *Genes Dev* 1999, **13**:284–294.
18. Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW: The SCF β -TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with

phosphorylated destruction motifs in I κ B α and beta-catenin and stimulates I κ B α ubiquitination in vitro. *Genes Dev* 1999, **13**:270–283.

19. Yaron A, Hatzubai A, Davis M, Lavon I, Amit S, Manning AM, Andersen JS, Mann M, Mercurio F, Ben-Neriah Y: **Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase.** *Nature* 1998, **396**:590–594.
20. Read MA, Brownell JE, Gladysheva TB, Hottellet M, Parent LA, Coggins MB, Pierce JW, Podust VN, Luo RS, Chau V, Palombella VJ: **Nedd8 modification of cul-1 activates SCF(beta-TrCP)-dependent ubiquitination of I κ B α .** *Mol Cell Biol* 2000, **20**:2326–2333.

doi:10.1186/s12964-014-0072-8

Cite this article as: Zemirli *et al.*: The E3 ubiquitin ligase RNF121 is a positive regulator of NF- κ B activation. *Cell Communication and Signaling* 2014 **12**:72.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



The TBK1-binding domain of optineurin promotes type I interferon responses

Meena NP, Zhu G, Mittelstadt PR, Giardino Torchia ML,
Pourcelot M, Arnoult D, Ashwell JD, Munitic I.

FEBS letters 2016, **590**(10): 1498-1508.

The TBK1-binding domain of optineurin promotes type I interferon responses

Netra Pal Meena^{1,*}, Guozhi Zhu¹, Paul R. Mittelstadt¹, Maria Letizia Giardino Torchia¹, Marie Pourcelot^{2,3}, Damien Arnoult^{2,3}, Jonathan D. Ashwell¹ and Ivana Munitic^{1,4}

1 Laboratory of Immune Cell Biology, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

2 INSERM, UMR_S 1197, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

3 Université Paris-Saclay, Villejuif, France

4 Laboratory of Molecular Immunology, Department of Biotechnology, University of Rijeka, Croatia

Correspondence

I. Munitic, Laboratory of Molecular Immunology, Department of Biotechnology, University of Rijeka, 51000 Rijeka, Croatia

Fax: +385 51 584 599

Tel: +385 51 584 579

E-mail: ivana.munitic@biotech.uniri.hr

J. D. Ashwell, Laboratory of Immune Cell Biology, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

Fax: +1 301 402 4844

Tel: +1 301 496 4931

E-mail: jda@pop.nci.nih.gov

Pathogen-associated molecular pattern (PAMP) recognition leads to TANK-binding kinase (TBK1) polyubiquitination and activation by transautophosphorylation, resulting in IFN- β production. Here, we describe a mouse model of optineurin insufficiency (Optn Δ^{157}) in which the TBK1-interacting N-terminus of optineurin was deleted. PAMP-stimulated cells from Optn Δ^{157} mice had reduced TBK1 activity, no phosphorylation of optineurin Ser¹⁸⁷, and mounted low IFN- β responses. In contrast to pull-down assays where the presence of N-terminus was sufficient for TBK1 binding, both the N-terminal and the ubiquitin-binding regions of optineurin were needed for PAMP-induced binding. This report establishes optineurin as a positive regulator TBK1 via a bipartite interaction between these molecules.

Keywords: optineurin; TBK1; type I interferon

*Present address

Laboratory of Cellular and Developmental Biology, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

(Received 16 February 2016, revised 5 April 2016, accepted 7 April 2016)

doi:10.1002/1873-3468.12176

Edited by Kazuhiro Iwai

Optineurin is a ubiquitin-binding protein whose mutations have been found in two neurodegenerative diseases: primary open angle/normal-tension glaucoma (POAG/NTG) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [1,2]. The

exact role of optineurin in the pathogenesis of neurodegeneration is unclear. Moreover, the mutations found in ALS and POAG/NTG do not seem to overlap, suggesting that different regions of optineurin exert different and/or

Abbreviations

ALS, amyotrophic lateral sclerosis; ATCC, American Type Culture Collection; BMDC, bone marrow-derived dendritic cells; BMDM, bone marrow-derived macrophages; ES, embryonic stem; HEK, human embryonic kidney; IRF3, interferon regulatory factor 3; KD, kinase domain; LPS, lipopolysaccharide; NEM, N-ethylmaleimide; NEMO, NF- κ B essential modulator; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; pfu, plaque-forming unit; POAG/NTG, primary open angle/normal-tension glaucoma; TBK1, TANK-binding kinase 1; TLR, Toll-like receptor; VSV, vesicular stomatitis virus; ZF, zinc finger.

multiple functions, perhaps even in different cell types. Interestingly, *in vitro* studies have implicated optineurin in an unusually large number of cellular functions including regulation of inhibitor of κ B kinase (IKK) and TANK-binding kinase 1 (TBK1), autophagy, vesicle trafficking, cell division, regulation of transcription, and maintenance of the structure of Golgi apparatus [3–9]. During these processes optineurin is mostly thought to act as an adaptor, exerting its function by bridging various cellular proteins. The initial studies of optineurin interactions with other proteins revealed that its N-terminal region is indispensable for binding to TBK1, myosin VI, Rab8, and glutamate receptor, GluR1a, whereas its C-terminal region is required for binding to RIP1, CYLD, myosin VI, and huntingtin [10,11]. It was subsequently shown, though, that such binding is dynamic and contingent on various ubiquitination and phosphorylation events. For example, optineurin binding to LC3, a protein expressed on autophagosomal membranes, is enhanced upon TBK1-mediated phosphorylation of optineurin on serine 177 (S177) [5].

A prominent feature of optineurin is its ubiquitin binding. Optineurin contains two ubiquitin-binding sites, highly homologous to those of NF- κ B essential modulator (NEMO): the Ubiquitin-binding regions of ABIN proteins and NEMO (UBAN), and a zinc finger (ZF) [3,12,13]. This bipartite region maps onto the C-terminal portion of optineurin and is necessary for its selective high-affinity binding to K63- and M1-polyubiquitinated proteins. Optineurin binding to such polyubiquitin chains was proposed to be important for both cell signaling and autophagy [3,5]. During signaling, given the close homology between optineurin and NEMO ubiquitin-binding domains, it was proposed that optineurin binds to the same polyubiquitin-modified proximal signaling molecules to which NEMO binds during NF- κ B and interferon regulatory factor 3 (IRF3) pathway activation [3,14,15]. Ubiquitination is indispensable in both signaling pathways as it allows the assembly of multimeric signaling complexes (signalosomes) necessary for kinase activation and signal propagation. However, although NEMO deficiency leads to complete shutdown of NF- κ B and IRF3 activation in response to various pathogens or pathogen-mimicking ligands [16,17], the role of optineurin is still controversial.

Serine-threonine kinase TBK1 is a central kinase that regulates type I IFN secretion in response to pathogens [18,19]. It does so by direct phosphorylation of IRF3, a transcriptional factor that then moves to the nucleus and binds promoter regions of type I IFN genes [20]. TBK1 is constitutively expressed in most cells as an inactive homodimer in which kinase domains (KD) face away from each other [21]. Upon PAMP recognition by

Toll-like receptors (TLR) or intracellular DNA and RNA sensors, TBK1 is K63-ubiquitinated, allowing signalosome assembly and intradimer KD interaction, leading to activation by transautophosphorylation at Ser172 [22]. The role of optineurin as an adaptor for TBK1 signalosome assembly was addressed in several studies, but there have been disparate results. It was reported that overexpression of optineurin in HEK293-hTLR3 cells inhibited, whereas transient optineurin silencing promoted production of type I interferon IFN- β upon viral infection [15]. This suggested that optineurin was a negative regulator of TBK1 activation, perhaps acting as a competitive inhibitor of NEMO. However, two mouse models designed to abolish ubiquitin-binding activity of optineurin, one carrying a point mutation in the ubiquitin-binding domain (Optn^{D477N}) and another lacking the entire C-terminal region encompassing the UBAN and ZF (Optn^{470T}), argued the opposite, that the ubiquitin-binding function of optineurin was required for positive regulation of TBK1. Notably, in bone marrow-derived macrophages (BMDM) and dendritic cells (BMDC), from both models, optineurin was necessary for optimal TBK1 activation and IFN- β secretion upon TLR-3, -4, and -9 stimulation [4,23]. Optn^{470T} mice also had diminished IFN- β secretion during lipopolysaccharide (LPS)-induced sepsis. Although this issue of was considered to be closed with the newer *in vivo* data, a recent report reiterated the role of optineurin as a negative regulator of TBK1 in HeLa cells in a viral infection model [24]. Moreover, that study proposed a novel mechanism of optineurin-mediated TBK1 suppression, demonstrating that optineurin brings the CYLD deubiquitinase to polyubiquitinated TBK1, thus leading to signal shutdown. Given the discrepancy between *in vivo* and *in vitro* results, it is possible that Optn^{D477N} and Optn^{470T}, which like most mutations found in ALS patients lack the ubiquitin-binding function, act in a dominant-negative fashion. Importantly, the TBK1-binding site in optineurin maps onto amino acids 1–127 [25], and is preserved in these models. To resolve this controversy and elucidate the physiologic role of optineurin in TBK1 activation, we have examined the contribution of optineurin to type I IFN activation by designing a mouse model in which the N-terminal region (residues 1–157; Optn Δ ¹⁵⁷ mice), encompassing the entire TBK1-binding site, was deleted.

Materials and methods

Mice

Mice with the N-terminal truncation of optineurin were generated by genetic recombineering as described [26].

Exons 2 and 3 of the mouse optineurin gene in 129 embryonic stem (ES) cells were floxed, and ES clones verified by Southern blot were injected into C57BL/6 blastocysts in the Mouse Cancer Genetics Program, NCI-Frederick. The chimeras were crossed to β -actin-Cre to generate whole body optineurin deletion (Optn Δ^{157}). The Optn Δ^{157} mice used in these studies were backcrossed onto the B6 background for at least four and up to 11 generations. For all experiments, the controls from the same generation were used. The mice were kept in NCI animal facility and all studies were approved by the National Cancer Institute Animal Care and Use Committee.

Cell culture, plasmids, and reagents

Human embryonic kidney (HEK) 293 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), and HEK293 cells that stably express human TLR3 (HEK293-hTLR3) from Invivogen. Cell lines were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 5 mM glutamine, and antibiotics (complete medium). Bone marrow-derived macrophages were generated from mouse bone marrow cells and cultured in complete RPMI supplemented with supernatant of L929 cell cultures (final concentration of 30%). The mouse optineurin gene was cloned from the cDNA generated from mouse embryonic fibroblast mRNA, and subcloned into pcDNA3.1+ expression vector. To find the alternative translation initiation site in mice with the N-terminal truncation, Optn Δ 157 and Optn Δ 192 DNA fragments were generated. To subclone WT, Optn Δ 157, Optn Δ 192, the following forward primers were used: ACCATGTCCCATCAACCTCTGAGC, ACCATGCGCCTTCGGGCTGAAAAGGC, ACCATGACCGAAGGAGAGACTGAAGGG, respectively. The reverse primer was: GGGCTCTAGATCAAATGATGCA GTCCATCACATGG. HEK293 cells were transfected by calcium phosphate method with pcDNA3.1+ harboring WT, Optn Δ 157 or Optn Δ 192, and lysates were prepared 20 h later in RIPA buffer. The human optineurin gene, as well as E50K, Δ 147, and D474N mutants were subcloned into bacterial pDest15 expression vector harboring a GST tag. The plasmid encoding myc-TBK1 was a kind gift from Rongtuan Lin (McGill University). Antibodies recognizing phospho-S172 TBK1, TBK1, IRF3, and phospho-S396 IRF3 were from Cell Signaling, anti-myc and anti-I κ B α from Santa Cruz, and anti-optineurin (N-term and C-term) from Cayman. Anti- β -actin, N-ethylmaleimide (NEM), and LPS were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Poly(I:C) was purchased from Invivogen (San Diego, CA, USA). Phospho-S177 optineurin antibody was generated as reported [5]. Vesicular stomatitis virus (VSV) strain, Indiana, was kindly provided by Jonathan W. Yewdell (NIAID). Secondary antibodies conjugated with HRP were purchased from GE Healthcare Bio-Sciences (Pittsburgh, PA, USA). Nitrocellulose membranes were purchased from Biorad.

Protease and phosphatase inhibitor cocktails and SuperScript[®] First-Strand Synthesis System were obtained from Roche, and enhanced chemiluminescence reagent from Pierce. Power SYBR Green was obtained from Applied Bioscience (Foster City, CA, USA). High-molecular weight poly(I:C) was from InvivoGen (Carlsbad, CA, USA), NuPAGE[®]SDS-PAGE, and Lipofectamine 2000 from Invitrogen. Triton and RIPA buffer for mammalian cell lysis were obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA).

Immunofluorescence microscopy

Bone marrow-derived macrophages were grown in 8-well Lab-Tec chamber slides (Thermo Fisher Scientific) for 24 h and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. After fixation, cells were washed three times with PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 15 min, and blocked with 10% goat serum for 1 h. The slides were then incubated overnight with anti-optineurin antibody from Cayman (1:500) and anti-GM130 antibody from BD Transduction Laboratories (1:500) in PBS at 4 °C, and after thorough washing incubated with secondary goat anti-(rabbit IgG) Alexa Fluor[®]594 and goat anti-(mouse IgG)-Alexa Fluor[®]488 (each at 1:2000) from Molecular Probes. The slides were mounted with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-containing mounting medium (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) and images were acquired with a confocal microscope (LSM 510 META, Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) and processed using Zeiss LSM image browser.

In vitro protein pull-down assays

In vitro protein pull-down assays were performed as described [3]. Briefly, GST or GST-optineurin fusion proteins were expressed in BL21 E. Coli cells, purified on glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare Bio-Sciences), and equal amounts as verified by Coomassie blue staining were used in pull-down assays. HEK293 cells transfected with myc-TBK1 were lysed in Triton lysis buffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 30 mM NaF, 2 mM sodium pyrophosphate, 5 mM N-ethylmaleimide, and protease inhibitor cocktail). Purified GST proteins on beads were used to pull down HEK293 cell lysate with overexpressed myc-TBK1 in lysis buffer. The beads were washed with RIPA buffer and after protein elution, were resolved by SDS/PAGE and immunoblotted.

Immunoblotting and immunoprecipitation

Whole-cell extracts of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), BMDM, and HEK293 cells were prepared in RIPA lysis buffer for detection of phospho-IRF3 and

IRF3, or Triton lysis buffer for other proteins. Proteins were resolved on NuPAGE[®]SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes and immunoblotted with the indicated primary and HRP-conjugated secondary antibodies. Signals were detected using enhanced chemiluminescence. Immunoprecipitation was performed as described [3]. Briefly, BMDM were treated with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ poly(I:C) or 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS for the indicated times. The cells were washed once with PBS and lysed in Triton lysis buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors. For p-TBK1 blots after optineurin immunoprecipitation, HEK293-hTLR3 cells were lysed with the following lysis buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 2 mM sodium pyrophosphate, 25 mM glycerol 2-phosphate, 1 mM sodium orthovanadate, and protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific). The cell lysates were precleared with protein G-conjugated Sepharose-4B (Sigma-Aldrich) and incubated with anti-optineurin antibody for 16 h at 4 °C, followed by incubation with protein G-conjugated beads for another hour. The immunoprecipitates were resolved by SDS/PAGE and immunoblotted with anti-pTBK1, -TBK1, and -optineurin antibodies.

ELISA for IFN β

Bone marrow-derived macrophages cultured in complete Dulbecco's Modified Eagle Medium were stimulated with 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS or 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ poly(I:C), and supernatants were collected at the indicated times. Mice were injected with 10^{10} plaque-forming units (pfu) of VSV intraperitoneally and blood was drawn 16 h later. Supernatants and sera were assayed for IFN- β with the IFN- β ELISA kit (PBL Interferon Source, Piscataway, NJ, USA) following the manufacturer's protocol.

Genotyping and quantitative RT-PCR

Optn Δ^{157} mice were genotyped with the following primers: forward: CCTGCTTCCTCATGCAGTGATCCAGAG and reverse: AAGGAAAAAAGAGCTCGCGGCCGCGCTCC TGATAACAC; another forward primer was used as internal control: ACGCGTCGACGTCGGCCATAGCGGGGACA CACTTGT. Real-time PCR was performed with SYBR Green using a 7500 Real Time PCR System (Applied Bioscience). Housekeeping ribosomal 18S RNA was amplified to normalize RNA content of the lysate and obtain a ΔCT value. The primers used were, *Optn*-Forward: GCTCCG AAATCAAGATGGAG; *Optn*-Reverse: GCAGAGTGGCT AACCTGGAC; 18S-Forward: AAATCAGTTATGGTTCC TTTGGTC; 18S-Reverse: GCTCTAGAATTACCACAGTT ATCCAA, *Il6*-Forward: GCTACCAAAGTGGATATAAT CAGGA and *Il6*-Reverse: CCAGGTAGCTATGGTACTC CAGAA-3'

Statistical analysis and protein quantification

Statistical analysis was done using Student's *t*-test with GraphPad Prism software (La Jolla, CA, USA). Densitometry was done with Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Results

Generation of mice lacking the optineurin TBK1-binding region

To generate mice lacking the optineurin TBK1-binding region, the first two coding exons of *Optn* were floxed (Fig. 1A). Mice carrying the floxed allele were crossed to mice expressing Cre recombinase under the control of the β -actin promoter, achieving whole body deletion of this fragment. The excision of the floxed exons was verified by PCR of tail DNA (Fig. 1B), and lysates of bone marrow-derived macrophages (BMDM) from homozygous WT and the mice with N-terminal deletion were immunoblotted for optineurin. An antibody against N-terminal optineurin detected a ~ 75 kDa WT protein, whereas no band was detected in mice where the N-terminus of optineurin was deleted (Fig. 1C). In the latter, an antibody against the C-terminus of optineurin uncovered a ~ 50 kDa band (Fig. 1D), demonstrating that the excision of the first coding exon did not result in complete optineurin deficiency, instead generating a truncated protein. The truncated protein was expressed at an approximately 1.5-fold lower level than its WT counterpart, as measured by densitometry (Fig. 1E). The comparison of mRNA expression levels showed that N-terminal deletion also had several fold lower mRNA levels (Fig. 1F). To examine which of the possible alternative open reading frames in the optineurin gene was being used to generate truncated protein, we created expression vectors encoding the possible truncated proteins transcribed from the two ATG codons that could likely generate a ~ 50 kDa protein. Constructs of the full-length optineurin and the two possible N-terminal truncations starting from the first and the second methionine in exon 4 (Optn Δ^{157} and Optn Δ^{192}) were made, and confirmed by PCR analysis (Fig. 1G and data not shown). Western blot of lysates of HEK293 cells transfected with WT, Optn Δ^{157} , or Optn Δ^{192} constructs demonstrated that the deletion of the first two coding exons resulted in the initiation of the optineurin translation at the first ATG of exon 4 (Fig. 1H and data not shown). The mice were hence designated Optn Δ^{157} .

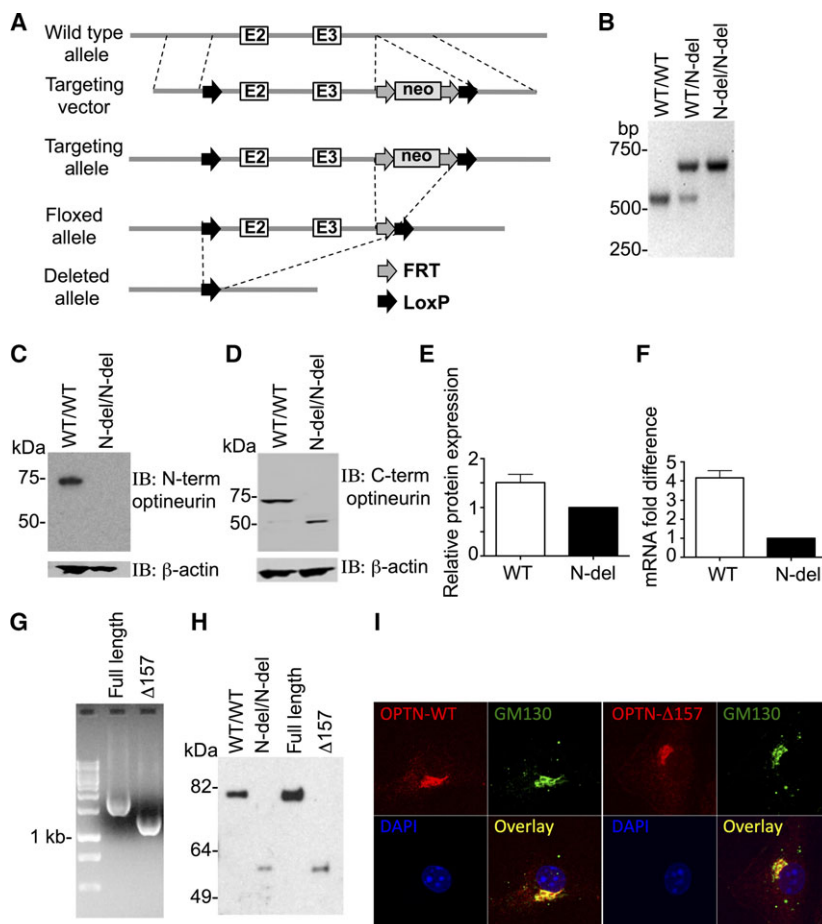


Fig. 1. Characterization of mice lacking the optineurin TBK1-binding region. (A) The generation of mice lacking the optineurin TBK1-binding region is shown. A targeting construct with *LoxP*-flanked exons 2 and 3 was inserted into the endogenous locus and deleted upon Cre-mediated recombination. Neo cassette, *FRT*, and *LoxP* recombination sites are indicated. (B) PCR distinguishing mice with WT optineurin and an N-terminal deletion. (C, D) Western blot of BMDM from the indicated mice with anti-optineurin antibodies raised against N-terminal and C-terminal epitopes, respectively. (E) Optineurin protein from BMDM from WT and N-terminal deletion mice was detected by an antibody against optineurin C-terminus. The level of optineurin expression was quantified from three replicate blots on Image J software and the WT protein level is expressed as % of the level of the deleted protein. (F) Optineurin mRNA was detected in BMDM by qRT-PCR. $\Delta\Delta$ CT of N-terminal deletion was designated as 1, and the difference between $\Delta\Delta$ CT of WT optineurin and N-terminal deletion is depicted as mean \pm SEM for two independent experiments with duplicate samples. (G) PCR of the WT or the indicated optineurin mutants from pcDNA3.1+ expression plasmids. (H) Western blot with an antibody against the C-terminus of optineurin in PBMC from the indicated mice (first two lanes), and lysates of HEK293 cells transfected with the WT optineurin or the indicated mutants in pcDNA3.1+ vector (last two lanes). (I) BMDM from WT and *Optn* Δ^{157} mice were analyzed by confocal microscopy after staining with the indicated antibodies and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (for nuclei). Objective used for acquiring the images was Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC. One representative experiment out of three is shown.

The initial characterization did not show differences between WT and *Optn* Δ^{157} mice. *Optn* Δ^{157} mice were born at normal Mendelian frequencies and did not exhibit signs of disease. Moreover, *Optn* Δ^{157} had the same cellular localization as WT protein, both being found in the cytoplasm, and preferentially located at the Golgi apparatus, as demonstrated by their colocalization with Golgi matrix protein GM130 (Fig. 1I).

Inducible binding of TBK1 by the optineurin N-terminal region

The region of optineurin responsible for TBK1-binding has been mapped to residues 1–127 [25], and thus should be missing in *Optn* Δ^{157} mice. To test this, myc-tagged TBK1 from HEK293 cell lysates was pulled down with either GST fusion proteins containing WT optineurin or *Optn* Δ^{147} , the human truncation homologous to mouse

Optn Δ^{157} . As expected, GST-WT optineurin pulled down TBK1 (Fig. 2A), as did the control optineurin E50K, a glaucoma-related mutation that was found to associate with TBK1 even more strongly than the WT protein [25]. In contrast, TBK1 was not pulled down with Optn Δ^{147} , confirming that this region is crucial for this interaction. A ubiquitin-binding point mutant in the UBAN (D474N) bound to TBK1 comparably to the WT protein, strengthening the previous report that the ability of optineurin to bind ubiquitin is not a prerequisite for the interaction with TBK1 [23]. The binding of TBK1 and optineurin was further tested in cell lysates from cells stimulated with a synthetic double-stranded RNA-mimicking agent, poly(I:C), which signals via TLR3 [27]. It has been reported that optineurin is constitutively bound to TBK1 [15,23]. We found, however, that only a small fraction of optineurin coimmunoprecipitated with TBK1 in unstimulated HEK293-hTLR3 cells, and that binding greatly increased upon stimulation (Fig. 2B). Moreover, TBK1 bound to optineurin was activated, that is, phosphorylated on S172 (Fig. 2C). Inducible binding was also compared in WT and Optn Δ^{157} BMDM after stimulation with LPS, a TLR4 ligand. Although WT optineurin did not coimmunoprecipitate with TBK1 in unstimulated cells, LPS induced an association that increased over time (Fig. 2D). Optn Δ^{157} did not bind to TBK1 in any situation, confirming that optineurin binding to TBK1 is inducible and contingent on the presence of its N-terminal TBK1-binding region.

The TANK-binding kinase 1 phosphorylates human optineurin on S177 [5]. Although this is thought to be important for autophagy, its relevance in TBK1-mediated signaling events is unclear. We tested if TBK1 association with optineurin via its N-terminus is necessary for this phosphorylation upon TLR-mediated stimulation. LPS stimulation of BMDM resulted in WT optineurin phosphorylation on S187, the murine homolog of S177 (Fig. 2E). In contrast, no optineurin phosphorylation was observed in Optn Δ^{157} cells. Because Optn Δ^{157} is expressed at a lower level than the WT (Fig. 2F), we also loaded threefold more Optn Δ^{157} immunoprecipitate, but still saw no phosphorylation of the truncated form (Fig. 2G). Together, these results demonstrate that optineurin binds to TBK1 in an inducible manner, and that the N-terminal region of optineurin is required for both TBK1 association and S187 phosphorylation.

The N-terminal region of optineurin is required for TBK1 phosphorylation and IFN- β production

Upon TLR stimulation, TBK1 is activated by phosphorylation at S172, and subsequently phosphorylates

the transcription factor IRF3, which is essential for IFN- β production [22]. To test the importance of N-terminal region of optineurin for TBK1 activation, phosphorylation of TBK1 at S172 was determined. Stimulation with LPS induced phosphorylation of TBK1 in WT BMDM that peaked at 30 min to 1 h and waned thereafter (Fig. 3A). TBK1 was phosphorylated to a lesser extent in Optn Δ^{157} cells. We next examined substrates of TBK1 in the TLR3/4 signaling cascades. IRF3 phosphorylation was detectable 30 min after LPS stimulation in WT BMDM, peaked at 1 h, and decreased thereafter (Fig. 3B). Phosphorylation of IRF3 in Optn Δ^{157} BMDM was markedly reduced compared to WT cells. A similar reduction of IRF3 phosphorylation in Optn Δ^{157} BMDM was observed after poly(I:C) treatment (Fig. 3C). Thus, TLR-induced TBK1 and IRF3 activation were compromised in BMDM in which an interaction between optineurin and TBK1 is precluded.

The TANK-binding kinase 1-mediated IRF3 phosphorylation is crucial for IFN- β production in response to pathogens. BMDM were LPS and poly(I:C) treated and IFN- β secretion was monitored. In both cases, IFN- β production was diminished in Optn Δ^{157} cells (Fig. 3D,E). To test the importance of optineurin in a viral model *in vivo*, WT and Optn Δ^{157} mice were infected with Vesicular Stomatitis Virus (VSV). Again, the IFN- β measured in the sera was decreased in Optn Δ^{157} mice (Fig. 3F). These data argue that TBK1:optineurin association is required for optimal IFN- β responses, and confirm that optineurin is a positive regulator of TBK1 both *in vitro* and *in vivo*.

Several reports found reduced activation of NF- κ B upon optineurin overexpression, suggesting that it acts as a negative regulator [2,3]. However, enhanced NF- κ B activation was not found in the genetic models of optineurin insufficiency or deficiency [4,23,28]. To test if Optn Δ^{157} mitigated the activation of NF- κ B, we stimulated BMDM with LPS or poly(I:C) and monitored proximal and distal signaling events. A similar pattern of I κ B degradation was observed in both WT and Optn Δ^{157} cells for both stimuli (Fig. S1A,B), and the NF- κ B-regulated cytokine IL-6 was equally produced (Fig. S1C,D). These results argue that Optn Δ^{157} does not interfere with LPS and poly(I:C) mediated NF- κ B activation. Taken together, the optineurin N-terminus is dispensable for NF- κ B pathway but necessary for optimal TBK1 activity and IFN- β production.

Discussion

Optineurin has been proposed to bind to TBK1 and regulate its kinase activity. However, the outcome of

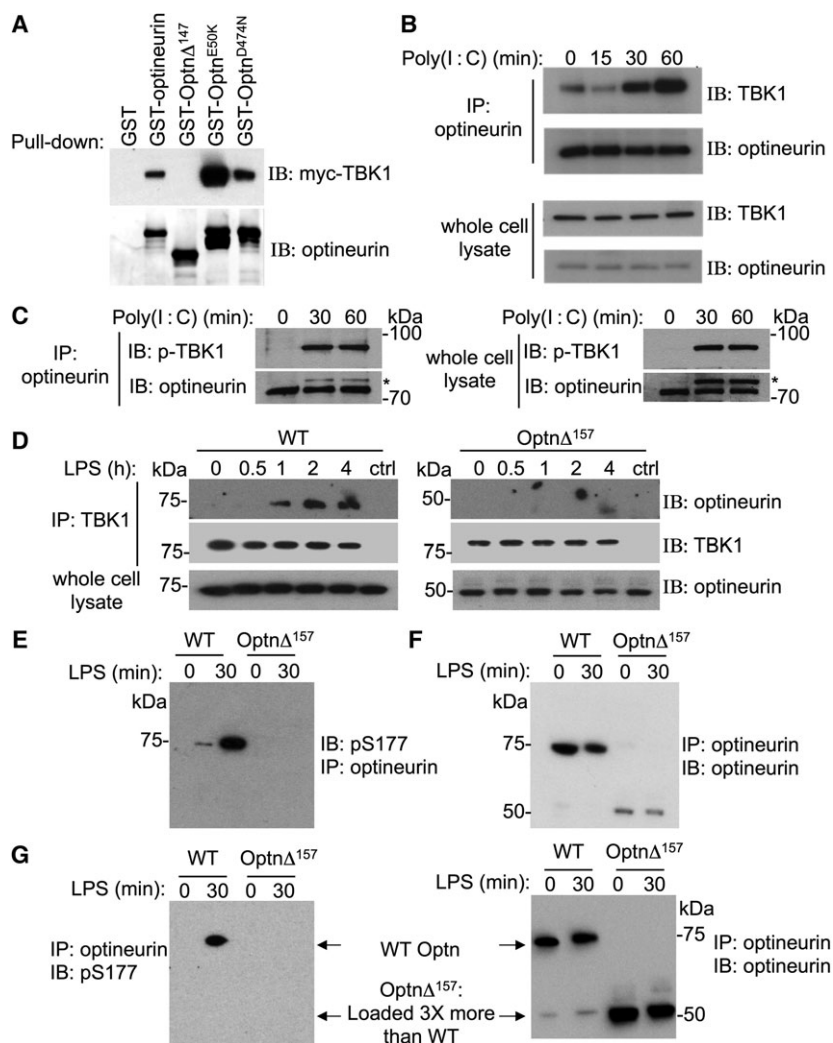


Fig. 2. The N-terminus of optineurin is important for TBK1 binding. (A) Lysates of HEK293 cells overexpressing myc-TBK1 were incubated with purified GST fusion proteins containing WT optineurin or the indicated mutants. Bound proteins were subjected to immunoblotting using anti-myc and anti-optineurin antibodies. One of three experiments is shown. (B) Lysates of HEK293-hTLR3 cells were stimulated with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of poly(I:C) for indicated times and were immunoprecipitated with anti-optineurin. The immunoprecipitate and the whole-cell lysate were resolved on SDS/PAGE and immunoblotted with anti-TBK1 and anti-optineurin antibodies. (C) HEK293-hTLR3 cells were stimulated with 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of poly(I:C) for the indicated times and an immunoprecipitation was performed with an anti-optineurin antibody. Immunoprecipitates (left) and whole-cell lysates (right) were blotted for phospho-TBK1 and optineurin; one representative experiment out of two is shown. *Designates phospho-TBK1 signal from the previous blot. (D) BMDM from WT and Optn Δ ¹⁵⁷ mice were stimulated with LPS for the indicated times and cells lysates were immunoprecipitated with anti-TBK1. Bound proteins were resolved on SDS/PAGE and immunoblotted using anti-optineurin and anti-TBK1 antibodies, respectively. (E) and (F) BMDMs were stimulated with LPS for 30 min and the lysates were immunoprecipitated using anti-optineurin antibody. Bound proteins were subjected to SDS/PAGE and immunoblotted either with anti-phosphoS177 that recognizes phosphorylation of mouse optineurin at residue S187 (left panel), or anti-optineurin antibody (right panel). (G) Optineurin immunoprecipitates shown in (E) and (F), were loaded to SDS/PAGE gels in ratio of K1:WT lysate as 3:1. Membranes were immunoblotted as indicated above. All experiments were done 3 or more times, and a representative blot is shown.

this interaction remains controversial. Here, we found that in primary cells N-terminal-truncated optineurin, Optn Δ ¹⁵⁷, was unable to bind to TBK1, resulting in diminished TBK1 and IRF3 activity and IFN- β secretion. Although because Optn Δ ¹⁵⁷ was present at a 1.5 lower levels, we cannot formally exclude the possibility

that lower level of the truncated product contributed to the impaired IFN- β response, we believe that this relatively mild optineurin deficiency could not by itself explain the complete lack of PAMP-induced inducible TBK1 binding to Optn Δ ¹⁵⁷ and subsequent lack of optineurin phosphorylation. Our data contrast several

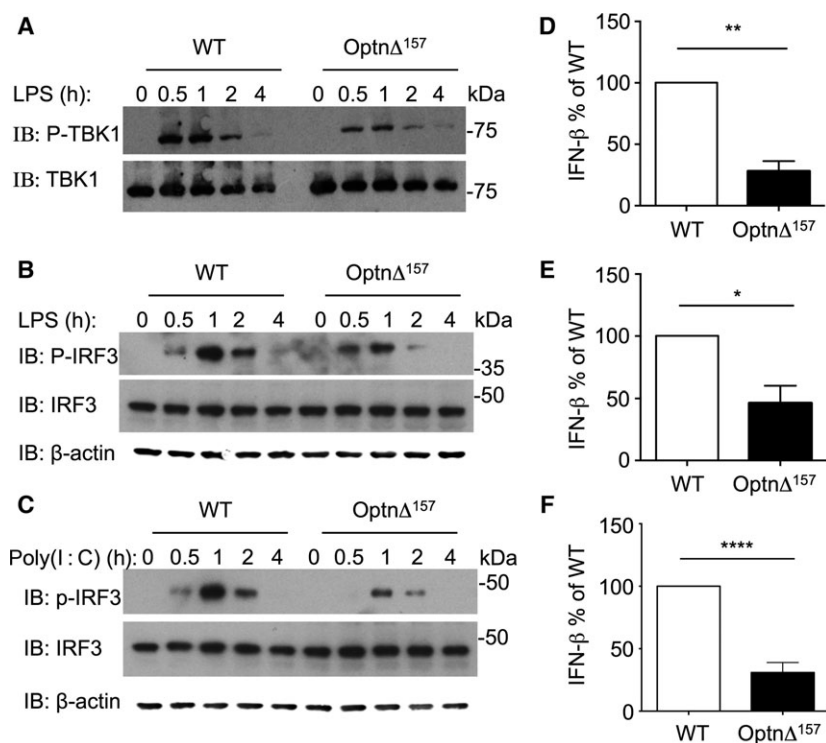


Fig. 3. The N-terminus of optineurin is important for TBK1 phosphorylation and IFN- β secretion. (A) BMDMs from WT and Optn Δ^{157} mice were stimulated with LPS for the indicated times and cell extracts were subjected to immunoblotting using anti-phospho-TBK1 (upper panel), stripped, and reprobbed with an antibody recognizing total TBK1 (lower panel). (B) Lysates from (A) were immunoblotted with anti-phospho-IRF3 antibody (upper panel), stripped, and reprobbed with an antibody recognizing total IRF3 (middle panel). Immunoblot with β -actin antibody as loading control is shown for A and B. (C) BMDMs from WT and Optn Δ^{157} mice were stimulated with poly(I:C) and cell lysates immunoblotted with anti-phospho-IRF3 antibody (upper panel), stripped, and reprobbed with an antibody recognizing total IRF3 (middle panel) or β -actin (lower panel). For A–C the experiments were done three or more times and the representative blot is shown. WT and Optn Δ^{157} mice were treated with 100 ng·mL $^{-1}$ LPS (D), 30 μ g·mL $^{-1}$ poly(I:C) (E), and IFN- β was measured in supernatants after 7 h of stimulation. The results from three separate experiments were normalized to WT IFN- β levels. (F) WT and Optn Δ^{157} mice were infected with VSV 1×10^{10} pfu for 16 h and IFN- β was measured in the sera. Sera were taken from at least seven mice per genotype from two separate experiments, and the results were normalized as in E. The average IFN- β from two experiments was 173 pg·mL $^{-1}$ and 61/4 in WT, and 41.6 and 12.5 pg·mL $^{-1}$ in Optn Δ^{157} mice. The data represent mean \pm SE measured. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

reports in HEK293 and HeLa cell lines, one of which proposed that optineurin recruits the CYLD deubiquitinase to TBK1 in a cell-cycle-dependent manner to shut down TBK1 activity [15,24,29]. We speculate that the reason for this discrepancy lies in the cell lines used and/or the fact that these studies were limited to overexpression or silencing. In addition, given that optineurin has been shown to interact to a large number of cellular proteins and its levels increase upon cell stimulation, it is also possible that it participates in additional regulatory pathways, and its activity is different at different times after stimulation. Our results, however, strongly support the findings of two other genetic models of optineurin insufficiency (Optn D477N and Optn 470T) [4,23]. Moreover, while this article was in preparation, another study found diminished TBK1 activity and IFN- β production in an optineurin

knockout model [28]. Together these results strongly argue that optineurin is positive regulator of TBK1-mediated IFN- β responses. Although it is formally possible that Optn Δ^{157} acts as a dominant-negative protein, we find it unlikely because pull-down assays showed that this truncation does not bind to TBK1, and more importantly, Optn Δ^{157} cells exhibited a similar loss of TBK1 activity upon PAMP stimulation as did other optineurin insufficiency models.

Most mutations described in ALS patients either lack the C-terminal domain or harbor mutations in the ubiquitin-binding region, but the mechanism of their noxious effect is still debated [2,30]. The finding that both N-terminal and C-terminal optineurin insufficiency together with the knockout model had diminished TBK1 activity argues that optineurin mutations found in human ALS patients result in loss-of-function

rather than gain-of-function due to dominant-negative activity. Further elucidation of the role of optineurin in ALS pathogenesis, currently ongoing in our laboratory, will show if this is directly linked to suboptimal TBK1 activity and/or IFN- β production, and perhaps leads to neuroinflammation, a major driving force in ALS. Of note, neither young Optn Δ^{157} nor Optn Δ^{470T} mice develop signs of motor neuron degeneration (up to 1 year of life; I. Munitic & J. D. Ashwell, unpublished observations), which is perhaps expected given the fact that ALS neurodegeneration is multifactorial, usually occurs late in life, and optineurin likely only has a protective role, as discussed here.

The N-terminus of optineurin was shown to bind TBK1 *in vitro* using recombinant GST fusion products [25]. Here, we have extended this finding to show the *in vivo* relevance of this interaction in TBK1 activation. The proposed binding site can likely be narrowed to amino acids 78–121 in human optineurin, which are highly homologous to the TBK1-binding sites of three other TBK1 adaptor proteins, namely TANK, NAP1, SINTBAD, all of which have also been implicated in IRF3 and NF- κ B activation. However, it was suggested that optineurin binding to TBK1 is constitutive and independent of ubiquitination [15,23]. This is at odds with the proposed dynamic regulation of TBK1, in which PAMP stimulation results in the recruitment of inactive TBK1 to signalosomes via adaptor proteins, leading to its high local concentration and activation by transautophosphorylation [21]. Moreover, K63-linked polyubiquitination of TBK1 on lysines 30 and 401 is a prerequisite for its activation and optineurin, unlike the adaptors SINTBAD and NAP1, has an ubiquitin-binding region [22,31]. Consistent with this, we found that in HEK293-hTLR3 cells and primary bone marrow macrophages, WT optineurin bound inducibly to TBK1 upon TLR stimulation and was phosphorylated on S187. Inducible binding suggests that the optineurin scaffolding function precedes TBK1 recruitment to signalosomes. We also demonstrate that the TBK1 associated with optineurin is phosphorylated at S172. In contrast, Optn Δ^{157} was unable to bind to TBK1, was not phosphorylated on S187, and led to reduced TBK1 activation. Together with a published report on the role of the ubiquitin-binding region in the optineurin C-terminus [23], current findings suggest that neither the N-terminus nor the ubiquitin-binding regions alone are sufficient for stimulus-triggered binding, thus arguing for a bipartite-binding model between TBK1 and optineurin: the interaction with N-terminus of optineurin is further strengthened upon TBK1 polyubiquitination. It is possible that this bipartite interaction allows a positive

feedback mechanism between those two proteins, as recently proposed during mitophagy, whereby the phosphorylation of optineurin by TBK1 on S473 and S513 increases its binding to ubiquitinated mitochondria, which in turn further amplifies TBK1 activation [32]. The optineurin scaffolding function is further characterized in our submitted manuscript, where we show that virus-induced TBK1 polyubiquitination on lysines 30 and 401 targets TBK1 to optineurin at the Golgi apparatus (Pourcelot *et al.*).

Both TBK1 and optineurin are multifunctional proteins. Interestingly, they form a functional unit not just in TLR signaling, but also during autophagy. Optineurin becomes an efficient autophagy adaptor when phosphorylated by TBK1 on S177 (or murine S187); it subsequently bridges LC3-coated autophagosomal membranes to autophagy targets, such as ubiquitinated cytosolic Salmonella, protein aggregates, or damaged mitochondria [5,32–35]. Notably, TBK1 mutants that cannot bind optineurin were also recently found in ALS patients, and the preliminary data suggest that they cause functional impairment of TBK1 in autophagy, rather than in signaling [36,37]. In line with this, it was recently described that PINK1/parkin-mediated ubiquitination of damaged mitochondria leads to optineurin recruitment and TBK1-mediated optineurin S177 phosphorylation, consequently leading to LC3 recruitment and mitophagy [32,34,35]. It is unclear if there is a direct crosstalk between autophagy or mitophagy and the pathways leading to IFN- β secretion and/or whether some of the resources, such as optineurin itself, are limited. It is also possible that the two events are spatially and/or temporally dissociated, and that inducible optineurin binding serves to distinguish between these different cellular events. Notably, S177 phosphorylation of optineurin by another kinase, Polo-like kinase 1 (Plk1), causes dissociation of optineurin from Golgi-associated Rab8, allowing its nuclear translocation and association with myosin phosphatase-targeting subunit 1 (MYPT1), which then antagonizes Plk1 activity and permits cell division [9]. It is thus likely that other regulatory mechanisms are in place to efficiently transduce specific signals from the shared pool of optineurin, which can apparently even harbor similar post-translational modifications when exerting different functions. Other reported post-translational modifications of optineurin might contribute. A tumor suppressor ubiquitin ligase HACE-1 was shown to add K48-polyubiquitin to optineurin, prompting its association with another autophagy adaptor p62/SQSTM1, accelerating autophagy flux [38]. Notably, the bipartite interaction of optineurin to TBK1, via both N-terminus and ubiquitin

binding, is likely one of such specificity-ensuring mechanisms. Overall, the finding that TBK1 interaction to optineurin is inducible, and dependent on N-terminus, perhaps makes the inhibition of this interaction an interesting target in overactive TBK1-mediated responses such as in autoimmune disease or cancer.

Acknowledgements

We are grateful to Lino Tessarollo and Eileen Southon (Mouse Cancer Genetics Program, NCI-Frederick, Frederick, MD) for assistance during generation of Optn Δ^{157} mice, Dr. Ivan Dikic for anti-phospho-S177 optineurin antibody, and Ehydel Castro and Bei Dong for expert technical assistance. This work was supported by the Intramural Research Program of the Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, the Croatian Science Foundation grant #7459 and the support of the University of Rijeka to IM, grants from Fondation ARC (Association pour La Recherche contre le Cancer) and the ANRS (Agence Nationale pour la Recherche sur le SIDA) to DA, and fellowship to MP from Université Paris-Sud.

Author contributions

NPM, GZ, MLGT, PRM and DA performed experiments, analyzed data and participated in drafting the manuscript; MP performed experiments; JDA and IM designed and supervised the study, analyzed data and wrote the manuscript.

References

- 1 Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, Miller L, Coca-Prados M, Heon E, Krupin T, Ritch R, Kreutzer D *et al.* (2002) Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* **295**, 1077–1079.
- 2 Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H *et al.* (2010) Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **465**, 223–226.
- 3 Zhu G, Wu CJ, Zhao Y and Ashwell JD (2007) Optineurin negatively regulates TNF α -induced NF- κ B activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP. *Curr Biol* **17**, 1438–1443.
- 4 Munitic I, Giardino Torchia ML, Meena NP, Zhu G, Li CC and Ashwell JD (2013) Optineurin insufficiency impairs IRF3 but not NF- κ B activation in immune cells. *J Immunol* **191**, 6231–6240.
- 5 Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov VV, Brady NR, Richter B, Korac J, Waidmann O, Choudhary C *et al.* (2011) Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* **333**, 228–233.
- 6 Tumbarello DA, Waxse BJ, Arden SD, Bright NA, Kendrick-Jones J and Buss F (2012) Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nat Cell Biol* **14**, 1024–1035.
- 7 Sahlender DA, Roberts RC, Arden SD, Spudich G, Taylor MJ, Luzio JP, Kendrick-Jones J and Buss F (2005) Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J Cell Biol* **169**, 285–295.
- 8 Moreland RJ, Dresser ME, Rodgers JS, Roe BA, Conaway JW, Conaway RC and Hanas JS (2000) Identification of a transcription factor IIIA-interacting protein. *Nucleic Acids Res* **28**, 1986–1993.
- 9 Kachaner D, Filipe J, Laplantine E, Bauch A, Bennett KL, Superti-Furga G, Israel A and Weil R (2012) Plk1-dependent phosphorylation of optineurin provides a negative feedback mechanism for mitotic progression. *Mol Cell* **45**, 553–566.
- 10 Chalasani ML, Swarup G and Balasubramanian D (2009) Optineurin and its mutants: molecules associated with some forms of glaucoma. *Ophthalmic Res* **42**, 176–184.
- 11 Swarup G and Nagabhushana A (2010) Optineurin, a multifunctional protein involved in glaucoma, amyotrophic lateral sclerosis and antiviral signalling. *J Biosci* **35**, 501–505.
- 12 Wagner S, Carpentier I, Rogov V, Kreike M, Ikeda F, Lohr F, Wu CJ, Ashwell JD, Dotsch V, Dikic I *et al.* (2008) Ubiquitin binding mediates the NF- κ B inhibitory potential of ABIN proteins. *Oncogene* **27**, 3739–3745.
- 13 Laplantine E, Fontan E, Chiaravalli J, Lopez T, Lakisic G, Véron M, Agou F and Israël A (2009) NEMO specifically recognizes K63-linked poly-ubiquitin chains through a new bipartite ubiquitin-binding domain. *EMBO J* **28**, 2885–2895.
- 14 Schwamborn K, Weil R, Courtois G, Whiteside ST and Israel A (2000) Phorbol esters and cytokines regulate the expression of the NEMO-related protein, a molecule involved in a NF- κ B-independent pathway. *J Biol Chem* **275**, 22780–22789.
- 15 Mankouri J, Fragkoudis R, Richards KH, Wetherill LF, Harris M, Kohl A, Elliott RM and Macdonald A (2010) Optineurin negatively regulates the induction of IFN β in response to RNA virus infection. *PLoS Pathog* **6**, e1000778.
- 16 Schmidt-Supprian M, Bloch W, Courtois G, Addicks K, Israel A, Rajewsky K and Pasparakis M (2000) NEMO/IKK gamma-deficient mice model incontinentia pigmenti. *Mol Cell* **5**, 981–992.
- 17 Zhao T, Yang L, Sun Q, Arguello M, Ballard DW, Hiscott J and Lin R (2007) The NEMO adaptor bridges

- the nuclear factor-kappaB and interferon regulatory factor signaling pathways. *Nat Immunol* **8**, 592–600.
- 18 McWhirter SM, Fitzgerald KA, Rosains J, Rowe DC, Golenbock DT and Maniatis T (2004) IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 233–238.
 - 19 Hemmi H, Takeuchi O, Sato S, Yamamoto M, Kaisho T, Sanjo H, Kawai T, Hoshino K, Takeda K and Akira S (2004) The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med* **199**, 1641–1650.
 - 20 Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM and Maniatis T (2003) IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* **4**, 491–496.
 - 21 Helgason E, Phung QT and Dueber EC (2013) Recent insights into the complexity of Tank-binding kinase 1 signaling networks: the emerging role of cellular localization in the activation and substrate specificity of TBK1. *FEBS Lett* **587**, 1230–1237.
 - 22 Tu D, Zhu Z, Zhou AY, Yun CH, Lee KE, Toms AV, Li Y, Dunn GP, Chan E, Thai T *et al.* (2013) Structure and ubiquitination-dependent activation of TANK-binding kinase 1. *Cell Rep* **3**, 747–758.
 - 23 Gleason CE, Ordureau A, Gourlay R, Arthur JS and Cohen P (2011) Polyubiquitin binding to optineurin is required for optimal activation of TANK-binding kinase 1 and production of interferon β . *J Biol Chem* **286**, 35663–35674.
 - 24 Genin P, Cuvelier F, Lambin S, Corte-Real Filipe J, Autrusseau E, Laurent C, Laplantine E and Weil R (2015) Optineurin regulates the interferon response in a cell cycle-dependent manner. *PLoS Pathog* **11**, e1004877.
 - 25 Morton S, Hesson L, Peggie M and Cohen P (2008) Enhanced binding of TBK1 by an optineurin mutant that causes a familial form of primary open angle glaucoma. *FEBS Lett* **582**, 997–1002.
 - 26 Liu P, Jenkins NA and Copeland NG (2003) A highly efficient recombining-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res* **13**, 476–484.
 - 27 Marshall-Clarke S, Downes JE, Haga IR, Bowie AG, Borrow P, Pennock JL, Grenis RK and Rothwell P (2007) Polyinosinic acid is a ligand for toll-like receptor 3. *J Biol Chem* **282**, 24759–24766.
 - 28 Slowicka K, Vereecke L, McGuire C, Sze M, Maelfait J, Kolpe A, Saelens X, Beyaert R and van Loo G (2015) Optineurin deficiency in mice is associated with increased sensitivity to Salmonella but does not affect proinflammatory NF- κ B signaling. *Eur J Immunol* **46**, 971–980.
 - 29 Sakaguchi T, Irie T, Kawabata R, Yoshida A, Maruyama H and Kawakami H (2011) Optineurin with amyotrophic lateral sclerosis-related mutations abrogates inhibition of interferon regulatory factor-3 activation. *Neurosci Lett* **505**, 279–281.
 - 30 Millicamps S, Boillee S, Chabrol E, Camu W, Cazeneuve C, Salachas F, Pradat PF, Danel-Brunaud V, Vandenberghe N, Corcia P *et al.* (2011) Screening of OPTN in French familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* **32**, 557.e11–3.
 - 31 Thurston TL, Ryzhakov G, Bloor S, von Muhlinen N and Randow F (2009) The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat Immunol* **10**, 1215–1221.
 - 32 Heo JM, Ordureau A, Paulo JA, Rinehart J and Harper JW (2015) The PINK1-PARKIN mitochondrial ubiquitylation pathway drives a program of OPTN/NDP52 recruitment and TBK1 activation to promote mitophagy. *Mol Cell* **60**, 7–20.
 - 33 Korac J, Schaeffer V, Kovacevic I, Clement AM, Jungblut B, Behl C, Terzic J and Dikic I (2013) Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates. *J Cell Sci* **126**, 580–592.
 - 34 Wong YC and Holzbaur EL (2014) Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, E4439–E4448.
 - 35 Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, Sideris DP, Fogel AI and Youle RJ (2015) The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* **524**, 309–314.
 - 36 Freischmidt A, Wieland T, Richter B, Ruf W, Schaeffer V, Muller K, Marroquin N, Nordin F, Hubers A, Weydt P *et al.* (2015) Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. *Nat Neurosci* **18**, 631–636.
 - 37 Cirulli ET, Lasseigne BN, Petrovski S, Sapp PC, Dion PA, Leblond CS, Couthouis J, Lu YF, Wang Q, Krueger BJ *et al.* (2015) Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science* **347**, 1436–1441.
 - 38 Liu Z, Chen P, Gao H, Gu Y, Yang J, Peng H, Xu X, Wang H, Yang M, Liu X *et al.* (2014) Ubiquitylation of autophagy receptor optineurin by HACE1 activates selective autophagy for tumor suppression. *Cancer Cell* **26**, 106–120.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Fig. S1. The TBK1-binding region is dispensable for NF- κ B activation upon TLR stimulation.

Mitochondrial dynamics and the innate antiviral immune

Pourcelot M, Arnoult D.

The FEBS journal 2014, **281**(17): 3791-3802.

Mitochondrial dynamics and the innate antiviral immune response

Marie Pourcelot^{1,2,3} and Damien Arnoult^{1,2,3}

1 INSERM UMR_S 1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

2 Université Paris-Sud P11, Orsay, France

3 Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Villejuif, France

Keywords

innate immunity; mitochondria;
mitochondrial antiviral signaling protein;
mitochondrial dynamics; retinoic acid-
inducible gene-I (RIG-I)-like receptors

Correspondence

D. Arnoult, INSERM, UMR_S 1014, Hôpital
Paul Brousse, Villejuif 94800, France
Fax: +33 1 45 59 53 43
Tel: + 33 1 45 59 60 38
E-mail: damien.arnoult@inserm.fr

(Received 27 May 2014, revised 27 June
2014, accepted 16 July 2014)

doi:10.1111/febs.12940

The innate immune system has a key role in the mammalian immune response. In the cytosol, RNA viruses are sensed by the retinoic acid-inducible gene-I-like receptors, which trigger a complex signaling cascade in which mitochondrial antiviral signaling protein plays a central role in mediating the innate host response through the induction of antiviral and inflammatory responses. Hence, the mitochondrion is now emerging as a fundamental hub for innate antiviral immunity beyond its known roles in metabolic processes and the control of programmed cell death. This review summarizes the findings related to mitochondrial antiviral signaling protein, and mitochondria and their dynamics, in the innate immune response to RNA viruses.

Introduction

Apoptosis is one of the most ancestral defense mechanisms against viral infections, acting by eliminating the infected cells. Mitochondria are therefore important actors in antiviral immunity [1,2] through their critical role in apoptosis [3]. In the middle of the 2000s, the discovery of the retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors (RLRs) showed much greater involvement of mitochondria in antiviral immunity, as they

are RNA-sensing cytosolic receptors requiring the mitochondrial adaptor mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) to initiate the production of type I interferons (IFNs) and proinflammatory cytokines [4] to act against pathogens. RLRs constitute a class of germline-encoded pattern-recognition receptors (PRRs) such as Toll-like receptors (TLRs), and they directly activate immune cells [5].

Abbreviations

CARD, caspase activation and recruitment domain; Drp1, dynamin-related protein 1; FADD, FAS-associated death domain-containing protein; Fis1, Fis1 mitochondrial fission 1 protein; IFN, interferon; IKK, I κ B kinase; IKKi, inducible I κ B kinase; IRF, interferon regulatory factor; LGP2, laboratory of genetics and physiology 2; MAM, mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membrane; MAVS, mitochondrial antiviral signaling; MDA-5, melanoma differentiation-associated gene-5; MEF, murine embryonic fibroblast; Mff, mitochondrial fission factor; Mfn1, mitofusin-1; Mfn2, mitofusin-2; mROS, mitochondrial reactive oxygen species; NAP1, NAK-associated protein 1; NEMO, nuclear factor- κ B essential modulator; NF- κ B, nuclear factor- κ B; NLR, Nod-like receptor; NOX, NADPH oxidase; OPA1, optic atrophy 1; PRR, pattern-recognition receptor; RIG-I, retinoic acid-inducible gene-I; RIP1, receptor-interacting protein kinase 1; RLR, retinoic acid-inducible gene-I-like receptor; ROS, reactive oxygen species; TAK1, transforming growth factor- β -activated kinase 1; TANK, tumor necrosis factor receptor-associated factor family member-associated nuclear factor- κ B activator; TBK1, tumor necrosis factor receptor-associated factor family member-associated nuclear factor- κ B activator-binding kinase 1; TLR, Toll-like receptor; TM, transmembrane; TRADD, tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain; TRAF, tumor necrosis factor receptor-associated factor.

The RLRs

Following infection, viruses are rapidly sensed by the innate immune system through several classes of PRRs, including TLRs and RLRs, which recognize viral components and directly activate immune cells. After activation, TLRs recruit different adaptor proteins, such as MyD88 and TRIF, leading to downstream signaling cascades and the production of proinflammatory cytokines such as type I IFNs and chemokines [6].

TLR3, TLR7, and TLR8, like other TLRs, are found almost exclusively in intracellular compartments such as endosomes, so that viral RNA that is synthesized in the cytoplasm of the cell or that is present in viral genomes already released into the cells is not accessible to TLRs [6]. Nevertheless, RNA viruses can still be detected in the cytosol through RLRs. There are three members of this family of cytosolic PRRs: RIG-I, melanoma differentiation-associated gene-5 (MDA-5) and laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2). RIG-I and MDA-5 are both prototypical PRR factors, whereas LGP2 has been proposed to function as a regulator of RIG-I and MDA-5 signaling [7].

Two independent studies have reported that the *in vitro* transcribed uncapped 5'-triphosphate end of RNA is the ligand for RIG-I [8,9], whereas ssRNA was initially proposed to be the ligand for RIG-I and MDA-5. In addition to 5'-triphosphate RNA, dsRNA has also been reported to be a ligand of RIG-I and MDA-5 [7,10]. Akira's group have also clarified the nature of the dsRNAs that activate RIG-I and MDA-5, as they have demonstrated that long poly(I:C) molecules [poly(I:C) molecules being analogs of dsRNA] activate MDA-5 but not RIG-I [11]. However, they have also shown that an MDA-5 ligand can be converted into a RIG-I ligand by shortening the length of dsRNA [11]. Interestingly, RNA polymers generated by RNA polymerase III from DNA templates can also be recognized by RIG-I, thus permitting this PRR to indirectly detect dsDNA from intracellular pathogens [12].

RIG-I and MDA-5 are both cytosolic helicases with ATPase activity, and they contain a C-terminal regulatory domain required for binding to viral RNA. Importantly, the N-termini of RIG-I and MDA-5, but not the N-terminus of LGP2, contain two tandem caspase activation and recruitment domains (CARDs) [7]. As a result of binding to their ligands, the ATPase activity of both helicases may be critical not only for translocation along dsRNA [13], but also for conformational changes that lead to the exposure of the

CARDs masked by the C-terminal regulatory domain. In addition to the sensing of specific RNA motifs, conformational changes that relieve the repression induced by the C-terminal regulatory domain are also required to initiate downstream signaling. Indeed, in uninfected cells, RIG-I is maintained in a closed, inactive conformation by intramolecular interactions between the CARD and the C-terminal regulatory domain [7]. After detection of specific 5'-triphosphate panhandle RNA structures, Lys63-linked polyubiquitination of RIG-I is generated by the E3 ubiquitin ligases TRIM25 and RIPLET [14,15]; CARDs are then released from the regulatory domain repression. Recently, by reconstituting the RIG-I pathway in a cell-free system, it was found that an essential step for RIG-I activation is for the RIG-I CARDs to bind to unanchored Lys63 polyubiquitin chains [16]. It was further demonstrated that polyubiquitin binding triggers the formation of an oligomeric complex comprising four RIG-I and four ubiquitin chains, which is a potent activator of the downstream signaling cascades [17]. Significant advances have also been made in understanding the structural mechanism of dsRNA recognition by MDA-5. MDA-5 assembles into a polar filamentous oligomer along dsRNA [18]. ATP hydrolysis controls the stability of the MDA-5 filament, because it triggers dissociation of MDA-5 from dsRNA [18]. The crystal structure of MDA-5 (without CARDs) bound to dsRNA also shows a global domain organization similar to that of RIG-I. However, unlike RIG-I, which forms an O-ring structure with dsRNA, MDA-5 uses an open, C-shaped structure to bind dsRNA [19]. Then, the tandem CARDs oligomerize into a structure capable of triggering the downstream signaling pathway. As for RIG-I, unanchored Lys63 polyubiquitin chains also bind to the CARDs of MDA-5, and this binding is again important, as mutations of conserved residues in MDA-5 that prevent its ubiquitin binding also abrogate MDA-5-mediated signaling [17].

The conformational change in RIG-I or MDA-5 is required for the interaction between the tandem CARDs of the helicases with the CARD of MAVS (also known as CARDIF, IPS-1, or VISA) [20–23], which is inserted into the mitochondrial outer membrane through a transmembrane domain in its C-terminal region [22]. Although this CARD–CARD interaction results in the propagation of downstream signaling leading to antiviral and inflammatory responses, how MAVS plays a central role in controlling the complex events in signal transduction remains poorly elucidated and/or debated. However, an essential role of MAVS in antiviral innate immunity has

been demonstrated by the severely compromised immune defense against RNA virus infections of MAVS-deficient mice, as well as the failure of these mice to produce a proper IFN response to poly(I:C) stimulation [24,25].

MAVS

In *Homo sapiens*, MAVS is a 540-residue protein inserted into the mitochondrial outer membrane. It is encoded in the nuclear genome (not by mtDNA), and has a predicted molecular mass of 75 kDa. Endogenous MAVS extracted from the mitochondrial fraction was found to elute in a high molecular mass fraction corresponding to ~ 600 kDa [26]. Very recently, it was reported that MAVS is expressed from a bicistronic mRNA encoding a second protein called miniMAVS, lacking the CARD domain, and that this truncated variant interferes with IFN production induced by full-length MAVS [27]. MAVS is expressed ubiquitously in a variety of cell types and tissues in mammals [21–23], and some MAVS orthologs have been reported in fish species [28].

In its N-terminal region, MAVS contains a CARD containing six helices: three (H1a, H3, and H4) establish a flat, positively charged surface; and two (H2 and H6) create an acidic, negatively charged surface on the opposite side [29]. Besides its interactions with RIG-I or MDA-5, the CARD of MAVS has been recently demonstrated to be required for the formation of functional prion-like aggregates after viral infection, and these aggregates are involved in the production of type I IFNs as a consequence of the activation of the transcription factor interferon regulatory factor (IRF)3 in the cytoplasm [30,31]. In its C-terminal region, MAVS possesses a single transmembrane (TM)-spanning domain that targets the protein to the mitochondria [22]. Nevertheless, two studies have shown that the subcellular localization of MAVS is not limited to the outer mitochondrial membrane. Indeed, Dixit *et al.* have demonstrated that a small pool of MAVS is also localized in the membranes of peroxisome, a metabolic organelle, and that the peroxisomal MAVS is engaged in the early induction of IFN-stimulated genes, such as that encoding viperin, before the mitochondrial MAVS generates a persistent antiviral response [32]. Furthermore, another group has reported MAVS in mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs) [33]. As mitochondria, peroxisomes and endoplasmic reticulum are interrelated and interdependent in cellular metabolism, this explains why the multicellular localization of MAVS is debated. Finally, in addition to its CARD and TM domains, MAVS con-

tains another functional domain, a proline-rich region, which is involved in downstream signaling via its interaction with the tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family, including TRAF2, TRAF3, TRAF5, and TRAF6 (see below) [22,23,34,35].

MAVS activation initiates the recruitment of an intricate interactome to transduce the signaling. Indeed, up to now, > 30 partners have been reported to interact with MAVS [36]. MAVS-interacting proteins can therefore be classified into different categories that either positively or negatively regulate various pathways and biological processes. First, there are proteins involved in antiviral [inducible I κ B kinase (IKKi), IRF3, IRF7, nuclear factor- κ B (NF- κ B) essential modulator (NEMO), STING, TRAF3, TRAF5, and WDR5] or inflammatory [I κ B kinase (IKK) α/β , Nod-like receptor (NLR)C5, NLRP3, NLRX1, transforming growth factor- β -activated kinase 1 (TAK1), TRAF2, TRAF5, and TRAF6] responses, but MAVS has also been reported to interact with mitochondrial proteins [mitofusin-1 (Mfn1)/mitofusin-2 (Mfn2), Tom70, and voltage-dependent anion channel 1], proteins involved in cell death [FAS-associated death domain-containing protein (FADD), receptor-interacting protein kinase 1 (RIP1), SARM1, and tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain (TRADD)] or autophagy (Atg5–Atg12), and with other helicases (DHX15, DHX29, DHX33, and DDX3), protein kinases (c-Abl, c-Src, focal adhesion kinase, IKKi, and PLK1) or E3 ubiquitin ligases (PCBP2/AIP4, RNF5, RNF125, Smurf2, and TRIM25) that promote MAVS post-translational modifications [36–44]. Although the physiological significance of many of these protein interactions remains to be clarified, several key proteins are involved in the canonical RLR pathway, and, once activated, MAVS is supposed to form a signaling platform where the recruitment of TRAFs triggers the antiviral and inflammatory response [5,34].

Hence, after the association of MAVS with RIG-I or MDA-5, MAVS was shown to associate with the E3 ubiquitin ligase TRAF3, which assembles Lys63-linked polyubiquitin chains through its C-terminal TRAF domain [35]. Importantly, the production of type I IFNs in response to virus infection is severely reduced in TRAF3-deficient cells [45]. TRAF3 in complex with NEMO [46], TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK) [47] and NAK-associated protein 1 (NAP1) [48] regulates the activity of two ‘noncanonical’ IKK-related kinases, designated TANK-binding kinase 1 (TBK1) and IKKi, which phosphorylate and activate the transcription factors

IRF3 and IRF7 (Fig. 1). After their phosphorylation by these kinases, IRF3 and IRF7 form homodimers and/or heterodimers, and they translocate into the nucleus, where they bind to IFN-stimulated response elements, thereby leading to the expression of type I IFN genes and a set of IFN-inducible genes. MAVS has also been reported to bind the endoplasmic reticulum-resident protein STING [49], a protein with a crucial role in TBK1 activation in the cytosolic DNA

sensing pathway [50], but a role of STING in RLR signaling is now debated, as STING-deficient cells do not seem to have any obvious defects following RLR activation [50].

An elegant study has revealed a key role of ubiquitin chains in IRF3 activation downstream of MAVS [51]. Indeed, the authors found that NEMO is required for IRF3 activation by MAVS, because NEMO functions as a sensor of Lys63 polyubiquitin chains to

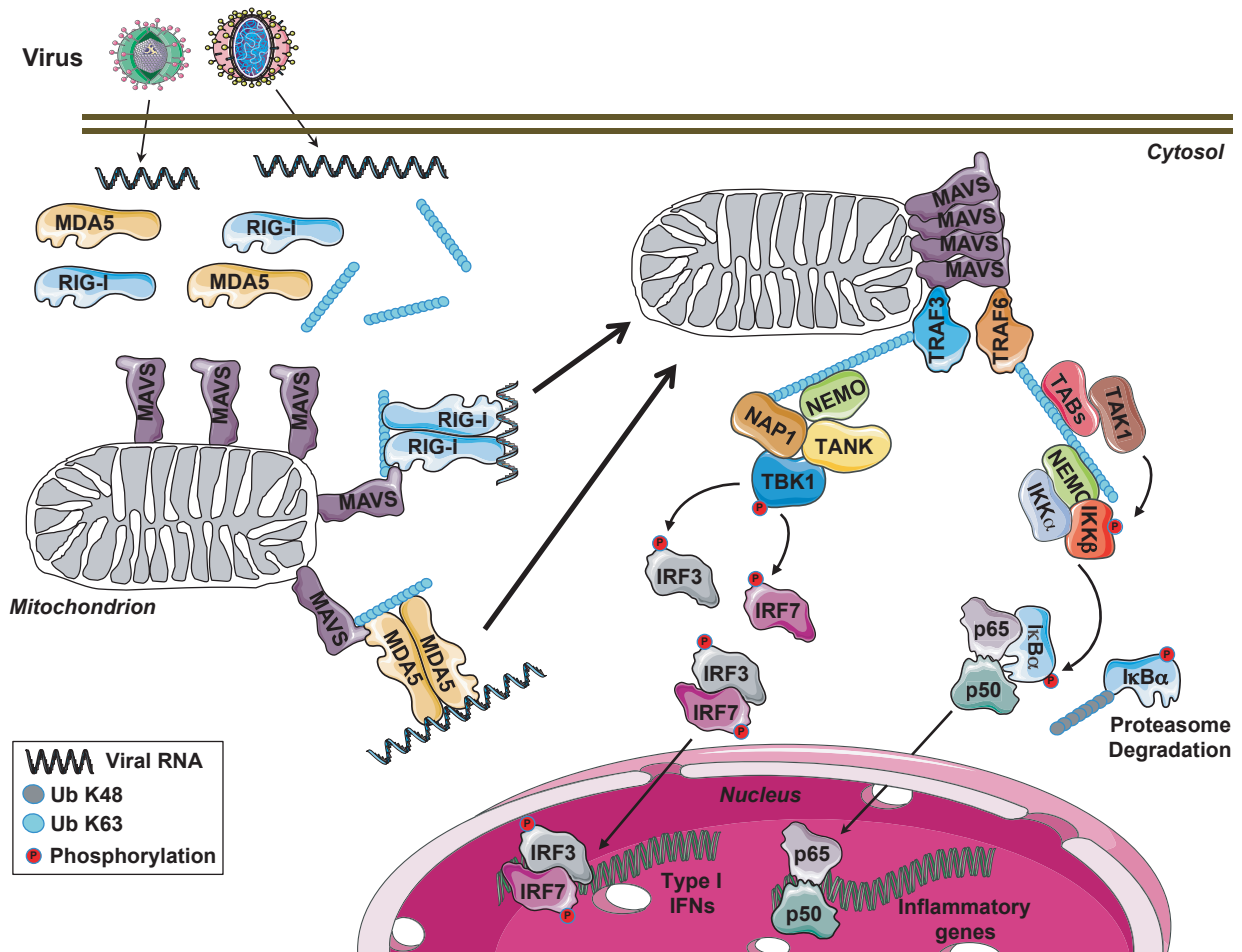


Fig. 1. Overview of the RLR pathway and the involvement of ubiquitination. In the cytosol, viral RNAs are recognized by the helicases RIG-I or MDA-5, according to their size. Then, the helicases undergo conformational changes and, in the case of RIG-I, the E3 ubiquitin ligases TRIM25 and RIPLET promote its Lys63 ubiquitination. Moreover, RIG-I or MDA-5 CARDS bind to unanchored Lys63 polyubiquitin chains, and this binding is essential for the activation of both helicases. Next, the N-terminus of RIG-I or MDA-5 containing two CARDS interacts with the CARD of the mitochondrial adaptor MAVS. MAVS then forms prion-like aggregates. After recruitment of the transactivator TRAF6 and its Lys63 polyubiquitination, fixation of the transforming growth factor- β -activated kinase 1-binding protein (TAB)-TAK1 complex on the ubiquitin chains allows the activation of ubiquitin-associated IKK after the TAK1-mediated phosphorylation of IKK β . Activated IKK then phosphorylates I κ B α , leading to its proteasomal-mediated degradation and the release of NF- κ B, resulting in the expression of proinflammatory cytokines. In parallel, the recruitment of TRAF3 or an unidentified E3 ubiquitin ligase allows recruitment on the Lys63 polyubiquitin chains of a complex composed at least of the kinase TBK1, TANK, NAP1, and NEMO, with NEMO functioning as a sensor of Lys63 polyubiquitin chains for the activation of TBK1, which, in turn, promotes the phosphorylation and dimerization of the transcription factors IRF3 and IRF7 for the expression of type I IFNs. Please note that, owing to lack of space, it is not shown that the promoters of type I IFNs also contain NF- κ B-binding sites. Ub, ubiquitin. [Figure 1 was replaced on 26 August 2014 after original online publication].

activate TBK1 through its ubiquitin-binding domains. In this paradigm, a central question is the identity of the E3 ubiquitin ligase(s) that promotes IRF3 activation by MAVS. A candidate is TRAF3, because this E3 ubiquitin ligase has been reported to be crucial for type I IFN production by RLRs [35,45]. Nevertheless, in some models, the loss of TRAF3 did not inhibit IRF3 activation, suggesting that other E3 ubiquitin ligases can counterbalance the loss of TRAF3 [51]. Accordingly, a remarkable study has reported that MAVS polymers recruit several TRAFs, including TRAF2, TRAF5, and TRAF6, through distinct TRAF-binding motifs [34]. Mutations of these motifs that disrupt MAVS binding to TRAFs abrogate its ability to activate IRF3. IRF3 activation is also impaired in cells lacking TRAF2, TRAF5, and TRAF6. These TRAFs promote ubiquitination reactions that recruit NEMO to the MAVS signalosome, orchestrating the activation of TBK1 and of the IKK complex [34] (Fig. 1).

This is in agreement with initial studies where, in co-immunoprecipitation experiments, MAVS was found to interact with TRAF6 [22,23], and this E3 ubiquitin ligase assembles Lys63-linked polyubiquitin chains on which a complex formed by TAK1, TAK1-binding protein 2 and TAK1-binding protein 3 directs NF- κ B activation after recruitment and activation of the IKK complex [52] (Fig. 1). In addition, FADD was discovered in a complex with MAVS [20], and a FADD/caspase-8-dependent pathway has been proposed to be necessary for the activation of NF- κ B downstream of MAVS [53], given that FADD^{-/-} cells are defective in cytokine production [54]. Furthermore, a role for TRADD in the RLR pathway was revealed [55]. Indeed, it was demonstrated that TRADD, a crucial adaptor of tumor necrosis factor receptor I, is recruited to MAVS, and regulates the formation of complexes with TRAF3 and TANK, as well as with FADD and RIP1, leading to the activation of IRF3 and NF- κ B. In agreement with this, TRADD-deficient cells show reduced production of type I IFNs in response to RNA viruses [55]. Nevertheless, recent studies have challenged the involvement of caspase-8, FADD, TRADD and RIP1 in MAVS-mediated signaling [56], as the requirement for caspase-8 (and probably also FADD) in immune cell proliferation is defined by the suppression of receptor-interacting protein kinase 3, a kinase that triggers an alternative form of cell death called programmed necrosis. Finally, whereas RIG-I-mediated activation of NF- κ B requires MAVS (Fig. 1), but also probably a complex involving the adaptor proteins CARD9 and Bcl-10 [57], RIG-I has also been reported to bind to the adaptor protein

apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD to trigger caspase-1-dependent inflammasome activation through a mechanism independent of MAVS, CARD9, and NLRP3, suggesting that RIG-I can also activate the inflammasome in response to RNA viruses [57].

Mitochondrial dynamics govern antiviral signaling

Recently, several studies have implicated mitochondrial dynamics in the regulation of RLR signaling, introducing a new layer of complexity to mitochondrial antiviral immune responses. Mitochondria are dynamic organelles that continuously fuse, divide, and move. Mammalian cells maintain the overall shape of their mitochondria by balancing the opposing processes of mitochondrial fission and fusion. Therefore, unbalanced fusion results in mitochondrial elongation, whereas unbalanced fission triggers fragmentation of the mitochondrial network. For mitochondrial fission, at least three proteins – dynamin-related protein 1 (Drp1), Fis1 mitochondrial fission 1 protein (Fis1), and mitochondrial fission factor (Mff) – are required in mammals [58–60]. Drp1 is largely localized in the cytosol, but a fraction forms puncta on mitochondria [61]. Drp1 contains a dynamin-like central domain and a C-terminal GTPase effector domain in addition to its N-terminal GTPase domain. Intramolecular interactions between the GTPase domain and the GTPase effector domain seem to be required for full GTPase efficiency and mitochondrial fission [62]. Nonetheless, intermolecular oligomerization is also supposed to be necessary, as is thought to be the case for dynamins. Finally, Drp1 has been proposed to couple GTP hydrolysis with mitochondrial membrane constriction and subsequent fission, on the basis of its similarities with dynamins [61].

How Drp1 is recruited to mitochondria to trigger fission has been debated. First, one possibility as a mitochondrial receptor is Fis1, a protein with a TM domain that is anchored into the mitochondrial outer membrane through its C-terminal region [58]. A weak interaction between recombinant Fis1 and Drp1 has been reported [63], but this association between endogenous proteins remains to be confirmed in cells. Indeed, knockdown of Fis1 with RNA interference does not prevent the localization of Drp1 to mitochondria [64]. Recently, as an alternative/complementary dynamin receptor required for mitochondrial fission, Mff was discovered [59]. Mff is a mitochondrion-associated protein, and its silencing releases the Drp1 foci from the mitochondrial outer membrane, accompanied

by network lengthening, whereas Mff overexpression stimulates mitochondrial recruitment of Drp1 accompanied by mitochondrial fission, and Mff and Drp1 physically interact [59].

Mfn1, Mfn2 and optic atrophy 1 (OPA1) constitute the mitochondrial fusion machinery [65,66]. These proteins are large integral membrane GTPases localized to mitochondria. Although it is still debated [67], Mfn2 has also been proposed to be involved in the tethering between the endoplasmic reticulum and mitochondria [68]. Mfn1 and Mfn2 are anchored into the outer membrane with the N-terminal GTPase domain and a predicted coiled coil protruding into the cytosol [69], allowing them to homodimerize or to heterodimerize [65]. OPA1 also has two predicted coiled-coil domains, and at least eight splicing isoforms have been reported [70]. Nevertheless, unlike Mfn1 and Mfn2, OPA1 resides in the intermembrane space, with pools that are either soluble or tightly associated with the inner membrane [71]. OPA1 has been shown to require Mfn1 to promote fusion [72], so OPA1 and mitofusins are thought to work together to promote mitochondrial fusion. OPA1 has also been proposed to form oligomers involved in the regulation of mitochondrial cristae morphology and the complete release of cytochrome *c* during apoptosis [66,71,73].

As mentioned at the beginning of this section, several recent studies have implicated mitochondrial dynamics in the regulation of RLR signaling. First, Mfn2 was shown to constitutively interact with MAVS in high molecular mass complexes and therefore inhibit RLR signaling [26]. Overexpression of Mfn2 blocks NF- κ B and IRF3 activation downstream of RIG-I, MDA-5, and MAVS, whereas Mfn2^{-/-} murine embryonic fibroblasts (MEFs) show improved MAVS signaling and produce considerably more IFN- β following viral infection [26]. Interestingly, manipulation of Mfn1 expression levels does not yield similar phenotypes, suggesting that Mfn2 has a unique role in regulating MAVS signaling independently of its function in mitochondrial fusion. However, two additional reports have demonstrated a role for mitochondrial dynamics in antiviral responses, and have implicated Mfn1 in RLR signaling. Indeed, it was reported that MAVS interacts with Mfn1, and that mitochondrial fusion is required for efficient RLR signaling, as inhibition of fusion by silencing Mfn1 or OPA1 decreases virus-induced NF- κ B and IRF3 activation [74]. Conversely, cells depleted of Drp1 or of Fis1 show elongated mitochondrial networks and increased RLR signaling. This study further showed that RLR activation promotes elongation of the mitochondrial network, and that elongated mitochondria promote mitochondrion–endoplasmic retic-

ulum interactions during viral infection, enhancing the association of MAVS with STING to augment RLR signaling [74] (Fig. 2), in agreement with the demonstration that the major site of MAVS signaling is the MAM, a distinct membrane compartment that links the endoplasmic reticulum to mitochondria [33]. Because a pool of Mfn2 is also found in the MAM [68], Mfn2 may inhibit MAVS in this membrane compartment.

Fujita *et al.* have also observed an interaction between MAVS and Mfn1, and have reported that Mfn1 is required for efficient RLR signaling [75]. Indeed, they have reported that RIG-I localizes around centers of viral replication that contain nucleocapsid proteins and RNA, and that this leads to the recruitment of MAVS-enriched mitochondria and subsequent downstream signaling. Importantly, this process involves Mfn1, further implicating mitochondrial fusion as a necessary event in MAVS-mediated signaling. Concomitantly with phosphorylation of both IRF3 and I κ B α after RLR activation, the main 75-kDa isoform of MAVS is degraded while the shorter ‘miniMAVS’ form (see above) remains unaffected [42]; this degradation may release Mfn1 bound to MAVS, thus allowing Mfn1 to promote the mitochondrial fusion/elongation that is observed when RLRs are activated [74]. In such a scenario, MAVS would then function as a regulator of Mfn1 function.

Viruses have evolved strategies to interfere with antiviral signaling pathways [76,77]. Fusion of the mitochondrial network seems to be required to enhance both RLR signaling and NF- κ B activation [74,78]. Interestingly, expression of vMIA, a cytomegalovirus antiapoptotic protein that promotes fragmentation of the mitochondrial network [79,80], impedes signaling downstream from MAVS [74], suggesting a possible new immune modulation strategy of cytomegalovirus that is required for its replication and pathogenesis *in vivo*. It therefore appears that some viruses may subvert innate immunity by expressing proteins that generate changes in mitochondrial morphology to hamper signaling downstream of MAVS. In agreement with this, hepatitis C virus or alphavirus infections have been reported to promote fission of the mitochondrial network [81,82].

A recent study has demonstrated that mitofusin-deficient MEFs (both Mfn1^{-/-} and Mfn2^{-/-}), but not cells lacking only one of these proteins, show markedly decreased RLR-dependent antiviral responses. Because of a total absence of mitochondrial fusion, mitofusin-deficient MEFs show heterogeneous mitochondrial membrane potentials, and the authors suggest that this may be responsible for the reduced MAVS signaling

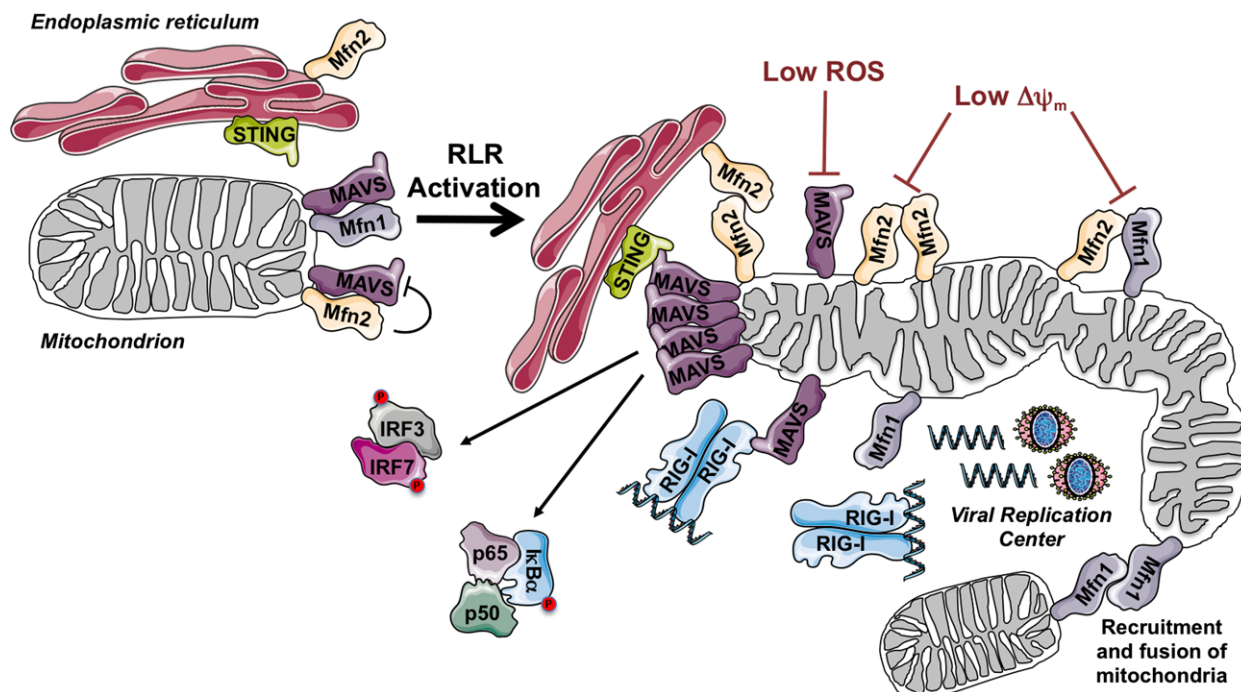


Fig. 2. Mitochondrial dynamics and innate antiviral immunity. In the mitochondrial outer membrane, MAVS interacts with both Mfn1 and Mfn2. Mfn2 is a direct MAVS inhibitor. During infection, mitochondria enriched in RIG-I and MAVS are recruited around centers of viral replication to promote MAVS-mediated signaling, leading to the phosphorylation of both IRF3/IRF7 and I κ B α , which, once degraded, allow NF- κ B activation. This occurs as Mfn1 and Mfn2 induce fusion of the mitochondrial network to increase MAVS interactions with downstream signaling molecules. Mitochondrial mitofusins also interact with endoplasmic reticulum-localized Mfn2, which favors interactions between MAVS and STING at MAMs. A low mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) (which triggers fragmentation of the mitochondrial network) or a decreased ROS level inhibits MAVS-mediated signaling.

observed in these cells [83]. In addition, treatment of cells with chemical uncoupling compounds that decrease mitochondrial membrane potential reduces RLR signaling to NF- κ B and IRF3 and lowers type I IFN production, further implicating robust mitochondrial membrane potential as a necessary component of MAVS signaling [83]. The precise role of mitochondrial membrane potential in MAVS-mediated signaling remains unclear, but it was suggested that a lowering of mitochondrial membrane potential might thwart the structural rearrangement of the MAVS complex, which may exist as a readily available pool on the mitochondrial membrane to provide a quicker response upon viral infection [83]. Importantly, another conclusion of this study is that inhibiting ATP synthesis, the main functional role of mitochondria, does not inhibit MAVS-mediated signaling, excluding the hypothesis that the localization of MAVS at the mitochondrial surface is not attributable to an energetic requirement to transduce the signal.

It appears that the homologous proteins Mfn1 and Mfn2 have opposite roles in viral innate immunity,

although they share a similar function in mitochondrial fusion [84]. As Mfn1 and Mfn2 both engage in homotypic and heterotypic interactions on the mitochondrial outer membrane and/or endoplasmic reticulum (in the case of Mfn2 [68]), associations with their respective partners might ensure fine-tuning of MAVS-mediated signaling, in addition to regulation of mitochondrial fusion. Although there are some discrepancies between the findings discussed above, it is quite apparent that mitofusins interact with MAVS during RLR signaling, and further research should clarify the exact roles of Mfn1 and Mfn2 in this process. Taken together, these studies detail a scenario in which mitochondrial fusion serves to enhance mitochondrion–MAM interactions and RLR–MAVS signalosome formation around intracellular sites of viral infection (Fig. 2).

Mitochondrial reactive oxygen species (mROS) and antiviral signaling

Although reactive oxygen species (ROS) can damage cellular proteins, lipids and nucleic acids via oxidation,

they are also crucial second messengers in various redox-sensitive signaling pathways, and they modulate a number of signaling pathways, including NF- κ B, c-Jun N-terminal kinase, and the caspase-1 inflammasome [85]. The two major sources of cellular ROS are the mitochondria, and the membrane-associated NADPH oxidase (NOX) and dual oxidase complexes. As mitochondria constitute a significant source of ROS in many eukaryotic cells, mROS have been suggested to modulate several signaling pathways [86]. Interestingly, ROS have been implicated as both positive and negative modulators of RLR signaling [87,88]. For instance, it was reported that NOX2 and ROS are required for the host cell to trigger efficient MAVS-mediated antiviral signaling [87]. The authors of this study have also provided evidence that NOX2 is critical for the expression of MAVS, because NOX2 downregulation decreases MAVS mRNA expression without affecting its mitochondrial localization [87].

Autophagy-related gene 5, a crucial regulator of autophagy and mitophagy, can inhibit RLR signaling, and Iwasaki *et al.* have demonstrated that *Atg5*^{-/-} MEFs accumulate dysfunctional mitochondria and show increased mROS levels and improved type I IFN production in response to vesicular stomatitis virus infection [88]. Treatment of *Atg5*^{-/-} MEFs and primary macrophages with antioxidant agents reduces the generation of type I IFNs to wild-type levels, suggesting that abnormal ROS generation potentiates RLR signaling in these cells. Furthermore, augmentation of mROS via exposure of cells to the oxidative phosphorylation complex I inhibitor rotenone increases IFN- β generation in both wild-type and *Atg5*^{-/-} cells [88]. It appears, therefore, that increased RLR signaling and subsequent antiviral responses in *Atg5*^{-/-} MEFs are probably attributable to enhanced mROS generation resulting from accumulation of abnormal or damaged mitochondria in these cells. Furthermore, mROS induction also potentiates RLR signaling in wild-type cells, thus implicating mROS more broadly as important second messengers in RLR–MAVS signaling [88]. Moreover, another study has demonstrated that the cytochrome *c* oxidase complex subunit COX5B directly interacts with MAVS and negatively regulates the ensuing MAVS-mediated antiviral pathway [89]. Mechanistically, whereas MAVS activation leads to increased mROS production and COX5B expression, COX5B downregulates MAVS signaling by limiting mROS production. Importantly, COX5B synchronizes with the autophagy pathway to control MAVS aggregation, thereby balancing the antiviral signaling activity [89].

Additional studies are needed to definitively delineate the mechanisms by which mROS may have a

central role in the regulation of RLR–MAVS signaling during viral infection. It remains unclear which aspects of the RLR pathway are sensitive to mROS, and whether viruses directly manipulate mROS levels during infection to control RLR signaling is still unknown.

Concluding remarks

Although the function of mitochondria in MAVS-mediated antiviral signaling deserves further investigation, because mitochondria are essential for MAVS to operate [22], recent studies have shed light on mitochondrial dynamics, mitochondrial membrane potential and ROS as critical regulators/ effectors of this pathway. With the current knowledge, the mitochondrion appears to be a recruitment platform involved in the RLR antiviral pathway. However, are other mitochondrial proteins required for RLR signaling? Do the mitochondria also serve as a relay to transduce other innate immunity signaling? Indeed, unidentified mitochondrial protein(s) may, like MAVS, serve as a signaling platform for a proper antipathogen response and/or inflammatory response. Future studies should provide answers to some of these interesting questions.

Acknowledgements

We apologize to our colleagues for the studies that are not cited and the fact that several important studies could only be cited indirectly through comprehensive reviews, owing to space and reference number limitations. This work was supported by grants from La Ligue contre le cancer (Equipe Labellisée), l'association pour la recherche contre le cancer (ARC), L'ANRS, and Université Paris Sud XI.

Author contributions

MP and DA wrote the paper.

References

- 1 Arnoult D, Soares F, Tattoli I & Girardin SE (2011) Mitochondria in innate immunity. *EMBO Rep* **12**, 901–910.
- 2 Zemirli N & Arnoult D (2012) Mitochondrial anti-viral immunity. *Int J Biochem Cell Biol* **44**, 1473–1476.
- 3 Tait SW & Green DR (2010) Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 621–632.
- 4 Kawai T & Akira S (2008) Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* **1143**, 1–20.

- 5 Akira S, Uematsu S & Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783–801.
- 6 Akira S & Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499–511.
- 7 Loo YM & Gale M Jr (2011) Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* **34**, 680–692.
- 8 Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M *et al.* (2006) 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994–997.
- 9 Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F & Reis e Sousa C (2006) RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**, 997–1001.
- 10 Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ *et al.* (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101–105.
- 11 Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody TS, Fujita T & Akira S (2008) Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* **205**, 1601–1610.
- 12 Chiu YH, Macmillan JB & Chen ZJ (2009) RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* **138**, 576–591.
- 13 Myong S, Cui S, Cornish PV, Kirchhofer A, Gack MU, Jung JU, Hopfner KP & Ha T (2009) Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA. *Science* **323**, 1070–1074.
- 14 Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S *et al.* (2007) TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* **446**, 916–920.
- 15 Oshiumi H, Miyashita M, Inoue N, Okabe M, Matsumoto M & Seya T (2010) The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell Host Microbe* **8**, 496–509.
- 16 Zeng W, Sun L, Jiang X, Chen X, Hou F, Adhikari A, Xu M & Chen ZJ (2010) Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity. *Cell* **141**, 315–330.
- 17 Jiang X, Kinch LN, Brautigam CA, Chen X, Du F, Grishin NV & Chen ZJ (2012) Ubiquitin-induced oligomerization of the RNA sensors RIG-I and MDA5 activates antiviral innate immune response. *Immunity* **36**, 959–973.
- 18 Peisley A, Lin C, Wu B, Orme-Johnson M, Liu M, Walz T & Hur S (2011) Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 21010–21015.
- 19 Wu B, Peisley A, Richards C, Yao H, Zeng X, Lin C, Chu F, Walz T & Hur S (2013) Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell* **152**, 276–289.
- 20 Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O & Akira S (2005) IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* **6**, 981–988.
- 21 Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R & Tschoop J (2005) Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167–1172.
- 22 Seth RB, Sun L, Ea CK & Chen ZJ (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**, 669–682.
- 23 Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z & Shu HB (2005) VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* **19**, 727–740.
- 24 Kumar H, Kawai T, Kato H, Sato S, Takahashi K, Coban C, Yamamoto M, Uematsu S, Ishii KJ, Takeuchi O *et al.* (2006) Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *J Exp Med* **203**, 1795–1803.
- 25 Sun Q, Sun L, Liu HH, Chen X, Seth RB, Forman J & Chen ZJ (2006) The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity* **24**, 633–642.
- 26 Yasukawa K, Oshiumi H, Takeda M, Ishihara N, Yanagi Y, Seya T, Kawabata S & Koshiba T (2009) Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. *Sci Signal* **2**, ra47.
- 27 Brubaker SW, Gauthier AE, Mills EW, Ingolia NT & Kagan JC (2014) A bicistronic MAVS transcript highlights a class of truncated variants in antiviral immunity. *Cell* **156**, 800–811.
- 28 Biacchesi S, LeBere M, Lamoureux A, Louise Y, Lauret E, Boudinot P & Bremont M (2009) Mitochondrial antiviral signaling protein plays a major role in induction of the fish innate immune response against RNA and DNA viruses. *J Virol* **83**, 7815–7827.
- 29 Potter JA, Randall RE & Taylor GL (2008) Crystal structure of human IPS-1/MAVS/VISA/Cardif caspase activation recruitment domain. *BMC Struct Biol* **8**, 11.
- 30 Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX & Chen ZJ (2011) MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* **146**, 448–461.

- 31 Xu H, He X, Zheng H, Huang LJ, Hou F, Yu Z, de la Cruz MJ, Borkowski B, Zhang X, Chen ZJ *et al.* (2014) Structural basis for the prion-like MAVS filaments in antiviral innate immunity. *eLife* **3**, e01489.
- 32 Dixit E, Boulant S, Zhang Y, Lee AS, Odendall C, Shum B, Hacohen N, Chen ZJ, Whelan SP, Fransen M *et al.* (2010) Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell* **141**, 668–681.
- 33 Horner SM, Liu HM, Park HS, Briley J & Gale M Jr (2011) Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 14590–14595.
- 34 Liu S, Chen J, Cai X, Wu J, Chen X, Wu YT, Sun L & Chen ZJ (2013) MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *eLife* **2**, e00785.
- 35 Saha SK, Pietras EM, He JQ, Kang JR, Liu SY, Oganessian G, Shahangian A, Zarnegar B, Shiba TL, Wang Y *et al.* (2006) Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J* **25**, 3257–3263.
- 36 Belgnaoui SM, Paz S & Hiscott J (2011) Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. *Curr Opin Immunol* **23**, 564–572.
- 37 Bozym RA, Delorme-Axford E, Harris K, Morosky S, Ikizler M, Dermody TS, Sarkar SN & Coyne CB (2012) Focal adhesion kinase is a component of antiviral RIG-I-like receptor signaling. *Cell Host Microbe* **11**, 153–166.
- 38 Liu Y, Lu N, Yuan B, Weng L, Wang F, Liu YJ & Zhang Z (2014) The interaction between the helicase DHX33 and IPS-1 as a novel pathway to sense double-stranded RNA and RNA viruses in myeloid dendritic cells. *Cell Mol Immunol* **11**, 49–57.
- 39 Mosallanejad K, Sekine Y, Ishikura-Kinoshita S, Kumagai K, Nagano T, Matsuzawa A, Takeda K, Naguro I & Ichijo H (2014) The DEAH-box RNA helicase DHX15 activates NF-kappaB and MAPK signaling downstream of MAVS during antiviral responses. *Sci Signal* **7**, ra40.
- 40 Pan Y, Li R, Meng JL, Mao HT, Zhang Y & Zhang J (2014) Smurf2 negatively modulates RIG-I-dependent antiviral response by targeting VISA/MAVS for ubiquitination and degradation. *J Immunol* **192**, 4758–4764.
- 41 Sugimoto N, Mitoma H, Kim T, Hanabuchi S & Liu YJ (2014) Helicase proteins DHX29 and RIG-I cosense cytosolic nucleic acids in the human airway system. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 7747–7752.
- 42 Castanier C, Zemirli N, Portier A, Garcin D, Bidere N, Vazquez A & Arnoult D (2012) MAVS ubiquitination by the E3 ligase TRIM25 and degradation by the proteasome is involved in type I interferon production after activation of the antiviral RIG-I-like receptors. *BMC Biol* **10**, 44.
- 43 Mukherjee P, Woods TA, Moore RA & Peterson KE (2013) Activation of the innate signaling molecule MAVS by bunyavirus infection upregulates the adaptor protein SARM1, leading to neuronal death. *Immunity* **38**, 705–716.
- 44 Subramanian N, Natarajan K, Clatworthy MR, Wang Z & Germain RN (2013) The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. *Cell* **153**, 348–361.
- 45 Oganessian G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, Perry A & Cheng G (2006) Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* **439**, 208–211.
- 46 Zhao T, Yang L, Sun Q, Arguello M, Ballard DW, Hiscott J & Lin R (2007) The NEMO adaptor bridges the nuclear factor-kappaB and interferon regulatory factor signaling pathways. *Nat Immunol* **8**, 592–600.
- 47 Guo B & Cheng G (2007) Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKKi adaptor protein TANK. *J Biol Chem* **282**, 11817–11826.
- 48 Sasai M, Shingai M, Funami K, Yoneyama M, Fujita T, Matsumoto M & Seya T (2006) NAK-associated protein 1 participates in both the TLR3 and the cytoplasmic pathways in type I IFN induction. *J Immunol* **177**, 8676–8683.
- 49 Ishikawa H & Barber GN (2008) STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**, 674–678.
- 50 Cai X, Chiu YH & Chen ZJ (2014) The cGAS–cGAMP–STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. *Mol Cell* **54**, 289–296.
- 51 Zeng W, Xu M, Liu S, Sun L & Chen ZJ (2009) Key role of Ubc5 and lysine-63 polyubiquitination in viral activation of IRF3. *Mol Cell* **36**, 315–325.
- 52 Inoue J, Gohda J & Akiyama T (2007) Characteristics and biological functions of TRAF6. *Adv Exp Med Biol* **597**, 72–79.
- 53 Takahashi K, Kawai T, Kumar H, Sato S, Yonehara S & Akira S (2006) Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *J Immunol* **176**, 4520–4524.
- 54 Balachandran S, Thomas E & Barber GN (2004) A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells. *Nature* **432**, 401–405.
- 55 Michallet MC, Meylan E, Ermolaeva MA, Vazquez J, Rebsamen M, Curran J, Poeck H, Bscheider M, Hartmann G, Konig M *et al.* (2008) TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. *Immunity* **28**, 651–661.

- 56 Oberst A & Green DR (2011) It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 757–763.
- 57 Poeck H, Bscheider M, Gross O, Finger K, Roth S, Rebsamen M, Hanneschlager N, Schlee M, Rothenfusser S, Barchet W *et al.* (2010) Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. *Nat Immunol* **11**, 63–69.
- 58 James DI, Parone PA, Mattenberger Y & Martinou JC (2003) hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* **278**, 36373–36379.
- 59 Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ & Mihara K (2010) Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* **191**, 1141–1158.
- 60 Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN & van der Bliek AM (1998) A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* **143**, 351–358.
- 61 Smirnova E, Griparic L, Shurland DL & van der Bliek AM (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **12**, 2245–2256.
- 62 Zhu PP, Patterson A, Stadler J, Seeburg DP, Sheng M & Blackstone C (2004) Intra- and intermolecular domain interactions of the C-terminal GTPase effector domain of the multimeric dynamin-like GTPase Drp1. *J Biol Chem* **279**, 35967–35974.
- 63 Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ & McNiven MA (2003) The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* **23**, 5409–5420.
- 64 Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL & Youle RJ (2004) Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* **15**, 5001–5011.
- 65 Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE & Chan DC (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* **160**, 189–200.
- 66 Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P & Lenaers G (2003) Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 7743–7746.
- 67 Cosson P, Marchetti A, Ravazzola M & Orci L (2012) Mitofusin-2 independent juxtaposition of endoplasmic reticulum and mitochondria: an ultrastructural study. *PLoS ONE* **7**, e46293.
- 68 de Brito OM & Scorrano L (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* **456**, 605–610.
- 69 Rojo M, Legros F, Chateau D & Lombes A (2002) Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* **115**, 1663–1674.
- 70 Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, Lenaers G, Belenguer P & Hamel CP (2001) Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Human Genet* **109**, 584–591.
- 71 Arnoult D, Grodet A, Lee YJ, Estaquier J & Blackstone C (2005) Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem* **280**, 35742–35750.
- 72 Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B & Scorrano L (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 15927–15932.
- 73 Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B *et al.* (2006) OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* **126**, 177–189.
- 74 Castanier C, Garcin D, Vazquez A & Arnoult D (2010) Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Rep* **11**, 133–138.
- 75 Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, Morimoto S, Julkunen I, Namiki H, Yoneyama M & Fujita T (2010) Virus-infection or 5'ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1. *PLoS Pathog* **6**, e1001012.
- 76 Arnoult D, Carneiro L, Tattoli I & Girardin SE (2009) The role of mitochondria in cellular defense against microbial infection. *Semin Immunol* **21**, 223–232.
- 77 Castanier C & Arnoult D (2011) Mitochondrial localization of viral proteins as a means to subvert host defense. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 575–583.
- 78 Zemirli N, Pourcelot M, Ambroise G, Hatchi E, Vazquez A & Arnoult D (2014) Mitochondrial hyperfusion promotes nf-kappab activation via the mitochondrial e3 ligase mulan. *FEBS J* **281**, 3095–3112.
- 79 Arnoult D, Bartle LM, Skaletskaya A, Poncet D, Zamzami N, Park PU, Sharpe J, Youle RJ & Goldmacher VS (2004) Cytomegalovirus cell death suppressor vMIA blocks Bax- but not Bak-mediated apoptosis by binding and sequestering Bax at mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 7988–7993.
- 80 McCormick AL, Smith VL, Chow D & Mocarski ES (2003) Disruption of mitochondrial networks by the human cytomegalovirus UL37 gene product viral mitochondrion-localized inhibitor of apoptosis. *J Virol* **77**, 631–641.

- 81 Kim SJ, Syed GH, Khan M, Chiu WW, Sohail MA, Gish RG & Siddiqui A (2014) Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral persistence. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 6413–6418.
- 82 Kramer T & Enquist LW (2012) Alpha herpesvirus infection disrupts mitochondrial transport in neurons. *Cell Host Microbe* **11**, 504–514.
- 83 Koshiha T, Yasukawa K, Yanagi Y & Kawabata S (2011) Mitochondrial membrane potential is required for MAVS-mediated antiviral signaling. *Sci Signal* **4**, ra7.
- 84 Chan DC (2006) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* **125**, 1241–1252.
- 85 Naik E & Dixit VM (2011) Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med* **208**, 417–420.
- 86 Hamanaka RB & Chandel NS (2010) Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci* **35**, 505–513.
- 87 Soucy-Faulkner A, Mukawera E, Fink K, Martel A, Jouan L, Nzungue Y, Lamarre D, Vande Velde C & Grandvaux N (2010) Requirement of NOX2 and reactive oxygen species for efficient RIG-I-mediated antiviral response through regulation of MAVS expression. *PLoS Pathog* **6**, e1000930.
- 88 Tal MC, Sasai M, Lee HK, Yordy B, Shadel GS & Iwasaki A (2009) Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 2770–2775.
- 89 Zhao Y, Sun X, Nie X, Sun L, Tang TS, Chen D & Sun Q (2012) COX5B regulates MAVS-mediated antiviral signaling through interaction with ATG5 and repressing ROS production. *PLoS Pathog* **8**, e1003086.

Références bibliographiques

1. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006, **124**(4): 783-801.
2. Hoffmann J, Akira S. Innate immunity. *Current opinion in immunology* 2013, **25**(1): 1-3.
3. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 1989, **54 Pt 1**: 1-13.
4. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology* 2007, **81**(1): 1-5.
5. Chow J, Franz KM, Kagan JC. PRRs are watching you: Localization of innate sensing and signaling regulators. *Virology* 2015, **479-480**: 104-109.
6. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 1996, **86**(6): 973-983.
7. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997, **388**(6640): 394-397.
8. Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of leukocyte biology* 2000, **67**(4): 508-514.
9. Lester SN, Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *Journal of molecular biology* 2014, **426**(6): 1246-1264.
10. Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *The FEBS journal* 2005, **272**(24): 6179-6217.
11. Hardison SE, Brown GD. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nature immunology* 2012, **13**(9): 817-822.
12. Wuthrich M, Deepe GS, Jr., Klein B. Adaptive immunity to fungi. *Annual review of immunology* 2012, **30**: 115-148.
13. Sancho D, Joffre OP, Keller AM, Rogers NC, Martinez D, Hernanz-Falcon P, *et al.* Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 2009, **458**(7240): 899-903.
14. Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, Hara H, Ogata K, Saito T. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nature immunology* 2008, **9**(10): 1179-1188.
15. Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, *et al.* The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity* 2008, **28**(3): 285-287.
16. Saxena M, Yeretssian G. NOD-Like Receptors: Master Regulators of Inflammation and Cancer. *Frontiers in immunology* 2014, **5**: 327.
17. Benko S, Philpott DJ, Girardin SE. The microbial and danger signals that activate Nod-like receptors. *Cytokine* 2008, **43**(3): 368-373.
18. Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhaes JG, *et al.* Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nature immunology* 2010, **11**(1): 55-62.
19. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, *et al.* Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 2003, **300**(5625): 1584-1587.
20. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, *et al.* Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(11): 8869-8872.
21. Kobayashi KS, van den Elsen PJ. NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nature reviews Immunology* 2012, **12**(12): 813-820.
22. Wright KL, Chin KC, Linhoff M, Skinner C, Brown JA, Boss JM, *et al.* CIITA stimulation of transcription factor binding to major histocompatibility complex class II and associated promoters in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(11): 6267-6272.
23. Chaput C, Sander LE, Suttorp N, Opitz B. NOD-Like Receptors in Lung Diseases. *Frontiers in immunology* 2013, **4**: 393.

24. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nature reviews Immunology* 2014, **14**(1): 36-49.
25. Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nature immunology* 2004, **5**(10): 971-974.
26. Mamane Y, Heylbroeck C, Genin P, Algarte M, Servant MJ, LePage C, *et al.* Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* 1999, **237**(1): 1-14.
27. Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual review of immunology* 2001, **19**: 623-655.
28. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, *et al.* IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 2005, **434**(7034): 772-777.
29. Wathlet MG, Lin CH, Parekh BS, Ronco LV, Howley PM, Maniatis T. Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Molecular cell* 1998, **1**(4): 507-518.
30. Qin BY, Liu C, Lam SS, Srinath H, Delston R, Correia JJ, *et al.* Crystal structure of IRF-3 reveals mechanism of autoinhibition and virus-induced phosphoactivation. *Nature structural biology* 2003, **10**(11): 913-921.
31. Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM, Hiscott J. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Molecular and cellular biology* 1998, **18**(5): 2986-2996.
32. Sato M, Tanaka N, Hata N, Oda E, Taniguchi T. Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN-beta gene. *FEBS letters* 1998, **425**(1): 112-116.
33. Marie I, Durbin JE, Levy DE. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *The EMBO journal* 1998, **17**(22): 6660-6669.
34. Sato M, Hata N, Asagiri M, Nakaya T, Taniguchi T, Tanaka N. Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS letters* 1998, **441**(1): 106-110.
35. Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, *et al.* Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 2000, **13**(4): 539-548.
36. Hida S, Ogasawara K, Sato K, Abe M, Takayanagi H, Yokochi T, *et al.* CD8(+) T cell-mediated skin disease in mice lacking IRF-2, the transcriptional attenuator of interferon-alpha/beta signaling. *Immunity* 2000, **13**(5): 643-655.
37. Zhang XJ, Jiang DS, Li H. The interferon regulatory factors as novel potential targets in the treatment of cardiovascular diseases. *British journal of pharmacology* 2015, **172**(23): 5457-5476.
38. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology* 1998, **16**: 225-260.
39. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes & development* 2004, **18**(18): 2195-2224.
40. Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nature reviews Molecular cell biology* 2004, **5**(5): 392-401.
41. Kaileh M, Sen R. NF-kappaB function in B lymphocytes. *Immunological reviews* 2012, **246**(1): 254-271.
42. Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes & development* 1995, **9**(22): 2723-2735.
43. Hinz M, Arslan SC, Scheidereit C. It takes two to tango: IkappaBs, the multifunctional partners of NF-kappaB. *Immunological reviews* 2012, **246**(1): 59-76.
44. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *Journal of interferon research* 1987, **7**(5): 429-438.

45. Dussurget O, Bierre H, Cossart P. The bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* and the interferon family: type I, type II and type III interferons. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2014, **4**: 50.
46. Capobianchi MR, Uleri E, Caglioti C, Dolei A. Type I IFN family members: similarity, differences and interaction. *Cytokine & growth factor reviews* 2015, **26**(2): 103-111.
47. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clinical microbiology reviews* 2001, **14**(4): 778-809, table of contents.
48. Fung KY, Mangan NE, Cumming H, Horvat JC, Mayall JR, Stifter SA, *et al.* Interferon-epsilon protects the female reproductive tract from viral and bacterial infection. *Science* 2013, **339**(6123): 1088-1092.
49. LaFleur DW, Nardelli B, Tsareva T, Mather D, Feng P, Semenuk M, *et al.* Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(43): 39765-39771.
50. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annual review of immunology* 1993, **11**: 571-611.
51. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology* 2007, **96**: 41-101.
52. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, *et al.* IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature immunology* 2003, **4**(1): 69-77.
53. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, *et al.* IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature immunology* 2003, **4**(1): 63-68.
54. Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, Pfeiffer RM, Park H, Dickensheets H, *et al.* A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nature genetics* 2013, **45**(2): 164-171.
55. Hamming OJ, Terczynska-Dyla E, Vieyres G, Dijkman R, Jorgensen SE, Akhtar H, *et al.* Interferon lambda 4 signals via the IFNlambda receptor to regulate antiviral activity against HCV and coronaviruses. *The EMBO journal* 2013, **32**(23): 3055-3065.
56. Hermant P, Michiels T. Interferon-lambda in the context of viral infections: production, response and therapeutic implications. *Journal of innate immunity* 2014, **6**(5): 563-574.
57. Hoffmann HH, Schneider WM, Rice CM. Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions. *Trends in immunology* 2015, **36**(3): 124-138.
58. van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LA. Inflammasome activation and IL-1beta and IL-18 processing during infection. *Trends in immunology* 2011, **32**(3): 110-116.
59. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology* 2009, **27**: 519-550.
60. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature reviews Immunology* 2010, **10**(2): 89-102.
61. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS letters* 1988, **232**(2): 347-350.
62. Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Sekerkova A. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clinical science (London, England : 1979)* 2014, **126**(9): 593-612.
63. Leon LR, White AA, Kluger MJ. Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. *The American journal of physiology* 1998, **275**(1 Pt 2): R269-277.
64. Hamza T, Barnett JB, Li B. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *International journal of molecular sciences* 2010, **11**(3): 789-806.
65. Peisley A, Hur S. Multi-level regulation of cellular recognition of viral dsRNA. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2013, **70**(11): 1949-1963.
66. Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, *et al.* 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006, **314**(5801): 994-997.
67. Goubau D, Schlee M, Deddouch S, Pruijssers AJ, Zillinger T, Goldeck M, *et al.* Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature* 2014, **514**(7522): 372-375.

68. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000, **408**(6813): 740-745.
69. Zust R, Cervantes-Barragan L, Habjan M, Maier R, Neuman BW, Ziebuhr J, *et al.* Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nature immunology* 2011, **12**(2): 137-143.
70. Boehme KW, Guerrero M, Compton T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *Journal of immunology* 2006, **177**(10): 7094-7102.
71. Leoni V, Gianni T, Salvioli S, Campadelli-Fiume G. Herpes simplex virus glycoproteins gH/gL and gB bind Toll-like receptor 2, and soluble gH/gL is sufficient to activate NF-kappaB. *Journal of virology* 2012, **86**(12): 6555-6562.
72. Ariza ME, Glaser R, Kaumaya PT, Jones C, Williams MV. The EBV-encoded dUTPase activates NF-kappa B through the TLR2 and MyD88-dependent signaling pathway. *Journal of immunology* 2009, **182**(2): 851-859.
73. Bieback K, Lien E, Klagge IM, Avota E, Schneider-Schaulies J, Duprex WP, *et al.* Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *Journal of virology* 2002, **76**(17): 8729-8736.
74. Ge Y, Mansell A, Ussher JE, Brooks AE, Manning K, Wang CJ, *et al.* Rotavirus NSP4 Triggers Secretion of Proinflammatory Cytokines from Macrophages via Toll-Like Receptor 2. *Journal of virology* 2013, **87**(20): 11160-11167.
75. Szomolanyi-Tsuda E, Liang X, Welsh RM, Kurt-Jones EA, Finberg RW. Role for TLR2 in NK cell-mediated control of murine cytomegalovirus in vivo. *Journal of virology* 2006, **80**(9): 4286-4291.
76. Georgel P, Jiang Z, Kunz S, Janssen E, Mols J, Hoebe K, *et al.* Vesicular stomatitis virus glycoprotein G activates a specific antiviral Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Virology* 2007, **362**(2): 304-313.
77. Okumura A, Pitha PM, Yoshimura A, Harty RN. Interaction between Ebola virus glycoprotein and host toll-like receptor 4 leads to induction of proinflammatory cytokines and SOCS1. *Journal of virology* 2010, **84**(1): 27-33.
78. Rassa JC, Meyers JL, Zhang Y, Kudaravalli R, Ross SR. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(4): 2281-2286.
79. Hutchens MA, Luker KE, Sonstein J, Nunez G, Curtis JL, Luker GD. Protective effect of Toll-like receptor 4 in pulmonary vaccinia infection. *PLoS pathogens* 2008, **4**(9): e1000153.
80. Jude BA, Pobezinskaya Y, Bishop J, Parke S, Medzhitov RM, Chervonsky AV, *et al.* Subversion of the innate immune system by a retrovirus. *Nature immunology* 2003, **4**(6): 573-578.
81. Imai Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubian-Malhami R, Perkmann T, van Loo G, *et al.* Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell* 2008, **133**(2): 235-249.
82. Nhu QM, Shirey K, Teijaro JR, Farber DL, Netzel-Arnett S, Antalis TM, *et al.* Novel signaling interactions between proteinase-activated receptor 2 and Toll-like receptors in vitro and in vivo. *Mucosal immunology* 2010, **3**(1): 29-39.
83. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, *et al.* Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(15): 5598-5603.
84. Dreux M, Garaigorta U, Boyd B, Decembre E, Chung J, Whitten-Bauer C, *et al.* Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell host & microbe* 2012, **12**(4): 558-570.
85. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, *et al.* Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(10): 3516-3521.

86. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001, **413**(6857): 732-738.
87. Reinert LS, Harder L, Holm CK, Iversen MB, Horan KA, Dagnaes-Hansen F, *et al.* TLR3 deficiency renders astrocytes permissive to herpes simplex virus infection and facilitates establishment of CNS infection in mice. *The Journal of clinical investigation* 2012, **122**(4): 1368-1376.
88. Hardarson HS, Baker JS, Yang Z, Purevjav E, Huang CH, Alexopoulou L, *et al.* Toll-like receptor 3 is an essential component of the innate stress response in virus-induced cardiac injury. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2007, **292**(1): H251-258.
89. Richer MJ, Lavallee DJ, Shanina I, Horwitz MS. Toll-like receptor 3 signaling on macrophages is required for survival following coxsackievirus B4 infection. *PloS one* 2009, **4**(1): e4127.
90. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature reviews Immunology* 2007, **7**(5): 353-364.
91. Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nature immunology* 2006, **7**(10): 1074-1081.
92. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, *et al.* Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001, **413**(6851): 78-83.
93. Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 2006, **125**(5): 943-955.
94. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997, **7**(6): 837-847.
95. Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, Kato H, Matsui K, Kumagai Y, *et al.* Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nature immunology* 2008, **9**(6): 684-691.
96. Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(8): 5567-5572.
97. Landstrom M. The TAK1-TRAF6 signalling pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2010, **42**(5): 585-589.
98. Qian Y, Commane M, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Li X. IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NFkappa B. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(45): 41661-41667.
99. Kishimoto K, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J. TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(10): 7359-7364.
100. Wu CJ, Conze DB, Li T, Srinivasula SM, Ashwell JD. Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nature cell biology* 2006, **8**(4): 398-406.
101. Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF-kappaB signaling. *Annual review of biophysics* 2013, **42**: 443-468.
102. Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, *et al.* Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(43): 15416-15421.
103. Uematsu S, Sato S, Yamamoto M, Hirotsu T, Kato H, Takeshita F, *et al.* Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction. *The Journal of experimental medicine* 2005, **201**(6): 915-923.
104. Rowe DC, McGettrick AF, Latz E, Monks BG, Gay NJ, Yamamoto M, *et al.* The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal

- transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(16): 6299-6304.
105. McGettrick AF, Brint EK, Palsson-McDermott EM, Rowe DC, Golenbock DT, Gay NJ, *et al.* Trif-related adapter molecule is phosphorylated by PKC $\{\epsilon\}$ during Toll-like receptor 4 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(24): 9196-9201.
 106. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, *et al.* Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *Journal of immunology* 2003, **171**(8): 4304-4310.
 107. Oganessian G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, *et al.* Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 2006, **439**(7073): 208-211.
 108. Ryzhakov G, Randow F. SINTBAD, a novel component of innate antiviral immunity, shares a TBK1-binding domain with NAP1 and TANK. *The EMBO journal* 2007, **26**(13): 3180-3190.
 109. Zhao T, Yang L, Sun Q, Arguello M, Ballard DW, Hiscott J, *et al.* The NEMO adaptor bridges the nuclear factor-kappaB and interferon regulatory factor signaling pathways. *Nature immunology* 2007, **8**(6): 592-600.
 110. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology* 2004, **5**(7): 730-737.
 111. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, *et al.* Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *Journal of immunology* 2005, **175**(5): 2851-2858.
 112. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, *et al.* Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *The Journal of experimental medicine* 2008, **205**(7): 1601-1610.
 113. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006, **441**(7089): 101-105.
 114. Loo YM, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, *et al.* Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *Journal of virology* 2008, **82**(1): 335-345.
 115. Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, *et al.* Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(22): 8459-8464.
 116. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, *et al.* RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 2006, **314**(5801): 997-1001.
 117. Schlee M, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, *et al.* Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 2009, **31**(1): 25-34.
 118. Schmidt A, Schwerd T, Hamm W, Hellmuth JC, Cui S, Wenzel M, *et al.* 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(29): 12067-12072.
 119. Malathi K, Dong B, Gale M, Jr., Silverman RH. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* 2007, **448**(7155): 816-819.
 120. Feng Q, Hato SV, Langereis MA, Zoll J, Virgen-Slane R, Peisley A, *et al.* MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells. *Cell reports* 2012, **2**(5): 1187-1196.

121. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Rehwinkel J, Kato H, Takeuchi O, *et al.* Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *Journal of virology* 2009, **83**(20): 10761-10769.
122. Bamming D, Horvath CM. Regulation of signal transduction by enzymatically inactive antiviral RNA helicase proteins MDA5, RIG-I, and LGP2. *The Journal of biological chemistry* 2009, **284**(15): 9700-9712.
123. Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, *et al.* The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *Journal of immunology* 2005, **175**(8): 5260-5268.
124. Saito T, Hirai R, Loo YM, Owen D, Johnson CL, Sinha SC, *et al.* Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(2): 582-587.
125. Komuro A, Horvath CM. RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. *Journal of virology* 2006, **80**(24): 12332-12342.
126. Venkataraman T, Valdes M, Elsby R, Kakuta S, Caceres G, Saijo S, *et al.* Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *Journal of immunology* 2007, **178**(10): 6444-6455.
127. Bruns AM, Horvath CM. LGP2 synergy with MDA5 in RLR-mediated RNA recognition and antiviral signaling. *Cytokine* 2015, **74**(2): 198-206.
128. Bruns AM, Leser GP, Lamb RA, Horvath CM. The innate immune sensor LGP2 activates antiviral signaling by regulating MDA5-RNA interaction and filament assembly. *Molecular cell* 2014, **55**(5): 771-781.
129. Ferrage F, Dutta K, Nistal-Villan E, Patel JR, Sanchez-Aparicio MT, De Ioannes P, *et al.* Structure and dynamics of the second CARD of human RIG-I provide mechanistic insights into regulation of RIG-I activation. *Structure (London, England : 1993)* 2012, **20**(12): 2048-2061.
130. Kowalinski E, Lunardi T, McCarthy AA, Loubser J, Brunel J, Grigorov B, *et al.* Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell* 2011, **147**(2): 423-435.
131. Wu B, Peisley A, Richards C, Yao H, Zeng X, Lin C, *et al.* Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell* 2013, **152**(1-2): 276-289.
132. Goubau D, Deddouche S, Reis e Sousa C. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity* 2013, **38**(5): 855-869.
133. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, *et al.* IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature immunology* 2005, **6**(10): 981-988.
134. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, *et al.* Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005, **437**(7062): 1167-1172.
135. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005, **122**(5): 669-682.
136. Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Molecular cell* 2005, **19**(6): 727-740.
137. Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, Chen ZJ. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* 2011, **146**(3): 448-461.
138. Liu S, Chen J, Cai X, Wu J, Chen X, Wu YT, *et al.* MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *eLife* 2013, **2**: e00785.
139. Wu J, Chen ZJ. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annual review of immunology* 2014, **32**: 461-488.

140. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, *et al.* DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 2007, **448**(7152): 501-505.
141. Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 2008, **455**(7213): 674-678.
142. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 2009, **461**(7265): 788-792.
143. Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, *et al.* Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(49): 20842-20846.
144. Tanaka Y, Chen ZJ. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Science signaling* 2012, **5**(214): ra20.
145. Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, Hyodo M, *et al.* STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* 2011, **478**(7370): 515-518.
146. Abe T, Harashima A, Xia T, Konno H, Konno K, Morales A, *et al.* STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Molecular cell* 2013, **50**(1): 5-15.
147. Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nature immunology* 2009, **10**(10): 1065-1072.
148. Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 2009, **138**(3): 576-591.
149. Kim T, Pazhoor S, Bao M, Zhang Z, Hanabuchi S, Facchinetti V, *et al.* Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human plasmacytoid dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(34): 15181-15186.
150. Zhang Z, Yuan B, Lu N, Facchinetti V, Liu YJ. DHX9 pairs with IPS-1 to sense double-stranded RNA in myeloid dendritic cells. *Journal of immunology* 2011, **187**(9): 4501-4508.
151. Zhang Z, Yuan B, Bao M, Lu N, Kim T, Liu YJ. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nature immunology* 2011, **12**(10): 959-965.
152. Parvatiyar K, Zhang Z, Teles RM, Ouyang S, Jiang Y, Iyer SS, *et al.* The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nature immunology* 2012, **13**(12): 1155-1161.
153. Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, *et al.* IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature immunology* 2010, **11**(11): 997-1004.
154. Li T, Diner BA, Chen J, Cristea IM. Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**(26): 10558-10563.
155. Kerur N, Veetil MV, Sharma-Walia N, Bottero V, Sadagopan S, Otageri P, *et al.* IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell host & microbe* 2011, **9**(5): 363-375.
156. Ansari MA, Singh VV, Dutta S, Veetil MV, Dutta D, Chikoti L, *et al.* Constitutive interferon-inducible protein 16-inflammasome activation during Epstein-Barr virus latency I, II, and III in B and epithelial cells. *Journal of virology* 2013, **87**(15): 8606-8623.
157. Johnson KE, Chikoti L, Chandran B. Herpes simplex virus 1 infection induces activation and subsequent inhibition of the IFI16 and NLRP3 inflammasomes. *Journal of virology* 2013, **87**(9): 5005-5018.
158. Zhang X, Brann TW, Zhou M, Yang J, Oguariri RM, Lidie KB, *et al.* Cutting edge: Ku70 is a novel cytosolic DNA sensor that induces type III rather than type I IFN. *Journal of immunology* 2011, **186**(8): 4541-4545.
159. Ferguson BJ, Mansur DS, Peters NE, Ren H, Smith GL. DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. *eLife* 2012, **1**: e00047.
160. Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, Maruyama K, Ishii KJ, Barber GN, *et al.* DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by

- regulating STING trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013, **110**(8): 2969-2974.
161. Roth S, Rottach A, Lotz-Havla AS, Laux V, Muschaweckh A, Gersting SW, *et al.* Rad50-CARD9 interactions link cytosolic DNA sensing to IL-1beta production. *Nature immunology* 2014, **15**(6): 538-545.
 162. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, *et al.* Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 2013, **339**(6121): 826-830.
 163. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 2013, **339**(6121): 786-791.
 164. Civril F, Deimling T, de Oliveira Mann CC, Ablasser A, Moldt M, Witte G, *et al.* Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS. *Nature* 2013, **498**(7454): 332-337.
 165. Kranzusch PJ, Lee AS, Berger JM, Doudna JA. Structure of human cGAS reveals a conserved family of second-messenger enzymes in innate immunity. *Cell reports* 2013, **3**(5): 1362-1368.
 166. Diner EJ, Burdette DL, Wilson SC, Monroe KM, Kellenberger CA, Hyodo M, *et al.* The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING. *Cell reports* 2013, **3**(5): 1355-1361.
 167. Gao P, Ascano M, Wu Y, Barchet W, Gaffney BL, Zillinger T, *et al.* Cyclic [G(2',5')pA(3',5')p] is the metazoan second messenger produced by DNA-activated cyclic GMP-AMP synthase. *Cell* 2013, **153**(5): 1094-1107.
 168. Zhang X, Shi H, Wu J, Zhang X, Sun L, Chen C, *et al.* Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. *Molecular cell* 2013, **51**(2): 226-235.
 169. Li XD, Wu J, Gao D, Wang H, Sun L, Chen ZJ. Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science* 2013, **341**(6152): 1390-1394.
 170. Schoggins JW, MacDuff DA, Imanaka N, Gainey MD, Shrestha B, Eitson JL, *et al.* Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* 2014, **505**(7485): 691-695.
 171. Gao D, Wu J, Wu YT, Du F, Aroh C, Yan N, *et al.* Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science* 2013, **341**(6148): 903-906.
 172. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell* 2002, **10**(2): 417-426.
 173. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, *et al.* Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *Journal of immunology* 2009, **183**(2): 787-791.
 174. Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, *et al.* The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nature immunology* 2010, **11**(5): 395-402.
 175. Jamilloux Y, Henry T. [The inflammasomes: platforms of innate immunity]. *Medecine sciences : M/S* 2013, **29**(11): 975-984.
 176. Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2014, **1319**: 82-95.
 177. Mitoma H, Hanabuchi S, Kim T, Bao M, Zhang Z, Sugimoto N, *et al.* The DHX33 RNA helicase senses cytosolic RNA and activates the NLRP3 inflammasome. *Immunity* 2013, **39**(1): 123-135.
 178. Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, *et al.* Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nature immunology* 2010, **11**(12): 1136-1142.
 179. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current biology : CB* 2006, **16**(14): R551-560.
 180. Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science* 1999, **283**(5407): 1476-1481.

181. Kumar H, Kawai T, Kato H, Sato S, Takahashi K, Coban C, *et al.* Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *The Journal of experimental medicine* 2006, **203**(7): 1795-1803.
182. Sun Q, Sun L, Liu HH, Chen X, Seth RB, Forman J, *et al.* The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity* 2006, **24**(5): 633-642.
183. Li XD, Sun L, Seth RB, Pineda G, Chen ZJ. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(49): 17717-17722.
184. Potter JA, Randall RE, Taylor GL. Crystal structure of human IPS-1/MAVS/VISA/Cardif caspase activation recruitment domain. *BMC structural biology* 2008, **8**: 11.
185. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of cell biology* 2003, **160**(2): 189-200.
186. James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou JC. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(38): 36373-36379.
187. Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, *et al.* Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(10): 7743-7746.
188. Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, *et al.* Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 2010, **191**(6): 1141-1158.
189. Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN, van der Blik AM. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *The Journal of cell biology* 1998, **143**(2): 351-358.
190. Yasukawa K, Oshiumi H, Takeda M, Ishihara N, Yanagi Y, Seya T, *et al.* Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. *Science signaling* 2009, **2**(84): ra47.
191. Castanier C, Garcin D, Vazquez A, Arnoult D. Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO reports* 2010, **11**(2): 133-138.
192. Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, Morimoto S, *et al.* Virus-infection or 5'ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1. *PLoS pathogens* 2010, **6**(7): e1001012.
193. Koshiha T, Yasukawa K, Yanagi Y, Kawabata S. Mitochondrial membrane potential is required for MAVS-mediated antiviral signaling. *Science signaling* 2011, **4**(158): ra7.
194. Soucy-Faulkner A, Mukawera E, Fink K, Martel A, Jouan L, Nzengue Y, *et al.* Requirement of NOX2 and reactive oxygen species for efficient RIG-I-mediated antiviral response through regulation of MAVS expression. *PLoS pathogens* 2010, **6**(6): e1000930.
195. Tal MC, Sasai M, Lee HK, Yordy B, Shadel GS, Iwasaki A. Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(8): 2770-2775.
196. Zhao Y, Sun X, Nie X, Sun L, Tang TS, Chen D, *et al.* COX5B regulates MAVS-mediated antiviral signaling through interaction with ATG5 and repressing ROS production. *PLoS pathogens* 2012, **8**(12): e1003086.
197. Pourcelot M, Arnoult D. Mitochondrial dynamics and the innate antiviral immune response. *The FEBS journal* 2014, **281**(17): 3791-3802.
198. Brodsky JL, McCracken AA. ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Seminars in cell & developmental biology* 1999, **10**(5): 507-513.
199. Dobbs N, Burnaevskiy N, Chen D, Gonugunta VK, Alto NM, Yan N. STING Activation by Translocation from the ER Is Associated with Infection and Autoinflammatory Disease. *Cell host & microbe* 2015, **18**(2): 157-168.
200. Alexia C, Poalas K, Carvalho G, Zemirli N, Dwyer J, Dubois SM, *et al.* The endoplasmic reticulum acts as a platform for ubiquitylated components of nuclear factor kappaB signaling. *Science signaling* 2013, **6**(291): ra79.

201. Zemirli N, Pourcelot M, Dogan N, Vazquez A, Arnoult D. The E3 ubiquitin ligase RNF121 is a positive regulator of NF-kappaB activation. *Cell communication and signaling : CCS* 2014, **12**: 72.
202. Joly AL, Wettstein G, Mignot G, Ghiringhelli F, Garrido C. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *Journal of innate immunity* 2010, **2**(3): 238-247.
203. Asea A. Heat shock proteins and toll-like receptors. *Handbook of experimental pharmacology* 2008(183): 111-127.
204. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *Journal of leukocyte biology* 2007, **81**(1): 28-37.
205. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003, **425**(6957): 516-521.
206. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006, **440**(7081): 237-241.
207. Muller S, Ronfani L, Bianchi ME. Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *Journal of internal medicine* 2004, **255**(3): 332-343.
208. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002, **418**(6894): 191-195.
209. Kokkola R, Andersson A, Mullins G, Ostberg T, Treutiger CJ, Arnold B, *et al.* RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scandinavian journal of immunology* 2005, **61**(1): 1-9.
210. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, *et al.* Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(9): 7370-7377.
211. Hreggvidsdottir HS, Ostberg T, Wahamaa H, Schierbeck H, Aveberger AC, Klevenvall L, *et al.* The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation. *Journal of leukocyte biology* 2009, **86**(3): 655-662.
212. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, *et al.* Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nature immunology* 2007, **8**(5): 487-496.
213. Rouhiainen A, Tumova S, Valmu L, Kalkkinen N, Rauvala H. Pivotal advance: analysis of proinflammatory activity of highly purified eukaryotic recombinant HMGB1 (amphoterin). *Journal of leukocyte biology* 2007, **81**(1): 49-58.
214. Venereau E, Casalgrandi M, Schiraldi M, Antoine DJ, Cattaneo A, De Marchis F, *et al.* Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *The Journal of experimental medicine* 2012, **209**(9): 1519-1528.
215. Yang H, Lundback P, Ottosson L, Erlandsson-Harris H, Venereau E, Bianchi ME, *et al.* Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 2012, **18**: 250-259.
216. Chamilos G, Gregorio J, Meller S, Lande R, Kontoyiannis DP, Modlin RL, *et al.* Cytosolic sensing of extracellular self-DNA transported into monocytes by the antimicrobial peptide LL37. *Blood* 2012, **120**(18): 3699-3707.
217. Chen R, Kang R, Fan XG, Tang D. Release and activity of histone in diseases. *Cell death & disease* 2014, **5**: e1370.
218. Huang H, Evankovich J, Yan W, Nace G, Zhang L, Ross M, *et al.* Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2011, **54**(3): 999-1008.
219. Xu J, Zhang X, Monestier M, Esmon NL, Esmon CT. Extracellular histones are mediators of death through TLR2 and TLR4 in mouse fatal liver injury. *Journal of immunology* 2011, **187**(5): 2626-2631.
220. He B. Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell death and differentiation* 2006, **13**(3): 393-403.

221. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annual review of biochemistry* 2005, **74**: 739-789.
222. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 2008, **454**(7203): 455-462.
223. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, *et al.* Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000, **287**(5453): 664-666.
224. Keestra-Gounder AM, Byndloss MX, Seyffert N, Young BM, Chavez-Arroyo A, Tsai AY, *et al.* NOD1 and NOD2 signalling links ER stress with inflammation. *Nature* 2016, **532**(7599): 394-397.
225. Yamazaki H, Hiramatsu N, Hayakawa K, Tagawa Y, Okamura M, Ogata R, *et al.* Activation of the Akt-NF-kappaB pathway by subtilase cytotoxin through the ATF6 branch of the unfolded protein response. *Journal of immunology* 2009, **183**(2): 1480-1487.
226. Cuozzo JW, Kaiser CA. Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation. *Nature cell biology* 1999, **1**(3): 130-135.
227. Tu BP, Weissman JS. The FAD- and O(2)-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular cell* 2002, **10**(5): 983-994.
228. Cullinan SB, Zhang D, Hannink M, Arvisais E, Kaufman RJ, Diehl JA. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Molecular and cellular biology* 2003, **23**(20): 7198-7209.
229. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, *et al.* An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular cell* 2003, **11**(3): 619-633.
230. Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C, *et al.* Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene* 2008, **27**(3): 285-299.
231. Bronner DN, Abuaita BH, Chen X, Fitzgerald KA, Nunez G, He Y, *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress Activates the Inflammasome via NLRP3- and Caspase-2-Driven Mitochondrial Damage. *Immunity* 2015, **43**(3): 451-462.
232. Collins LV, Hajizadeh S, Holme E, Jonsson IM, Tarkowski A. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *Journal of leukocyte biology* 2004, **75**(6): 995-1000.
233. Zhang JZ, Liu Z, Liu J, Ren JX, Sun TS. Mitochondrial DNA induces inflammation and increases TLR9/NF-kappaB expression in lung tissue. *International journal of molecular medicine* 2014, **33**(4): 817-824.
234. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, *et al.* Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature immunology* 2011, **12**(3): 222-230.
235. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, *et al.* Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* 2012, **36**(3): 401-414.
236. Allam R, Lawlor KE, Yu EC, Mildenhall AL, Moujalled DM, Lewis RS, *et al.* Mitochondrial apoptosis is dispensable for NLRP3 inflammasome activation but non-apoptotic caspase-8 is required for inflammasome priming. *EMBO reports* 2014, **15**(9): 982-990.
237. West AP, Khoury-Hanold W, Staron M, Tal MC, Pineda CM, Lang SM, *et al.* Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature* 2015, **520**(7548): 553-557.
238. Rongvaux A, Jackson R, Harman CC, Li T, West AP, de Zoete MR, *et al.* Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell* 2014, **159**(7): 1563-1577.
239. White MJ, McArthur K, Metcalf D, Lane RM, Cambier JC, Herold MJ, *et al.* Apoptotic caspases suppress mtDNA-induced STING-mediated type I IFN production. *Cell* 2014, **159**(7): 1549-1562.
240. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, *et al.* ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 2006, **314**(5806): 1792-1795.

241. Burnstock G. P2X ion channel receptors and inflammation. *Purinergic signalling* 2016, **12**(1): 59-67.
242. Hewinson J, Moore SF, Glover C, Watts AG, MacKenzie AB. A key role for redox signaling in rapid P2X7 receptor-induced IL-1 beta processing in human monocytes. *Journal of immunology* 2008, **180**(12): 8410-8420.
243. Moore SF, MacKenzie AB. NADPH oxidase NOX2 mediates rapid cellular oxidation following ATP stimulation of endotoxin-primed macrophages. *Journal of immunology* 2009, **183**(5): 3302-3308.
244. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2011, **469**(7329): 221-225.
245. Brady NR, Hamacher-Brady A, Westerhoff HV, Gottlieb RA. A wave of reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release in a sea of excitable mitochondria. *Antioxidants & redox signaling* 2006, **8**(9-10): 1651-1665.
246. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American journal of physiology Cell physiology* 2004, **287**(4): C817-833.
247. Ciechanover A, Elias S, Heller H, Ferber S, Hershko A. Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *The Journal of biological chemistry* 1980, **255**(16): 7525-7528.
248. Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980, **77**(3): 1365-1368.
249. Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980, **77**(4): 1783-1786.
250. Hershko A, Ciechanover A, Rose IA. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979, **76**(7): 3107-3110.
251. Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1975, **72**(1): 11-15.
252. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* 1998, **67**: 425-479.
253. Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* 2004, **1695**(1-3): 55-72.
254. Groettrup M, Pelzer C, Schmidtke G, Hofmann K. Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field. *Trends in biochemical sciences* 2008, **33**(5): 230-237.
255. Pelzer C, Kassner I, Matentzoglou K, Singh RK, Wollscheid HP, Scheffner M, *et al.* UBE1L2, a novel E1 enzyme specific for ubiquitin. *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**(32): 23010-23014.
256. Haas AL, Warms JV, Hershko A, Rose IA. Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *The Journal of biological chemistry* 1982, **257**(5): 2543-2548.
257. Jin J, Li X, Gygi SP, Harper JW. Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging. *Nature* 2007, **447**(7148): 1135-1138.
258. Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 1995, **373**(6509): 81-83.
259. Michelle C, Vourc'h P, Mignon L, Andres CR. What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? *Journal of molecular evolution* 2009, **68**(6): 616-628.
260. Ye Y, Rape M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nature reviews Molecular cell biology* 2009, **10**(11): 755-764.

261. Markson G, Kiel C, Hyde R, Brown S, Charalabous P, Bremm A, *et al.* Analysis of the human E2 ubiquitin conjugating enzyme protein interaction network. *Genome research* 2009, **19**(10): 1905-1911.
262. Ravid T, Hochstrasser M. Autoregulation of an E2 enzyme by ubiquitin-chain assembly on its catalytic residue. *Nature cell biology* 2007, **9**(4): 422-427.
263. Hochstrasser M. Lingering mysteries of ubiquitin-chain assembly. *Cell* 2006, **124**(1): 27-34.
264. Windheim M, Pegg M, Cohen P. Two different classes of E2 ubiquitin-conjugating enzymes are required for the mono-ubiquitination of proteins and elongation by polyubiquitin chains with a specific topology. *The Biochemical journal* 2008, **409**(3): 723-729.
265. Christensen DE, Brzovic PS, Klevit RE. E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages. *Nature structural & molecular biology* 2007, **14**(10): 941-948.
266. Hofmann RM, Pickart CM. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 1999, **96**(5): 645-653.
267. McDowell GS, Philpott A. Non-canonical ubiquitylation: mechanisms and consequences. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2013, **45**(8): 1833-1842.
268. Behrends C, Harper JW. Constructing and decoding unconventional ubiquitin chains. *Nature structural & molecular biology* 2011, **18**(5): 520-528.
269. Komander D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society transactions* 2009, **37**(Pt 5): 937-953.
270. Kulathu Y, Komander D. Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nature reviews Molecular cell biology* 2012, **13**(8): 508-523.
271. Walczak H, Iwai K, Dikic I. Generation and physiological roles of linear ubiquitin chains. *BMC biology* 2012, **10**: 23.
272. Matsumoto ML, Wickliffe KE, Dong KC, Yu C, Bosanac I, Bustos D, *et al.* K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody. *Molecular cell* 2010, **39**(3): 477-484.
273. Zinngrebe J, Montinaro A, Peltzer N, Walczak H. Ubiquitin in the immune system. *EMBO reports* 2014, **15**(1): 28-45.
274. Komander D, Clague MJ, Urbe S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nature reviews Molecular cell biology* 2009, **10**(8): 550-563.
275. Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annual review of biochemistry* 2009, **78**: 363-397.
276. Fraile JM, Quesada V, Rodriguez D, Freije JM, Lopez-Otin C. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene* 2012, **31**(19): 2373-2388.
277. Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, *et al.* A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 2005, **123**(5): 773-786.
278. Ye Y, Scheel H, Hofmann K, Komander D. Dissection of USP catalytic domains reveals five common insertion points. *Molecular bioSystems* 2009, **5**(12): 1797-1808.
279. Balakirev MY, Tcherniuk SO, Jaquinod M, Chroboczek J. Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. *EMBO reports* 2003, **4**(5): 517-522.
280. Winborn BJ, Travis SM, Todi SV, Scaglione KM, Xu P, Williams AJ, *et al.* The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains. *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**(39): 26436-26443.
281. Liang J, Saad Y, Lei T, Wang J, Qi D, Yang Q, *et al.* MCP-induced protein 1 deubiquitinates TRAF proteins and negatively regulates JNK and NF-kappaB signaling. *The Journal of experimental medicine* 2010, **207**(13): 2959-2973.
282. Ambroggio XI, Rees DC, Deshaies RJ. JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS biology* 2004, **2**(1): E2.
283. Amerik AY, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochimica et biophysica acta* 2004, **1695**(1-3): 189-207.

284. Chuang TH, Ulevitch RJ. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nature immunology* 2004, **5**(5): 495-502.
285. Fearn C, Pan Q, Mathison JC, Chuang TH. Triad3A regulates ubiquitination and proteasomal degradation of RIP1 following disruption of Hsp90 binding. *The Journal of biological chemistry* 2006, **281**(45): 34592-34600.
286. Nakhaei P, Mesplede T, Solis M, Sun Q, Zhao T, Yang L, *et al.* The E3 ubiquitin ligase Triad3A negatively regulates the RIG-I/MAVS signaling pathway by targeting TRAF3 for degradation. *PLoS pathogens* 2009, **5**(11): e1000650.
287. Naiki Y, Michelsen KS, Zhang W, Chen S, Doherty TM, Arditi M. Transforming growth factor-beta differentially inhibits MyD88-dependent, but not TRAM- and TRIF-dependent, lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(7): 5491-5495.
288. Lee YS, Park JS, Kim JH, Jung SM, Lee JY, Kim SJ, *et al.* Smad6-specific recruitment of Smurf E3 ligases mediates TGF-beta1-induced degradation of MyD88 in TLR4 signalling. *Nature communications* 2011, **2**: 460.
289. Wang C, Chen T, Zhang J, Yang M, Li N, Xu X, *et al.* The E3 ubiquitin ligase Nrdp1 'preferentially' promotes TLR-mediated production of type I interferon. *Nature immunology* 2009, **10**(7): 744-752.
290. Yang Y, Liao B, Wang S, Yan B, Jin Y, Shu HB, *et al.* E3 ligase WWP2 negatively regulates TLR3-mediated innate immune response by targeting TRIF for ubiquitination and degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013, **110**(13): 5115-5120.
291. Conze DB, Wu CJ, Thomas JA, Landstrom A, Ashwell JD. Lys63-linked polyubiquitination of IRAK-1 is required for interleukin-1 receptor- and toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation. *Molecular and cellular biology* 2008, **28**(10): 3538-3547.
292. Ordureau A, Smith H, Windheim M, Peggie M, Carrick E, Morrice N, *et al.* The IRAK-catalysed activation of the E3 ligase function of Pellino isoforms induces the Lys63-linked polyubiquitination of IRAK1. *The Biochemical journal* 2008, **409**(1): 43-52.
293. Schauvliege R, Janssens S, Beyaert R. Pellino proteins are more than scaffold proteins in TLR/IL-1R signalling: a role as novel RING E3-ubiquitin-ligases. *FEBS letters* 2006, **580**(19): 4697-4702.
294. Chang M, Jin W, Sun SC. Peli1 facilitates TRIF-dependent Toll-like receptor signaling and proinflammatory cytokine production. *Nature immunology* 2009, **10**(10): 1089-1095.
295. Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, *et al.* TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 2007, **446**(7138): 916-920.
296. Gack MU, Kirchhofer A, Shin YC, Inn KS, Liang C, Cui S, *et al.* Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(43): 16743-16748.
297. Gao D, Yang YK, Wang RP, Zhou X, Diao FC, Li MD, *et al.* REUL is a novel E3 ubiquitin ligase and stimulator of retinoic-acid-inducible gene-I. *PloS one* 2009, **4**(6): e5760.
298. Oshiumi H, Matsumoto M, Hatakeyama S, Seya T. Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection. *The Journal of biological chemistry* 2009, **284**(2): 807-817.
299. Oshiumi H, Miyashita M, Inoue N, Okabe M, Matsumoto M, Seya T. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell host & microbe* 2010, **8**(6): 496-509.
300. Oshiumi H, Miyashita M, Matsumoto M, Seya T. A distinct role of Riplet-mediated K63-Linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. *PLoS pathogens* 2013, **9**(8): e1003533.
301. Yan J, Li Q, Mao AP, Hu MM, Shu HB. TRIM4 modulates type I interferon induction and cellular antiviral response by targeting RIG-I for K63-linked ubiquitination. *Journal of molecular cell biology* 2014, **6**(2): 154-163.

302. Kuniyoshi K, Takeuchi O, Pandey S, Satoh T, Iwasaki H, Akira S, *et al.* Pivotal role of RNA-binding E3 ubiquitin ligase MEX3C in RIG-I-mediated antiviral innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014, **111**(15): 5646-5651.
303. Peisley A, Wu B, Xu H, Chen ZJ, Hur S. Structural basis for ubiquitin-mediated antiviral signal activation by RIG-I. *Nature* 2014, **509**(7498): 110-114.
304. Fan Y, Mao R, Yu Y, Liu S, Shi Z, Cheng J, *et al.* USP21 negatively regulates antiviral response by acting as a RIG-I deubiquitinase. *The Journal of experimental medicine* 2014, **211**(2): 313-328.
305. Cui J, Song Y, Li Y, Zhu Q, Tan P, Qin Y, *et al.* USP3 inhibits type I interferon signaling by deubiquitinating RIG-I-like receptors. *Cell research* 2014, **24**(4): 400-416.
306. Paz S, Vilasco M, Arguello M, Sun Q, Lacoste J, Nguyen TL, *et al.* Ubiquitin-regulated recruitment of IkappaB kinase epsilon to the MAVS interferon signaling adapter. *Molecular and cellular biology* 2009, **29**(12): 3401-3412.
307. Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T, Shimotohno K. Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(18): 7500-7505.
308. Wang L, Zhao W, Zhang M, Wang P, Zhao K, Zhao X, *et al.* USP4 positively regulates RIG-I-mediated antiviral response through deubiquitination and stabilization of RIG-I. *Journal of virology* 2013, **87**(8): 4507-4515.
309. Inn KS, Gack MU, Tokunaga F, Shi M, Wong LY, Iwai K, *et al.* Linear ubiquitin assembly complex negatively regulates RIG-I- and TRIM25-mediated type I interferon induction. *Molecular cell* 2011, **41**(3): 354-365.
310. Narayan K, Waggoner L, Pham ST, Hendricks GL, Waggoner SN, Conlon J, *et al.* TRIM13 is a negative regulator of MDA5-mediated type I interferon production. *Journal of virology* 2014, **88**(18): 10748-10757.
311. Castanier C, Zemirli N, Portier A, Garcin D, Bidere N, Vazquez A, *et al.* MAVS ubiquitination by the E3 ligase TRIM25 and degradation by the proteasome is involved in type I interferon production after activation of the antiviral RIG-I-like receptors. *BMC biology* 2012, **10**: 44.
312. Yoo YS, Park YY, Kim JH, Cho H, Kim SH, Lee HS, *et al.* The mitochondrial ubiquitin ligase MARCH5 resolves MAVS aggregates during antiviral signalling. *Nature communications* 2015, **6**: 7910.
313. Pan Y, Li R, Meng JL, Mao HT, Zhang Y, Zhang J. Smurf2 negatively modulates RIG-I-dependent antiviral response by targeting VISA/MAVS for ubiquitination and degradation. *Journal of immunology* 2014, **192**(10): 4758-4764.
314. Wang Y, Tong X, Ye X. Ndfip1 negatively regulates RIG-I-dependent immune signaling by enhancing E3 ligase Smurf1-mediated MAVS degradation. *Journal of immunology* 2012, **189**(11): 5304-5313.
315. You F, Sun H, Zhou X, Sun W, Liang S, Zhai Z, *et al.* PCBP2 mediates degradation of the adaptor MAVS via the HECT ubiquitin ligase AIP4. *Nature immunology* 2009, **10**(12): 1300-1308.
316. Zhong B, Zhang Y, Tan B, Liu TT, Wang YY, Shu HB. The E3 ubiquitin ligase RNF5 targets virus-induced signaling adaptor for ubiquitination and degradation. *Journal of immunology* 2010, **184**(11): 6249-6255.
317. Yang B, Wang J, Wang Y, Zhou H, Wu X, Tian Z, *et al.* Novel function of Trim44 promotes an antiviral response by stabilizing VISA. *Journal of immunology* 2013, **190**(7): 3613-3619.
318. Tsuchida T, Zou J, Saitoh T, Kumar H, Abe T, Matsuura Y, *et al.* The ubiquitin ligase TRIM56 regulates innate immune responses to intracellular double-stranded DNA. *Immunity* 2010, **33**(5): 765-776.
319. Zhang J, Hu MM, Wang YY, Shu HB. TRIM32 protein modulates type I interferon induction and cellular antiviral response by targeting MITA/STING protein for K63-linked ubiquitination. *The Journal of biological chemistry* 2012, **287**(34): 28646-28655.

320. Wang Q, Liu X, Cui Y, Tang Y, Chen W, Li S, *et al.* The E3 ubiquitin ligase AMFR and INSIG1 bridge the activation of TBK1 kinase by modifying the adaptor STING. *Immunity* 2014, **41**(6): 919-933.
321. Zhong B, Zhang L, Lei C, Li Y, Mao AP, Yang Y, *et al.* The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MITA. *Immunity* 2009, **30**(3): 397-407.
322. Qin Y, Zhou MT, Hu MM, Hu YH, Zhang J, Guo L, *et al.* RNF26 temporally regulates virus-triggered type I interferon induction by two distinct mechanisms. *PLoS pathogens* 2014, **10**(9): e1004358.
323. Wang Y, Lian Q, Yang B, Yan S, Zhou H, He L, *et al.* TRIM30alpha Is a Negative-Feedback Regulator of the Intracellular DNA and DNA Virus-Triggered Response by Targeting STING. *PLoS pathogens* 2015, **11**(6): e1005012.
324. Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, *et al.* Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000, **103**(2): 351-361.
325. Xia ZP, Sun L, Chen X, Pineda G, Jiang X, Adhikari A, *et al.* Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature* 2009, **461**(7260): 114-119.
326. Kanayama A, Seth RB, Sun L, Ea CK, Hong M, Shaito A, *et al.* TAB2 and TAB3 activate the NF- κ B pathway through binding to polyubiquitin chains. *Molecular cell* 2004, **15**(4): 535-548.
327. Zeng W, Xu M, Liu S, Sun L, Chen ZJ. Key role of Ubc5 and lysine-63 polyubiquitination in viral activation of IRF3. *Molecular cell* 2009, **36**(2): 315-325.
328. Wang L, Li S, Dorf ME. NEMO binds ubiquitinated TANK-binding kinase 1 (TBK1) to regulate innate immune responses to RNA viruses. *PLoS one* 2012, **7**(9): e43756.
329. Ye JS, Kim N, Lee KJ, Nam YR, Lee U, Joo CH. Lysine 63-linked TANK-binding kinase 1 ubiquitination by mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 2 is mediated by the mitochondrial antiviral signaling protein. *Journal of virology* 2014, **88**(21): 12765-12776.
330. Parvatiyar K, Barber GN, Harhaj EW. TAX1BP1 and A20 inhibit antiviral signaling by targeting TBK1-IKKi kinases. *The Journal of biological chemistry* 2010, **285**(20): 14999-15009.
331. Tu D, Zhu Z, Zhou AY, Yun CH, Lee KE, Toms AV, *et al.* Structure and ubiquitination-dependent activation of TANK-binding kinase 1. *Cell reports* 2013, **3**(3): 747-758.
332. Zhao W, Wang L, Zhang M, Yuan C, Gao C. E3 ubiquitin ligase tripartite motif 38 negatively regulates TLR-mediated immune responses by proteasomal degradation of TNF receptor-associated factor 6 in macrophages. *Journal of immunology* 2012, **188**(6): 2567-2574.
333. Cui J, Li Y, Zhu L, Liu D, Songyang Z, Wang HY, *et al.* NLRP4 negatively regulates type I interferon signaling by targeting the kinase TBK1 for degradation via the ubiquitin ligase DTX4. *Nature immunology* 2012, **13**(4): 387-395.
334. Zhang M, Wang L, Zhao X, Zhao K, Meng H, Zhao W, *et al.* TRAF-interacting protein (TRIP) negatively regulates IFN- β production and antiviral response by promoting proteasomal degradation of TANK-binding kinase 1. *The Journal of experimental medicine* 2012, **209**(10): 1703-1711.
335. Zhang M, Tian Y, Wang RP, Gao D, Zhang Y, Diao FC, *et al.* Negative feedback regulation of cellular antiviral signaling by RBCK1-mediated degradation of IRF3. *Cell research* 2008, **18**(11): 1096-1104.
336. Wang P, Zhao W, Zhao K, Zhang L, Gao C. TRIM26 negatively regulates interferon- β production and antiviral response through polyubiquitination and degradation of nuclear IRF3. *PLoS pathogens* 2015, **11**(3): e1004726.
337. Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, Yamamoto M, Finn G, Fujita T, *et al.* Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nature immunology* 2006, **7**(6): 598-605.
338. Higgs R, Lazzari E, Wynne C, Ni Gabhann J, Espinosa A, Wahren-Herlenius M, *et al.* Self protection from anti-viral responses--Ro52 promotes degradation of the transcription factor IRF7 downstream of the viral Toll-Like receptors. *PLoS one* 2010, **5**(7): e11776.

339. Yang K, Shi HX, Liu XY, Shan YF, Wei B, Chen S, *et al.* TRIM21 is essential to sustain IFN regulatory factor 3 activation during antiviral response. *Journal of immunology* 2009, **182**(6): 3782-3792.
340. Lei CQ, Zhang Y, Xia T, Jiang LQ, Zhong B, Shu HB. FoxO1 negatively regulates cellular antiviral response by promoting degradation of IRF3. *The Journal of biological chemistry* 2013, **288**(18): 12596-12604.
341. Suzuki H, Chiba T, Kobayashi M, Takeuchi M, Suzuki T, Ichiyama A, *et al.* IkappaBalpha ubiquitination is catalyzed by an SCF-like complex containing Skp1, cullin-1, and two F-box/WD40-repeat proteins, betaTrCP1 and betaTrCP2. *Biochemical and biophysical research communications* 1999, **256**(1): 127-132.
342. Arimoto K, Funami K, Saeki Y, Tanaka K, Okawa K, Takeuchi O, *et al.* Polyubiquitin conjugation to NEMO by tripartite motif protein 23 (TRIM23) is critical in antiviral defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(36): 15856-15861.
343. Zotti T, Uva A, Ferravante A, Vessichelli M, Scudiero I, Ceccarelli M, *et al.* TRAF7 protein promotes Lys-29-linked polyubiquitination of IkappaB kinase (IKKgamma)/NF-kappaB essential modulator (NEMO) and p65/RelA protein and represses NF-kappaB activation. *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**(26): 22924-22933.
344. Tokunaga F, Sakata S, Saeki Y, Satomi Y, Kirisako T, Kamei K, *et al.* Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. *Nature cell biology* 2009, **11**(2): 123-132.
345. Belgnaoui SM, Paz S, Samuel S, Goulet ML, Sun Q, Kikkert M, *et al.* Linear ubiquitination of NEMO negatively regulates the interferon antiviral response through disruption of the MAVS-TRAF3 complex. *Cell host & microbe* 2012, **12**(2): 211-222.
346. Rahighi S, Ikeda F, Kawasaki M, Akutsu M, Suzuki N, Kato R, *et al.* Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation. *Cell* 2009, **136**(6): 1098-1109.
347. Bignell GR, Warren W, Seal S, Takahashi M, Rapley E, Barfoot R, *et al.* Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nature genetics* 2000, **25**(2): 160-165.
348. Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israel A, Wallach D, Courtois G. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* 2003, **424**(6950): 801-805.
349. Friedman CS, O'Donnell MA, Legarda-Addison D, Ng A, Cardenas WB, Yount JS, *et al.* The tumour suppressor CYLD is a negative regulator of RIG-I-mediated antiviral response. *EMBO reports* 2008, **9**(9): 930-936.
350. Zhang M, Wu X, Lee AJ, Jin W, Chang M, Wright A, *et al.* Regulation of IkappaB kinase-related kinases and antiviral responses by tumor suppressor CYLD. *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**(27): 18621-18626.
351. Kayagaki N, Phung Q, Chan S, Chaudhari R, Quan C, O'Rourke KM, *et al.* DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production. *Science* 2007, **318**(5856): 1628-1632.
352. Li S, Zheng H, Mao AP, Zhong B, Li Y, Liu Y, *et al.* Regulation of virus-triggered signaling by OTUB1- and OTUB2-mediated deubiquitination of TRAF3 and TRAF6. *The Journal of biological chemistry* 2010, **285**(7): 4291-4297.
353. Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, *et al.* De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* 2004, **430**(7000): 694-699.
354. Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, Tsui C, *et al.* The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nature immunology* 2004, **5**(10): 1052-1060.
355. Lin R, Yang L, Nakhaei P, Sun Q, Sharif-Askari E, Julkunen I, *et al.* Negative regulation of the retinoic acid-inducible gene I-induced antiviral state by the ubiquitin-editing protein A20. *The Journal of biological chemistry* 2006, **281**(4): 2095-2103.

356. Saitoh T, Yamamoto M, Miyagishi M, Taira K, Nakanishi M, Fujita T, *et al.* A20 is a negative regulator of IFN regulatory factor 3 signaling. *Journal of immunology* 2005, **174**(3): 1507-1512.
357. Wang YY, Li L, Han KJ, Zhai Z, Shu HB. A20 is a potent inhibitor of TLR3- and Sendai virus-induced activation of NF-kappaB and ISRE and IFN-beta promoter. *FEBS letters* 2004, **576**(1-2): 86-90.
358. Gao L, Coope H, Grant S, Ma A, Ley SC, Harhaj EW. ABIN1 protein cooperates with TAX1BP1 and A20 proteins to inhibit antiviral signaling. *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**(42): 36592-36602.
359. Helgason E, Phung QT, Dueber EC. Recent insights into the complexity of Tank-binding kinase 1 signaling networks: the emerging role of cellular localization in the activation and substrate specificity of TBK1. *FEBS letters* 2013, **587**(8): 1230-1237.
360. Li S, Wang L, Berman M, Kong YY, Dorf ME. Mapping a dynamic innate immunity protein interaction network regulating type I interferon production. *Immunity* 2011, **35**(3): 426-440.
361. Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, Kim SY, Moody SE, Dunn IF, *et al.* Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* 2009, **462**(7269): 108-112.
362. Heo JM, Ordureau A, Paulo JA, Rinehart J, Harper JW. The PINK1-PARKIN Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy. *Molecular cell* 2015, **60**(1): 7-20.
363. Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, *et al.* The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 2015, **524**(7565): 309-314.
364. Liu S, Cai X, Wu J, Cong Q, Chen X, Li T, *et al.* Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science* 2015, **347**(6227): aaa2630.
365. Goncalves A, Burckstummer T, Dixit E, Scheicher R, Gorna MW, Karayel E, *et al.* Functional dissection of the TBK1 molecular network. *PloS one* 2011, **6**(9): e23971.
366. Ma X, Helgason E, Phung QT, Quan CL, Iyer RS, Lee MW, *et al.* Molecular basis of Tank-binding kinase 1 activation by transautophosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**(24): 9378-9383.
367. Chien Y, Kim S, Bumeister R, Loo YM, Kwon SW, Johnson CL, *et al.* RalB GTPase-mediated activation of the IkappaB family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival. *Cell* 2006, **127**(1): 157-170.
368. Vertii A, Ivshina M, Zimmerman W, Hehnlly H, Kant S, Doxsey S. The Centrosome Undergoes Plk1-Independent Interphase Maturation during Inflammation and Mediates Cytokine Release. *Developmental cell* 2016, **37**(4): 377-386.
369. Fujita F, Taniguchi Y, Kato T, Narita Y, Furuya A, Ogawa T, *et al.* Identification of NAP1, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling. *Molecular and cellular biology* 2003, **23**(21): 7780-7793.
370. Zhou AY, Shen RR, Kim E, Lock YJ, Xu M, Chen ZJ, *et al.* IKKepsilon-mediated tumorigenesis requires K63-linked polyubiquitination by a cIAP1/cIAP2/TRAF2 E3 ubiquitin ligase complex. *Cell reports* 2013, **3**(3): 724-733.
371. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996, **87**(1): 13-20.
372. Schwamborn K, Weil R, Courtois G, Whiteside ST, Israel A. Phorbol esters and cytokines regulate the expression of the NEMO-related protein, a molecule involved in a NF-kappa B-independent pathway. *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(30): 22780-22789.
373. Zhu G, Wu CJ, Zhao Y, Ashwell JD. Optineurin negatively regulates TNFalpha-induced NF-kappaB activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP. *Current biology : CB* 2007, **17**(16): 1438-1443.
374. Nagabhushana A, Bansal M, Swarup G. Optineurin is required for CYLD-dependent inhibition of TNFalpha-induced NF-kappaB activation. *PloS one* 2011, **6**(3): e17477.
375. Sudhakar C, Nagabhushana A, Jain N, Swarup G. NF-kappaB mediates tumor necrosis factor alpha-induced expression of optineurin, a negative regulator of NF-kappaB. *PloS one* 2009, **4**(4): e5114.

376. Tolosa L, Caraballo-Miralles V, Olmos G, Llado J. TNF-alpha potentiates glutamate-induced spinal cord motoneuron death via NF-kappaB. *Molecular and cellular neurosciences* 2011, **46**(1): 176-186.
377. Munitic I, Giardino Torchia ML, Meena NP, Zhu G, Li CC, Ashwell JD. Optineurin insufficiency impairs IRF3 but not NF-kappaB activation in immune cells. *Journal of immunology* 2013, **191**(12): 6231-6240.
378. Slowicka K, Vereecke L, Mc Guire C, Sze M, Maelfait J, Kolpe A, *et al.* Optineurin deficiency in mice is associated with increased sensitivity to Salmonella but does not affect proinflammatory NF-kappaB signaling. *European journal of immunology* 2016, **46**(4): 971-980.
379. Morton S, Hesson L, Peggie M, Cohen P. Enhanced binding of TBK1 by an optineurin mutant that causes a familial form of primary open angle glaucoma. *FEBS letters* 2008, **582**(6): 997-1002.
380. Mankouri J, Fragkoudis R, Richards KH, Wetherill LF, Harris M, Kohl A, *et al.* Optineurin negatively regulates the induction of IFNbeta in response to RNA virus infection. *PLoS pathogens* 2010, **6**(2): e1000778.
381. Gleason CE, Ordureau A, Gourlay R, Arthur JS, Cohen P. Polyubiquitin binding to optineurin is required for optimal activation of TANK-binding kinase 1 and production of interferon beta. *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**(41): 35663-35674.
382. Genin P, Cuvelier F, Lambin S, Corte-Real Filipe J, Autrusseau E, Laurent C, *et al.* Optineurin regulates the interferon response in a cell cycle-dependent manner. *PLoS pathogens* 2015, **11**(4): e1004877.
383. Obaid R, Wani SE, Azfer A, Hurd T, Jones R, Cohen P, *et al.* Optineurin Negatively Regulates Osteoclast Differentiation by Modulating NF-kappaB and Interferon Signaling: Implications for Paget's Disease. *Cell reports* 2015, **13**(6): 1096-1102.
384. Meena NP, Zhu G, Mittelstadt PR, Giardino Torchia ML, Pourcelot M, Arnoult D, *et al.* The TBK1-binding domain of optineurin promotes type I interferon responses. *FEBS letters* 2016, **590**(10): 1498-1508.
385. Laplantine E, Fontan E, Chiaravalli J, Lopez T, Lakisic G, Veron M, *et al.* NEMO specifically recognizes K63-linked poly-ubiquitin chains through a new bipartite ubiquitin-binding domain. *The EMBO journal* 2009, **28**(19): 2885-2895.
386. Larabi A, Devos JM, Ng SL, Nanao MH, Round A, Maniatis T, *et al.* Crystal structure and mechanism of activation of TANK-binding kinase 1. *Cell reports* 2013, **3**(3): 734-746.
387. Schwartz-Cornil I, Mertens PP, Contreras V, Hemati B, Pascale F, Breard E, *et al.* Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Veterinary research* 2008, **39**(5): 46.
388. Chauveau E, Doceul V, Lara E, Adam M, Breard E, Sailleau C, *et al.* Sensing and control of bluetongue virus infection in epithelial cells via RIG-I and MDA5 helicases. *Journal of virology* 2012, **86**(21): 11789-11799.
389. Ruscanu S, Pascale F, Bourge M, Hemati B, Elhmouzi-Younes J, Urien C, *et al.* The double-stranded RNA bluetongue virus induces type I interferon in plasmacytoid dendritic cells via a MYD88-dependent TLR7/8-independent signaling pathway. *Journal of virology* 2012, **86**(10): 5817-5828.
390. Chauveau E, Doceul V, Lara E, Breard E, Sailleau C, Vidalain PO, *et al.* NS3 of bluetongue virus interferes with the induction of type I interferon. *Journal of virology* 2013, **87**(14): 8241-8246.
391. Ratnier M, Shaw AE, Barry G, Gu Q, Di Gialleonardo L, Janowicz A, *et al.* Bluetongue Virus NS4 Protein Is an Interferon Antagonist and a Determinant of Virus Virulence. *Journal of virology* 2016, **90**(11): 5427-5439.
392. Unterholzner L, Sumner RP, Baran M, Ren H, Mansur DS, Bourke NM, *et al.* Vaccinia virus protein C6 is a virulence factor that binds TBK-1 adaptor proteins and inhibits activation of IRF3 and IRF7. *PLoS pathogens* 2011, **7**(9): e1002247.
393. Alff PJ, Sen N, Gorbunova E, Gavrilovskaya IN, Mackow ER. The NY-1 hantavirus Gn cytoplasmic tail coprecipitates TRAF3 and inhibits cellular interferon responses by disrupting TBK1-TRAF3 complex formation. *Journal of virology* 2008, **82**(18): 9115-9122.

394. Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov VV, Brady NR, *et al.* Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* 2011, **333**(6039): 228-233.
395. Korac J, Schaeffer V, Kovacevic I, Clement AM, Jungblut B, Behl C, *et al.* Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates. *Journal of cell science* 2013, **126**(Pt 2): 580-592.
396. Richter B, Sliter DA, Herhaus L, Stolz A, Wang C, Beli P, *et al.* Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2016, **113**(15): 4039-4044.
397. Cirulli ET, Lasseigne BN, Petrovski S, Sapp PC, Dion PA, Leblond CS, *et al.* Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science* 2015, **347**(6229): 1436-1441.
398. Kachaner D, Filipe J, Laplantine E, Bauch A, Bennett KL, Superti-Furga G, *et al.* Plk1-dependent phosphorylation of optineurin provides a negative feedback mechanism for mitotic progression. *Molecular cell* 2012, **45**(4): 553-566.
399. Shimada T, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Inoue J, Tatsumi Y, *et al.* IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases. *International immunology* 1999, **11**(8): 1357-1362.
400. Perry AK, Chow EK, Goodnough JB, Yeh WC, Cheng G. Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll- like receptor activation and viral infection. *The Journal of experimental medicine* 2004, **199**(12): 1651-1658.
401. Siednienko J, Gajanayake T, Fitzgerald KA, Moynagh P, Miggin SM. Absence of MyD88 results in enhanced TLR3-dependent phosphorylation of IRF3 and increased IFN-beta and RANTES production. *Journal of immunology* 2011, **186**(4): 2514-2522.

Implication de l'ubiquitination et de l'appareil de Golgi dans l'activation de TBK1 après détection des ARNs viraux

Mots clés : Immunité Innée Antivirale, Interférons, PRR (Pattern Recognition Receptors), TBK1 (TANK-Binding kinase), Ubiquitination, Optineurine.

L'immunité innée antivirale repose en grande partie sur la production des interférons de type I (IFN- α/β) par les cellules infectées et les cellules immunitaires. Cette synthèse résulte de la reconnaissance de motifs viraux caractéristiques par des récepteurs cellulaires, parmi lesquels les RIG-I-Like Récepteurs (RLR) et le Toll-Like Récepteur 3 (TLR3) détectent l'ARN viral respectivement au niveau du cytosol et des endosomes. La signalisation induite par les RLRs et TLR3 conduit à l'activation d'IRF3 et de NF- κ B, deux facteurs de transcription impliqués respectivement dans la production d'IFN- α/β et de cytokines pro-inflammatoires. TBK1 (TANK-Binding Kinase 1) joue un rôle essentiel dans l'immunité innée antivirale, de par la phosphorylation du facteur de transcription IRF3, nécessaire à la production des IFNs de type I. Bien que de nombreuses études aient montré le rôle crucial de cette kinase dans la signalisation antivirale, le processus entraînant son activation est encore mal déterminé à ce jour. Lors de cette étude nous avons démontré que suite à la stimulation du TLR3 et des RLRs, la forme active, ubiquitinylée et phosphorylée, de TBK1 se relocalise au niveau de l'appareil de Golgi, grâce à son ubiquitination sur les résidus K30 et K401. Ce mécanisme implique la reconnaissance des chaînes d'ubiquitines associées à TBK1 par l'Optineurine (OPTN), permettant la formation d'un complexe autorisant le rapprochement des molécules de TBK1 puis la trans-autophosphorylation au niveau de l'appareil de Golgi. Au cours de ce travail nous avons également découvert qu'OPTN est la cible d'une protéine virale, la protéine NS3 du BTV (Bluetongue Virus), qui neutralise son activité et diminue ainsi l'activation de TBK1 et la signalisation responsable de la sécrétion de cytokines antivirales.

Ubiquitination and Golgi apparatus involvement in TBK1 activation after viral RNAs detection

Keywords : Antiviral Innate Immunity, Interferons, PRR (Pattern Recognition Receptors), TBK1 (TANK-Binding kinase), Ubiquitination, Optineurin.

Type-I interferons (IFN- α/β) production and release is a major event in innate antiviral immunity. IFN production depends on the interaction between viral structures and their corresponding cellular sensors. RIG-I-Like Receptors (RLRs) and Toll-Like Receptor 3 (TLR3) sense dsRNAs in the cytosol and endosomes respectively. Stimulation of these receptors by their ligands promotes a signal transduction leading to the activation of the transcription factors NF- κ B and IRF3, and consequently to the production of proinflammatory cytokines and Type I Interferons (IFN-I). TBK1 (TANK-Binding Kinase 1), plays a crucial role in antiviral innate immunity, by phosphorylating the transcription factor IRF3, required for the production of type I IFNs. Although many studies have shown the critical role of this kinase in antiviral signaling, the molecular mechanism of its activation are largely unknown. We report here the localization of the ubiquitinated and phosphorylated active form of TBK1 to the Golgi apparatus after the stimulation of RLRs or TLR3, due to TBK1 ubiquitination on lysine residues 30 and 401. The ubiquitin-binding protein optineurin (OPTN) recruits ubiquitinated TBK1 to the Golgi apparatus, leading to the formation of complexes in which TBK1 is activated by trans-autophosphorylation. We also found that a viral protein binds OPTN at the Golgi apparatus, neutralizing its activity and thereby decreasing TBK1 activation and downstream signaling.