



# Rôle de l'autophagie sélective au cours de l'infection par le VIH-1 des lymphocytes T CD4

Coralie Daussy

## ► To cite this version:

Coralie Daussy. Rôle de l'autophagie sélective au cours de l'infection par le VIH-1 des lymphocytes T CD4. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONTT071 . tel-01557546

**HAL Id: tel-01557546**

**<https://theses.hal.science/tel-01557546>**

Submitted on 6 Jul 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.

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par **l'Université de Montpellier (UM)**

Préparée au sein de l'école doctorale **n° 168 CBS2**  
Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Et de l'unité de recherche CPBS FRE 3689  
Centre d'étude d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour  
la Santé

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Présentée par **Coralie DAUSSY**

**Rôle de l'autophagie sélective au cours de  
l'infection par le VIH-1 des  
lymphocytes T CD4**

Soutenue le 16 septembre 2016 devant le jury composé de

Mme Audrey ESCLATINE, Professeur UPSud, I2BC, Gif-sur-Yvette	Rapporteur
Mme Marlène DREUX, Chargée de Recherche, CIRI, Lyon	Rapporteur
Mme Alessia ZAMBORLINI, Maître de Conférences, IUH, Paris	Examineur
Mr Michel VIDAL, Directeur de Recherche, DIMNP, Montpellier	Examineur
Mr Bruno BEAUMELLE, Directeur de Recherche, CPBS, Montpellier	Examineur
Mme Lucile ESPERT, Chargée de Recherche, CPBS, Montpellier	Directeur de thèse



## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres de mon jury de m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse et d'évaluer mes travaux. Je remercie sincèrement Audrey Esclatine et Marlène Dreux d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et d'avoir pris le temps d'en faire une lecture critique et éclairée. Merci pour vos commentaires qui ont permis d'améliorer ce manuscrit. Merci également à Michel Vidal, Alessia Zamborlini et Bruno Beaumelle d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail. Merci à Jean-Michel Mesnard, pour m'avoir permis de travailler et de soutenir au CPBS.

Je souhaiterais tout d'abord remercier Lucile, ma directrice de thèse. Tu m'as non seulement encadrée, dirigée, formée mais aussi écoutée, conseillée, fait grandir : j'espère avoir retenu tous tes enseignements. Merci (non seulement pour m'avoir offert un premier verre d'eau) de m'avoir accompagnée, fait confiance et rendue indépendante. Merci pour ce beau projet de thèse qui m'a passionné du début à la fin. Merci pour ton optimisme, à chaque expérience : cette capacité à voir du beau, non seulement dans chacun de mes Western Blots, mais aussi dans la vie en générale a été réellement inspirant. Et tant d'autres « Merci ! », qui seraient sans doute trop longs à lister ici.

Je n'oublie pas le reste de l'équipe « Autophagie et Infections » qui a hautement contribué à ce que ces trois dernières années soient à la fois formatrices et inoubliables... Merci à Martine de m'avoir accueillie dans son équipe, d'avoir répondu à toutes mes questions, de m'avoir initiée à l'escalade (et de m'avoir proposé de l'eau pétillante lors de notre première rencontre). Merci à Fabien, qui a été une source inépuisable de bibliographie et de conseils, et qui a compris ma passion des Minions. En particulier, un grand merci à Véro : merci d'avoir partagé ton expérience, tes protocoles, tes conseils. Merci également d'avoir su si bien prendre soin de moi. Notre première après-midi ensemble à Grasse est le parfait souvenir que je garderai de toi : pleine d'entrain, en chantant, avec qui on se sent immédiatement bien. Merci à Laure pour toute son aide, son organisation et nos discussions informelles. Merci à Jamal d'avoir instauré la tradition du paquet de « Lions » dans le bureau, j'espère que cela perdurera.

Merci pour vos réflexions, vos conseils, votre bonne humeur au quotidien. Travailler dans une équipe aussi motivée et motivante a été un vrai bonheur (auquel j'ai pris goût). Merci de m'avoir montré l'autophagie : je suis tombée dedans comme on peut tomber dans la marmite de potion magique, mais avec la ferme intention d'y rester. J'ai découvert un mécanisme passionnant, une communauté bienveillante et à l'écoute. En particulier, merci de m'avoir aidée à aller assister à la Gordon en Californie : c'est gravé à jamais en moi.

Merci à tous les membres du CPBS pour leur accueil, leur soutien, leurs discussions et la bonne ambiance que j'ai pu vivre au quotidien pendant 3 ans.

Merci à tous les doctorants et post-doctorants du CPBS que j'ai pu côtoyer pendant ces trois années. Merci à Elise et Adeline d'avoir su m'accueillir quand je n'étais encore qu'un « bébé canard ». Merci à Malvina et à Charlotte pour ces « pauses-clopes sans clope » : j'aurais eu plaisir à continuer l'aventure avec vous (et à découvrir d'autres séries). Merci à Charlotte qui a été mon rayon de soleil : tu as été un soutien incommensurable, une source constante de bonne humeur et de motivation (et de vidéos-photos en tout genre sur les chats), mieux qu'une camarade de classe de Gryffondor ! Merci à Éric pour sa sagesse, sa gentillesse, ses corrections en anglais, son indulgence : cela a été un plaisir de partager ce mandat de représentant de notre collège avec toi. Je vous souhaite à tous le meilleur pour la suite, vous le méritez !

Je tenais également à mentionner tous ceux qui m'ont soutenue en dehors du laboratoire. Cécile, tu as été là pendant trois ans, contre vents et marées, pour nos joggings hebdomadaires, nos (quelques) randonnées, la gardienne du double de mes clefs et mon contact en cas d'urgence (de toutes les urgences : bricolage,

transport, envie de nourriture, ...). Avec Lucie et Laura, merci pour ces parenthèses enchantées à Barcelone et à Lyon, et pour ces messages quotidiens qui remontent le moral.

Et enfin, merci à mes parents et à mon frère, qui m'ont entendue parler d'autophagie quasiment quotidiennement au téléphone pendant 3 ans et qui ont toujours eu la patience de m'écouter. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis, de m'avoir soutenue (et supportée) et de m'avoir amenée là où je suis aujourd'hui. Je sais la chance que j'ai de vous avoir à mes côtés.

## Titre

---

Rôle de l'autophagie sélective au cours de l'infection par le VIH-1 des lymphocytes T CD4

## Résumé

---

L'autophagie est un mécanisme de dégradation lysosomale ubiquitaire impliqué dans la lutte contre les infections. Les agents infectieux ont développé des stratégies pour éviter ou utiliser l'autophagie à leur profit. Cette dégradation peut être hautement sélective grâce à l'intervention de « récepteurs autophagiques », comme p62/SQSTM1, chargés de l'adressage de substrats à la machinerie autophagique grâce à leur interaction avec les protéines de la famille ATG8. Notre équipe a montré que les protéines d'enveloppe du VIH-1 (Env) déclenchent l'autophagie dans les lymphocytes T CD4. Lorsque ces cellules sont infectées de façon productive, le processus autophagique est bloqué par le virus. Au cours de ma thèse nous avons montré que l'autophagie exerce une fonction anti-VIH en dégradant sélectivement son transactivateur Tat, via son interaction avec p62. Au contraire, lorsque les cellules cibles ne sont pas productivement infectées, car le cycle viral est interrompu après l'étape d'entrée, l'autophagie n'est pas contrôlée et conduit à la mort par apoptose, suggérant que l'autophagie dégrade sélectivement un facteur de survie cellulaire. Mes travaux de thèse montrent qu'Env induit un stress oxydatif impliqué dans la mort par apoptose des cellules cibles non infectées. Nos résultats préliminaires suggèrent que les peroxysomes seraient des cibles de l'autophagie dans ces conditions. Ces organelles étant chargées de détoxifier la cellule, nous avons donc formulé l'hypothèse que l'autophagie, induite par Env, conduit à la dégradation sélective des peroxysomes, entraînant l'accumulation d'espèces oxydées dans les cellules cibles et ainsi, leur mort par apoptose.

## Mots clés / Key words

---

Autophagie sélective, VIH-1, immunité cellulaire, mort cellulaire, lymphocytes T CD4

Selective autophagy, HIV-1, cellular immunity, cell death, CD4 T lymphocytes

## Title

---

Role of selective autophagy during HIV-1 infection of the CD4 T lymphocytes

## Abstract

---

Autophagy is an ubiquitous degradation pathway involved in innate immunity. Numerous pathogens have therefore developed strategies to block or use the autophagy machinery to their own benefit. This degradation can be highly selective, thanks to the intervention of autophagy receptors, like p62/SQSTM1, involved in the specific targeting of substrates to autophagosomes after their interaction with the ATG8 family of autophagic proteins. Our team has demonstrated that the HIV-1 envelope proteins (Env) are responsible for autophagy triggering in CD4 T lymphocytes. If the target cells become productively infected, the autophagy process is blocked by the virus. During my thesis, we report that autophagy exerts an anti-HIV effect by selectively degrading the HIV-1 transactivator Tat, via its interaction with p62. On the contrary, if the target cells are not productively infected because the viral cycle is interrupted after the entry step, autophagy is not controlled and leads to apoptosis. These results suggest that the degradation of cellular components could be responsible for the induction of apoptosis. My thesis work indicates that Env induces an oxidative stress in the uninfected target cells and that this stress is involved in their death. Our preliminary results suggest that the peroxisomes would be targeted to autophagic degradation in these conditions. As these organelles are involved in the detoxification of the cells, we have made the assumption that Env-induced autophagy triggers the selective degradation of these peroxisomes that leads to the accumulation of reactive oxygen species, and ultimately to apoptotic cell death.

## Laboratoire

---

Equipe "Autophagie et Infections"

Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS)

FRE3689 CNRS / UM

1919 route de Mende

34293 MONTPELLIER Cedex 5

## Abréviations

---

3-MA	3-Méthyladénine
AA	Acides Aminés
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ALFY	Autophagy-linked FYVE protein
AMPK	AMP-activated protein kinase
AP	Anti-protéases (e64d + pepstatine A)
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like
ARN	Acide Ribonucléique
ASP	Anti Sens Protein
ATG	Autophagy-related
ATP	Adénosine triphosphate
BafA1	Bafilomycine A1
Bcl	B-cell lymphoma
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19 kd-interacting protein
BST-2	Bone marrow stromal cell antigen 2
CC	Domaine coiled-coil
CDC	Center of Disease Control
CHIKV	Virus du Chikungunya
CMA	Chaperon mediated Autophagy
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes
C-term	Extrémité C-terminale
CVB3	Coxsackievirus B3
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAPK	Death associated protein kinase
DC	Cellule dendritique
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DFCP1	Double FYVE-containing protein 1
DRAM1	Damage-Regulated Autophagy Modulator 1
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
Env	Enveloppe du VIH
ESCRT	Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
FIP200	FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfert

FUNDC1	FUN14 Domain Containing 1
GABARAP	GABAA receptor-associated protein
Gag	Group-specific antigen
GFP	Green fluorescent protein
HBV	Virus de l'hépatite B
HCMV	Cytomégalo­virus humain
HCV	Virus de l'hépatite C
HDAC	Histone déacétylase
HSC	Heat shock cognate proteins
HSPG	Heparan Sulfate Proteoglycans
HSV-1	Virus Herpes simplex de type 1
HTLV-1	Virus T-lymphotropique humain de type 1
HTRF	Homogeneous Time Resolved Fluorescence
IFN	Interféron
IL	Interleukine
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
LAMP	Lysosomal-associated membrane protein
LIR	LC3-interacting region
LT	Lymphocytes T
LTR	Long Terminal Repeat
MAP-LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
MEF	Fibroblastes embryonnaires de souris
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NBR1	Neighbour of breast cancer early-onset 1 gene 1
NDP52	Nuclear dot protein 52
Nef	Negative Regulatory Factor
Nix	NIP3-like protein X
NLR	NOD like receptor
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
N-term	Extrémité N-terminale
OMS	Organisation mondiale de la Santé
OPTN	Optineurine
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase



PAS	Pre autophagosomal structure
PB1	Phox and BEM1 domain
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PE	Phosphatidylethanolamine
PI(4,5)P2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PI3P	Phosphatidylinositol-3-phosphate
PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
PKR	dsRNA-dependent protein kinase
PMP	Peroxisomal membrane protein
Pol	Polymerase
PRR	Pattern recognition receptors
P-TEFb	Positive transcription elongation factor
RE	Réticulum endoplasmique
Rev	Regulator of Expression of Viral proteins
RLR	Rig like receptors
ROS	Reactive Oxygen species ou Espèces réactives de l'oxygène
SCV	Salmonella containing vesicle
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SKICH	SKIP carboxyl homology
SLR	Sequestosome 1-like receptors
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein Receptor
SQSTM1	Séquestosome 1 (p62)
Stbd1	Starch-binding-domain-containing protein 1
T6BP	TRAF6-binding protein
TAR	Trans-activation response element
Tat	Transactivator of transcription
TBK1	TANK (tumour-necrosis-factor-receptor- associated factor-associated nuclear factor $\kappa$ B activator)-binding kinase 1
TGF $\beta$	Facteur de croissance transformant
TLR	Toll like receptor
TM	Domaine transmembranaire
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
TRIM	Tripartite motif
UBA	Ubiquitin-associated domain
UBAN	Ubiquitin binding in ABIN and NEMO domain
UBZ	Ubiquitin-binding zinc finger

UPR	Unfolded protein response
UPS	Ubiquitin Proteasome System
UVRAG	UV Radiation Resistance Associated Gene
Vif	Viral infectivity factor
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
Vpr	Viral protein R
Vpu	Viral protein U
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire
VZV	Virus varicella zona
WIPI	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1
ZZ	domaine en doigt de zinc de type ZZ

# Table des matières

---

<b>Index des illustrations .....</b>	<b>12</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>13</b>
I. Le VIH .....	15
A. Infection par le VIH .....	15
1. Historique / Classification .....	15
2. Epidémiologie .....	16
3. Physiopathologie de l'infection .....	17
B. Structure du virus .....	20
1. Particule virale.....	20
2. Organisation du génome .....	21
a) Généralités .....	21
b) Protéines de structure.....	22
c) Protéines régulatrices.....	23
d) Protéines auxiliaires .....	24
C. Cycle viral.....	25
1. Entrée virale .....	26
2. Transcription inverse.....	27
3. Import nucléaire et intégration .....	28
4. Transcription .....	28
5. Assemblage et maturation .....	28
D. La protéine virale Tat.....	29
1. Structure et organisation de la protéine .....	29
2. Rôles et fonctions de Tat.....	30
a) Synthèse des transcrits viraux.....	30
b) Tat extracellulaire.....	31
II. L'autophagie.....	35
A. Histoire de l'autophagie .....	35
B. Le processus autophagique .....	36
1. Les différentes formes d'autophagie .....	36
a) Microautophagie .....	36
b) La CMA ou l'autophagie dépendante des chaperonnes .....	37
c) Macroautophagie .....	37
2. Mécanisme moléculaire de la macroautophagie .....	39

a)	Initiation .....	40
b)	Elongation.....	43
c)	Maturation et recyclage .....	47
3.	L'autophagie sélective.....	48
a)	Rôle important dans la macroautophagie.....	48
b)	Les récepteurs de l'autophagie sélective .....	50
c)	Interaction avec ATG8 via le LIR .....	56
d)	Différentes formes d'autophagie sélective .....	57
e)	La pexophagie.....	58
III.	Rôle de l'autophagie dans l'équilibre entre la survie et la mort cellulaire .....	60
A.	L'autophagie : un mécanisme de survie .....	60
B.	L'autophagie en tant que mécanisme de mort cellulaire .....	61
C.	Autophagie et apoptose : des mécanismes intimement liés.....	62
IV.	Rôle de l'autophagie au cours des infections virales .....	64
A.	Autophagie et défense contre les agents pathogènes .....	64
B.	Relation autophagie/virus .....	65
1.	L'autophagie : un mécanisme antiviral détourné par les virus .....	65
a)	Induction de l'autophagie par les virus .....	65
b)	Implication dans la réponse immunitaire antivirale.....	67
c)	Echappement de l'autophagie par les virus .....	70
2.	Détournement de l'autophagie par les virus .....	71
C.	Autophagie sélective au cours des infections virales .....	73
1.	Virophagie .....	73
2.	Inhibition de l'autophagie sélective par les virus .....	75
V.	Rôle de l'autophagie au cours de l'infection par le VIH-1 .....	77
1.	Dans les cellules T CD4 .....	77
a)	Infectées .....	77
b)	Non infectées .....	78
2.	Dans les autres types cellulaires .....	80
	<b>Objectifs .....</b>	<b>85</b>
	<b>Résultats .....</b>	<b>91</b>
I.	Dégradation sélective de Tat par autophagie .....	93
A.	Introduction et contexte .....	93
B.	Article.....	95
C.	Discussion et perspectives .....	109
II.	Rôle de l'autophagie sélective dans la mort par apoptose des lymphocytes T CD4 non infectés après contact avec Env.....	111

A.	Introduction et contexte.....	111
B.	Résultats .....	111
1.	Modèles cellulaires utilisés .....	111
2.	L'autophagie induite par Env est nécessaire au déclenchement de l'apoptose des lymphocytes T CD4 non infectés .....	113
3.	Les ROS sont impliqués dans la mort des lymphocytes T CD4 induite par Env.....	115
a)	Env induit la production de ROS.....	115
b)	Les protéines cellulaires totales sont oxydées en réponse à Env .....	116
c)	Le blocage des ROS inhibe la mort cellulaire induite par Env .....	117
4.	Les peroxysomes sont adressés à l'autophagie en réponse à Env.....	118
a)	Microscopie électronique.....	118
b)	Colocalisation entre LC3 et les marqueurs des peroxysomes .....	119
c)	Dégradation par autophagie des marqueurs de peroxysome en réponse à Env .....	120
C.	Discussion .....	121
III.	Matériel et méthodes.....	124
A.	Culture cellulaire.....	124
B.	Transfection .....	124
C.	Réactifs et anticorps .....	124
D.	HTRF.....	125
E.	Analyse par Western Blot .....	125
F.	OxyBlot .....	126
G.	Immunofluorescence.....	126
H.	Evaluation de la production de ROS .....	127
I.	Microscopie électronique à transmission.....	127
J.	Statistiques .....	127
	<b>Discussion générale .....</b>	<b>129</b>
	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>137</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>161</b>

## Table des illustrations

Figure 1. Estimation du nombre : de nouvelles infections / de personnes vivant avec le VIH / de décès liés au SIDA en 2014 – Source ONUSIDA .....	17
Figure 2. Histoire naturelle de l'infection par le VIH-1.....	18
Figure 3. Structure du VIH. ....	21
Figure 4. Organisation du génome viral .....	22
Figure 5. Cycle de réplication du VIH-1. ....	26
Figure 6. Entrée du virus .....	27
Figure 7. La protéine Tat du VIH-1. ....	30
Figure 8. Rôle de Tat dans la transcription du VIH-1.....	31
Figure 9. Transport de Tat, une protéine intra- et extracellulaire .....	33
Figure 10. Autophagie. ....	35
Figure 11. Schéma des différentes formes d'autophagie .....	38
Figure 12. La machinerie de l'autophagie .....	40
Figure 13. Régulation du complexe ULK par mTOR.....	42
Figure 14. Le complexe PI3K de classe III et ses partenaires.....	43
Figure 15. Les systèmes de conjugaison de l'autophagie. ....	45
Figure 16. Les différentes méthodes d'analyse de l'autophagie. ....	47
Figure 17. Modèle de l'autophagie sélective. ....	49
Figure 18. Les récepteurs de l'autophagie sélective .....	51
Figure 19. Mécanismes de la pexophagie chez les mammifères .....	59
Figure 20. Modulation de l'autophagie par les virus .....	73
Figure 21. Rôle de l'autophagie dans les lymphocytes T CD4 durant l'infection par le VIH-1 .....	80
Figure 22. Relations entre autophagie et VIH dans ses cellules cibles.....	83
Figure 23. Liens entre l'autophagie et le VIH-1 dans les lymphocytes T CD4. ....	88
Figure 24. Modèle de la dégradation sélective de Tat par autophagie.....	94
Figure 25. Modèle d'étude 1 .....	112
Figure 26. Modèle d'étude 2 .....	112
Figure 27. Modèle de la voie de signalisation déclenchée par Env.....	113
Figure 28. Principe de la détection de la PARP clivée par HTRF.....	114
Figure 29. La protéine PARP est clivée après contact avec Env .....	115
Figure 30. Analyse de la production de ROS intracellulaire .....	116
Figure 31. Détection des protéines oxydées en réponse à Env. ....	117
Figure 32. Le NAC inhibe la mort cellulaire induite par Env.....	118
Figure 33. Présence de certaines structures non déterminées dans les autophagosomes en TEM.....	119
Figure 34. Colocalisations potentielles entre PEX14/PMP70 et LC3 en immunofluorescence .....	120
Figure 35. Quantification des niveaux d'expression de PMP70 et PEX14 après contact avec Env .....	121
Figure 36. Effet des protéines virales sur l'autophagie .....	132
Tableau 1. Classification des différents sous-types du VIH.....	16
Tableau 2. Les protéines du VIH et leur fonction .....	25
Tableau 3. Différents types de l'autophagie sélective en fonction du substrat dégradé et récepteur(s) associé(s). ....	57
Tableau 4. Autophagie sélective et infections virales .....	76

# Introduction





## I. Le VIH

---

### A. Infection par le VIH

#### 1. Historique / Classification

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent étiologique du Syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). C'est un Lentivirus de la famille des *Retroviridae* qui infecte les cellules immunitaires, majoritairement les lymphocytes T CD4 et les macrophages. Les rétrovirus sont des virus dont le génome est un ARN et sont caractérisés par la présence d'une enzyme (la transcriptase inverse ou *reverse transcriptase*) qui permet de transcrire cet ARN viral en ADN proviral. Cet ADN proviral peut ensuite s'intégrer dans le génome de la cellule hôte.

L'épidémie de VIH est décelée en 1981, lorsque le CDC d'Atlanta (*Center of Disease Control*) enregistre une augmentation du nombre de cas de pneumocystoses et de sarcome de Kaposi, qui est une forme rare de cancer affectant normalement les sujets immunodéprimés. Ces premiers cas sont d'abord identifiés chez des jeunes hommes homosexuels, puis très vite aussi chez des toxicomanes, des hémophiles et des hétérosexuels. Le virus en cause est isolé pour la première fois en 1983, en France à l'institut Pasteur par Françoise Barré-Sinoussi, alors sous la direction de Luc Montagnier (Barre-Sinoussi et al., 1983), puis aux Etats-Unis par Robert Gallo. Le prix Nobel de médecine sera attribué à Luc Montagnier et Françoise Barré-Sinoussi en 2008 pour cette découverte.

Deux types de virus ont été identifiés dès 1986 : le VIH-1 (étudié ici et dénommé « VIH »), qui est responsable de la pandémie, et le VIH-2, moins infectieux, et que l'on retrouve principalement en Afrique de l'Ouest (Clavel et al.; Rowland-Jones and Whittle, 2007). Au sein de chaque type du virus, il existe plusieurs groupes (Tableau 1), qui sont eux-mêmes divisés en sous-types : cela illustre la très grande diversité du VIH et sa variabilité génétique. On estime aujourd'hui qu'il y a eu au minimum quatre événements de contamination du singe à l'homme, ce qui a donné naissance à quatre lignées génétiques distinctes de VIH- 1 : les groupes M (Main), O (Outlier), N (Non-M/Non-O) et P (Plantier et al., 2009; Simon et al., 1998). Ils auraient franchi la barrière des espèces lors de chasses, par des morsures d'un singe infecté, par des écorchures lors du dépeçage de ces animaux, ou lors de la consommation de viande

de brousse. Le groupe M du VIH-1 est le virus responsable de la pandémie, c'est aussi celui qui présente la plus grande diversité génétique (Peeters et al.).

**Tableau 1. Classification des différents sous-types du VIH** (Eberle and Gürtler, 2012)

Type	Groupe	Origine	Remarques et observations
VIH-1	M (Major)	Chimpanzés	Virus responsable de la pandémie. Possède 9 sous types
	N (Non M non P)		Non pandémique, une dizaine d'infections
	O (Outlier)	Gorilles	Non pandémique, 1% du VIH-1 au Cameroun
	P		Non pandémique, 2 patients
VIH-2	A-B	Macaques	Moins virulent que le VIH-1
	C à H		Prévalence rare

## 2. Epidémiologie

Depuis le début de la pandémie, le VIH a fait plus de 34 millions de morts et reste donc une des principales causes de mortalité dans le monde. Cependant, la propagation du virus a été enrayée et inversée depuis quelques années. Les nouvelles infections ont en effet diminué de 35 % depuis les années 2000 et on a observé une chute de 42% du nombre de décès liés au SIDA depuis 2004. Ces résultats encourageants s'expliquent par les progrès réalisés en matière de prévention, de prophylaxie, de dépistage et d'accès aux traitements. Malgré les améliorations constatées au niveau mondial, l'épidémie reste un fléau en Afrique subsaharienne qui est la région du monde la plus durement touchée par l'infection (Figure 1). On observe aussi une recrudescence de l'infection chez les populations d'Europe de l'Est et d'Asie centrale. Malgré des progrès considérables dans la prise en charge des patients séropositifs grâce à l'utilisation de traitements efficaces (trithérapies), il n'existe pas de moyen de guérir de cette infection. En 2014, 36,9 millions de personnes vivaient avec le VIH (Figure 1) et à peine la moitié d'entre eux avait accès à la trithérapie (selon le rapport publié par l'organisation mondiale de la santé ou OMS et ONUSIDA).



Figure 1. Estimation du nombre : de nouvelles infections / de personnes vivant avec le VIH / de décès liés au SIDA en 2014 – Source ONUSIDA

### 3. Physiopathologie de l'infection

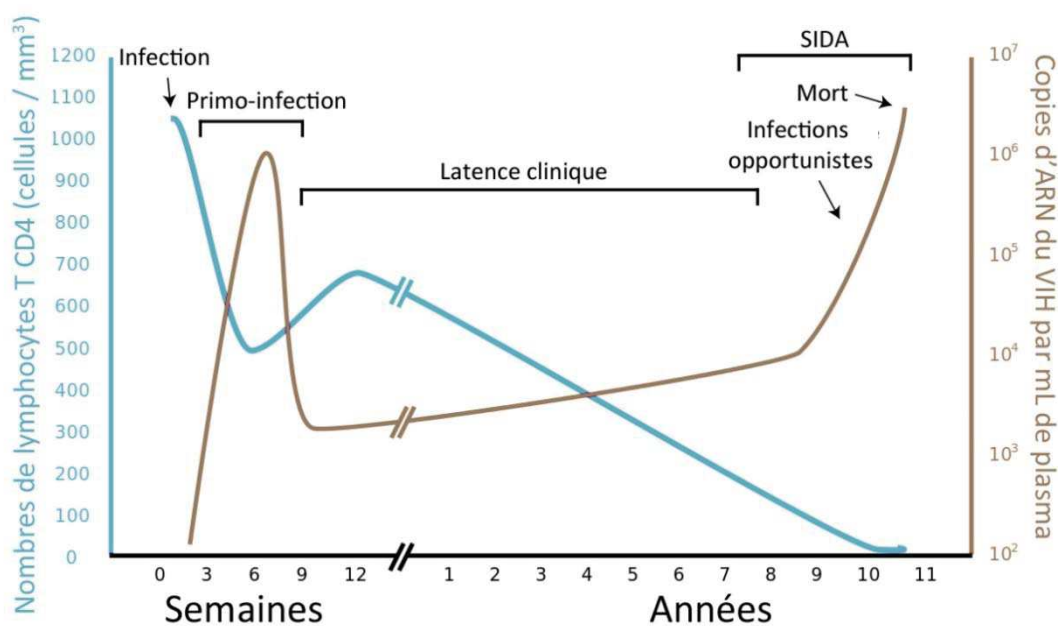
Au niveau physiopathologique, l'infection par le VIH se caractérise par la déplétion progressive du nombre de lymphocytes T (LT) CD4 provoquant, à plus ou moins long terme, l'effondrement complet du système immunitaire. Chez un patient sans traitement, l'évolution du VIH peut se résumer en 3 phases : la primo-infection, la latence et la phase SIDA (Figure 2).

Lors de la phase de **primo-infection** (qui dure de 3 à 6 semaines), le VIH envahit l'organisme et va coloniser les tissus lymphoïdes. On observe une multiplication exponentielle du virus et sa dissémination dans l'organisme. En parallèle, il y a une diminution du nombre de lymphocytes T CD4 car les lymphocytes détruits ne sont pas encore remplacés par les organes lymphoïdes. Leur nombre revient à la normale à la fin de cette phase, la charge virale diminue et une réponse immunitaire spécifique s'établit : c'est la séroconversion (Rosenberg et al., 2000). D'un point de vue clinique, les symptômes peuvent être ceux d'une grippe ou d'une angine ou passer inaperçus.

L'organisme connaît ensuite une phase **de latence asymptomatique**, pendant laquelle la réplication virale est partiellement contrôlée par le système immunitaire. Cette phase peut

durer plusieurs années durant lesquelles le virus et le système immunitaire sont en quelque sorte « à l'équilibre ». Toutefois, durant cette période, le taux de CD4 diminue peu à peu jusqu'à atteindre un seuil critique ( $<200$  cellules T CD4/mm<sup>3</sup>).

Le niveau très bas de lymphocyte T CD4 ne permet plus à l'hôte de contrôler l'infection et une réplication virale intense a lieu. La charge virale est alors inversement proportionnelle à la quantité de lymphocytes T CD4, entraînant alors l'apparition d'infections opportunistes : c'est la **phase SIDA**.



**Figure 2. Histoire naturelle de l'infection par le VIH-1**

*Evolution de la charge virale et des lymphocytes T CD4 au cours de la maladie chez les patients non traités.*

Certaines cellules (comme par exemple les CD4 mémoires) peuvent servir de réservoir : le virus y est intégré mais se réplique très faiblement, à bas bruit, pendant des années avant une éventuelle réactivation (Blankson et al., 2002; Cary et al., 2016). Ces cellules ne sont pas ciblées par la trithérapie, ce qui explique qu'on ne peut pour l'instant pas guérir le SIDA.

La diminution importante du nombre de lymphocytes T CD4 est vraiment caractéristique de l'infection par le VIH. Cette déplétion n'est pas due à un phénomène mais à plusieurs mécanismes combinés, comme l'effet cytopathique du virus, une activation chronique du système immunitaire (Younas et al., 2016) ou encore une induction de l'apoptose par certaines protéines virales (Varbanov et al., 2006). De manière intéressante, le nombre de

cellules infectées qui disparaissent n'est pas suffisant pour expliquer la perte importante de CD4 : c'est donc que la majorité des cellules qui meurent au cours de l'infection ne sont pas infectées (mort des cellules voisines appelées « bystanders »). Plusieurs études ont montré que ces bystanders présentaient les caractéristiques d'une mort par apoptose. L'une des premières preuves de ce concept a été apportée par Finkel et al ; ils ont en effet montré, dans des ganglions de patients séropositifs, que les cellules qui meurent par apoptose ne sont pas les cellules infectées mais les cellules non infectées situées à proximité (Finkel et al., 1995). Plusieurs travaux, dont ceux de mon équipe, ont montré que les protéines d'enveloppe du virus (Env) joueraient un rôle majeur dans la mort par apoptose des cellules T CD4 non infectées (Denizot et al., 2008; Espert et al., 2006). Env est composée de deux glycoprotéines, gp120 et gp41, associées en trimère à la surface des virus mais également à la surface des cellules infectées. L'interaction de Env avec ses récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules cibles constitue le tout premier événement du cycle de réplication du virus (voir chapitre I.C.1). Concernant le rôle de Env dans l'induction d'apoptose des LT CD4, il a notamment été montré que :

- La liaison de la gp120 à son récepteur (CD4) et à un de ses corécepteurs (CXCR4/CCR5) est importante pour induire la mort cellulaire (Biard-Piechaczyk et al., 1999; Jacotot et al., 1997). En effet, l'utilisation d'anticorps ou d'antagonistes dirigés contre CD4 et CXCR4 (comme l'AMD3100) permet de bloquer cette mort cellulaire (Blanco et al., 2000).
- Les voies de signalisation conventionnelles de CD4 et de CXCR4 ne sont pas impliquées (Biard-Piechaczyk et al., 2000)
- Plus récemment, notre équipe et celle de J. Esté ont montré que des inhibiteurs de fusion de la gp41 permettent de bloquer cette apoptose induite par Env (Blanco et al., 2003; Denizot et al., 2008). Cela prouve que pour être induite, l'apoptose nécessite le transfert de lipides via la gp41 entre les 2 membranes. C'est ce qu'on appelle le processus d'hémifusion, qui correspond à l'interaction transitoire des deux membranes où seuls les feuillettes externes se mélangent.

L'interaction entre l'enveloppe du virus et ses récepteurs/corécepteurs est très complexe : beaucoup de facteurs sont donc susceptibles de jouer un rôle dans l'induction de l'apoptose. Toutes les études réalisées permettent aujourd'hui de dire que ce mécanisme semble être

initié par la liaison de la gp120 à CD4 et CXCR4 mais que l'activité fusogénique de la gp41 joue aussi un rôle majeur.

La nature des voies de signalisation qui découlent de ces événements et mènent à l'induction de l'apoptose n'est pas encore totalement élucidée. Néanmoins, dans ce contexte, notre équipe a été pionnière dans la découverte du rôle de l'activité fusogénique de la gp41. En effet, notre groupe a montré que la gp41 est responsable du déclenchement de l'autophagie dans les cellules T CD4 non infectées. De façon inattendue, le déclenchement de ce processus est nécessaire pour conduire à la mort par apoptose de ces cellules, et donc, en partie, à leur disparition lors du SIDA (Denizot et al., 2008; Espert et al., 2006). Cet aspect sera plus longuement détaillé dans la partie VI.

Pour résumer, Env semble vraiment jouer un rôle prépondérant dans la physiopathologie de l'infection virale, car elle induit la mort des lymphocytes T CD4 non infectés, notamment via l'induction de l'autophagie. Cependant, ce mécanisme n'est pas unique et d'autres types de mort cellulaire ont aussi été très récemment mis en cause dans la mort des cellules T CD4 au cours de l'infection, telles la nécroptose (Pan et al., 2014) et la pyroptose (Doitsh et al., 2014).

## B. Structure du virus

### 1. Particule virale

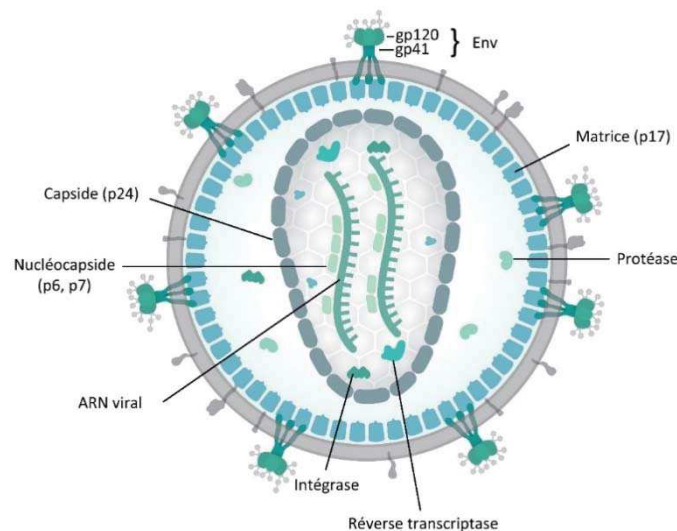
Le VIH est un virus enveloppé sphérique de 100 à 150 nm de diamètre, dont le génome est composé de deux copies identiques d'ARN simple brin de polarité positive (Figure 3). Trois enzymes sont également présentes :

- La reverse transcriptase qui rétrotranscrit l'ARN viral en ADN
- L'intégrase qui permet d'intégrer l'ADN proviral à l'ADN cellulaire
- La protéase, qui participe à la maturation et l'assemblage du virus en clivant les précurseurs de Gag et Gag-Pol

Le VIH dispose d'une enveloppe constituée d'une bicouche lipidique provenant de la membrane plasmique de la cellule hôte dans laquelle sont insérées les trimères de glycoprotéine d'enveloppe (Env). Chaque monomère de la protéine Env est formé de 2 sous-unités : une sous-unité de surface (la gp120) et une sous-unité transmembranaire (la gp41).

La protéine gp120 se fixe aux récepteurs cellulaires tandis que gp41 est responsable de la fusion des membranes virale et cellulaire. On peut aussi retrouver des protéines membranaires de la cellule hôte associées à la surface des virus.

Une matrice protéique se trouve ensuite à l'intérieur de l'enveloppe : elle est constituée de la protéine p17 (qui est codée par le gène gag) et elle est associée à la protéase. Au centre de la particule virale se trouve la capside protéique (p24, p7 et p6) qui renferme la reverse transcriptase, l'intégrase et le génome viral (étroitement associé au complexe de la nucléocapside). On retrouve aussi dans les virions les protéines auxiliaires Nef, Vpr, et Vif ainsi que des facteurs cellulaires (comme des protéines du cytosquelette, APOBEC (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*) ou encore des protéines du complexe ESCRT-1 (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*)).



**Figure 3. Structure du VIH**

Adapté de Thomas Splettstoesser ([www.scistyle.com](http://www.scistyle.com)).

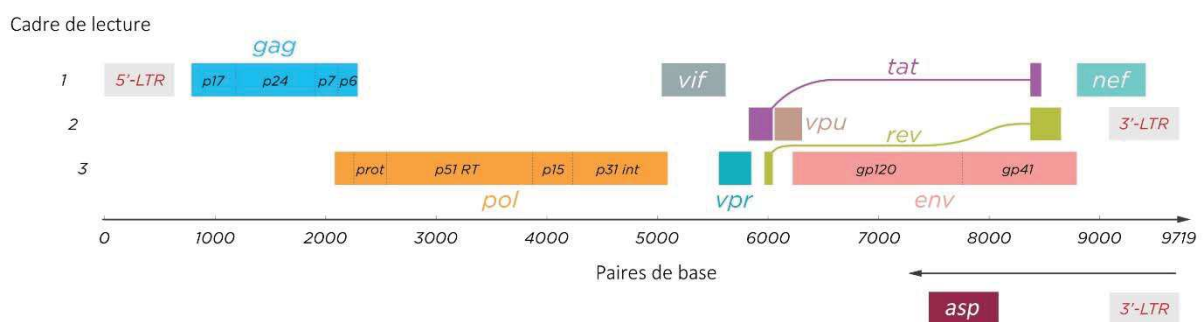
## 2. Organisation du génome

### a) Généralités

Le génome viral, se présente sous la forme de deux copies d'ARN simple brin. Une fois le virus entré dans la cellule, l'ARN viral est rétrotranscrit en ADN complémentaire proviral encadré par deux séquences répétitives non codantes appelées LTR (pour Long terminal Repeat) en 5' et en 3', qui sont particulièrement importantes pour l'intégration et la transcription du virus.



Le génome proviral du VIH est traditionnellement décrit comme étant composé de neuf gènes, transcrits à partir du LTR en 5', qui codent pour quinze protéines différentes (Frankel and Young, 1998), mais il a été récemment démontré que la transcription de l'ADN rétroviral peut également se faire à partir du LTR en 3'. Il existe donc aussi des transcrits « anti-sens », dont la fonction est encore peu connue et qui permettent eux aussi la synthèse de protéines. En particulier, on observe ainsi l'expression de la protéine ASP (pour Anti Sens Protein) (Briquet and Vaquero, 2002; Laverdure et al., 2012) (Figure 4). Les trois principaux gènes *gag*, *pol* et *env* codent pour les protéines de structure du virus et sont communs à tous les rétrovirus. Les produits de ces gènes sont générés sous la forme de précurseurs polyprotéiques. Les six autres gènes *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu* codent pour les protéines régulatrices et accessoires du virus (Tableau 2).



**Figure 4. Organisation du génome viral**  
Adapté de Thomas Splettstoesser ([www.scistyle.com](http://www.scistyle.com)).

### b) Protéines de structure

Les protéines de structure sont codées par les gènes *gag*, *pol* et *env*, communs à tous les rétrovirus et leur produit est généré sous la forme de précurseurs polyprotéiques qu'il faut maturer :

- Le gène ***gag*** (group-specific antigen) code le précurseur Gag de 55 kDa, ou pr55, dont le clivage par la protéase virale permet la formation des protéines constitutives du virus : la matrice (p17), la capside (p24), et la nucléocapside (p7 et p6).
- Le gène ***pol*** (polymerase) code le précurseur Gag-Pol de 160 kDa, ou pr160, qui après clivage va permettre d'obtenir les trois enzymes indispensables à la réplication du virus. Il s'agit de la protéase, qui est nécessaire à la maturation de protéines du virus,



de l'intégrase qui permet à l'ADN proviral de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte et de la reverse transcriptase qui permet de rétrotranscrire l'ARN en ADN proviral.

- Le gène **env** (envelope) code le précurseur glycoprotéique Env ou gp160 qui est clivé ensuite en deux sous-unités : la gp120 extra membranaire et la gp41 transmembranaire.

En plus des trois gènes principaux, le génome du VIH-1 code pour au moins six protéines pouvant être divisées en deux groupes : les protéines régulatrices Tat et Rev et les protéines accessoires Nef, Vpr, Vpu et Vif. Elles sont essentielles à la propagation de l'infection et à la réplication du virus et permettent notamment de contrecarrer des facteurs de restrictions cellulaires (Malim and Emerman, 2008) (Tableau 2).

### c) Protéines régulatrices

Les protéines régulatrices sont codées par les gènes *tat* et *rev* (Strebel, 2003):

La protéine **Tat** (Transactivator of Transcription) est un puissant régulateur de la transcription qui fonctionne comme un facteur d'élongation. Cette protéine transactivatrice, quand elle est exprimée, entraîne une augmentation importante de la transcription des gènes viraux et cellulaires en se liant à la boucle d'ARN TAR (Transactivation Responsive element), présente dans le promoteur LTR du VIH-1. Cette protéine peut aussi être sécrétée par les cellules infectées et être internalisée par les cellules voisines non infectées (Debaisieux et al., 2012) où elle pourra induire différentes réponses cellulaires, en particulier l'apoptose. Tat sera plus longuement décrite dans la partie I.D. qui lui est consacrée.

La protéine **Rev** (Regulator of Expression of Viral proteins) est impliquée dans le transport de l'ARN viral non épissé du noyau de la cellule vers son cytoplasme. Elle permet donc l'accumulation des brins d'ARN génomiques qui ont vocation à être encapsidés dans la nouvelle particule virale. Rev a en effet la faculté de reconnaître un élément spécifique aux ARN viraux non épissés afin de les exporter vers le cytoplasme via la machinerie de transport cellulaire (Malim et al., 1989).

### d) Protéines auxiliaires

Le génome du VIH-1 code également pour 4 protéines auxiliaires : Vif (Viral infectivity factor), Vpr (Viral protein r), Vpu (Viral protein u) et Nef (Negative effector) (Anderson and Hope, 2003). Les protéines Nef, Vif et Vpr, se trouvent dans le virion, et peuvent donc exercer leurs fonctions directement dès les étapes précoces du cycle viral.

La protéine **Vif** est indispensable à la réplication virale dans les cellules T CD4 et les macrophages. En effet, elle est capable de dégrader au sein de ces cellules les facteurs cellulaires antiviraux APOBEC3G et APOBEC3F. Ces facteurs de restriction, en l'absence de Vif, sont incorporés dans les virions et provoquent des mutations au sein de l'ADN viral qui inhibent l'infectivité du virus (Rose et al., 2004).

Vif est aussi capable de favoriser l'infection par le VIH en contrecarrant la restriction de l'infection imposée par le mécanisme d'autophagie dans les cellules productivement infectées, indépendamment de son action sur APOBEC (Borel et al., 2015).

**Vpr** est une protéine qui possède plusieurs fonctions. Après l'entrée du virus dans la cellule, Vpr permet l'import nucléaire du complexe de préintégration, qui contient l'ADN viral et l'intégrase. Elle facilite aussi la réverse transcription et module le taux de mutation du VIH-1. Il a également été montré que la protéine Vpr favorise l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2-M, ce qui semble être associée à une intense réplication virale (Romani and Engelbrecht, 2009).

La protéine **Vpu** facilite le relargage des nouveaux virions infectieux, en inhibant le facteur de restriction BST-2 (*bone marrow stromal cell antigen 2*) / Tetherin (Mitchell et al., 2009). BST-2 est un facteur de restriction, qui empêche les virions nouvellement formés d'être libérés dans le milieu extracellulaire en les retenant à la surface de la cellule (Simon et al., 2015). Vpu permet également la dégradation du CD4 (Strebel, 2013). Cette protéine n'est présente que dans le VIH-1 (elle est remplacée par Vpx dans le VIH-2).

**Nef** est une protéine multifonctionnelle. Elle intervient au cours de l'infection afin d'une part, de favoriser l'infectivité du virus et, d'autre part, pour contrer les mécanismes de défense de l'organisme. En effet, elle est capable d'induire l'endocytose de plusieurs récepteurs

importants pour la défense immunitaire comme le CD4 ou le CMH (Complexe Majeur d’Histocompatibilité) de classe I (Landi et al., 2011), ce qui pourrait empêcher la destruction de la cellule infectée par le système immunitaire. La modulation de l’expression de CD4 à la surface des cellules infectées favorise le bourgeonnement des nouvelles particules virales et donc l’infectivité du virus. Il est important aussi de noter que Nef induit l’augmentation du récepteur DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) à la surface des cellules dendritiques (DCs), ce qui faciliterait la transmission du virus (Sol-Foulon et al., 2002).

Tableau 2. Les protéines du VIH et leur fonction

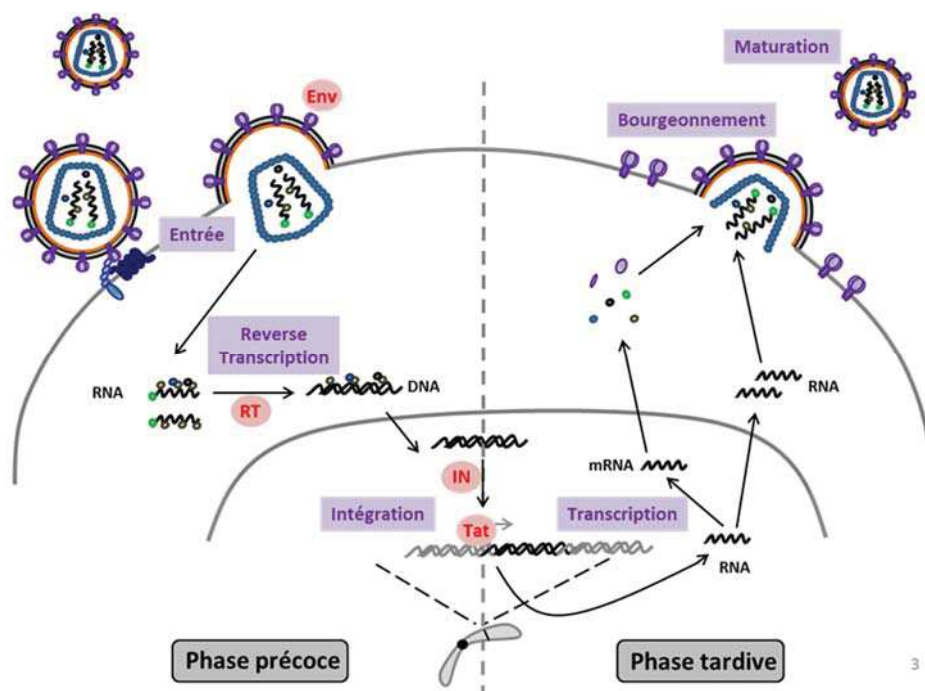
	Gène	Protéines	Description
Protéines de structure	<i>gag</i>	<b>p6, p7, p24</b>	Protéines qui forment la capside et la nucléocapside
		<b>P17</b>	Protéine de la matrice
	<i>pol</i>	<b>Reverse transcriptase</b>	Rétrotranscrire l’ARN en ADN proviral
		<b>Intégrase</b>	Permet l’intégration de l’ADN proviral dans le génome de la cellule hôte
		<b>Protéase</b>	Permet de maturer les précurseurs polyprotéiques.
	<i>env</i>	<b>gp120</b>	Se lie à CD4 et CXCR4/CCR5
		<b>gp41</b>	Permet la fusion entre les 2 membranes (virus/cellule infectée et cellule non infectée)
Protéines accessoires	<i>nef</i>	<b>Nef</b>	Réduit l’expression de CD4 et du CMH et augmente la réplication virale
	<i>vif</i>	<b>Vif</b>	Se lie à APOBEC3G
	<i>vpr</i>	<b>Vpr</b>	Transporte l’ADN viral au noyau, augmente la production virale et contrôle le cycle cellulaire
	<i>vpu</i>	<b>Vpu</b>	Diminue l’expression de CD4, bloque BST-2
Protéines régulatrices	<i>tat</i>	<b>Tat</b>	Transactivateur de la transcription
	<i>rev</i>	<b>Rev</b>	Permet l’export des transcrit d’ARNm non épissés hors du noyau
	<i>asp</i>	<b>ASP</b>	?

### C. Cycle viral

La durée moyenne d’un cycle de réplication virale complet est estimée à 24h dans les cellules T CD4 (Mohammadi et al., 2013; Perelson et al., 1996). Il se décompose généralement en 2 phases, elles-mêmes scindées en plusieurs étapes qui seront brièvement décrites dans cette partie (Figure 5) : la première phase est dite « précoce » et s’applique de l’entrée du virus jusqu’à son intégration et la seconde est la phase « tardive » (de la transcription à la libération des nouvelles particules virales). Les cellules cibles du virus sont définies par l’expression du

récepteur CD4 et des corécepteurs, majoritairement CCR5 et ou CXCR4. Ainsi le VIH-1 peut potentiellement infecter un large panel de cellules. *In vivo*, on retrouve majoritairement le virus dans les LT CD4+, les monocytes, les macrophages, les DCs, et au niveau du système nerveux central dans les cellules de la microglie et les neurones. Les cellules à longue durée de vie comme les neurones, les macrophages et les lymphocytes T mémoires constituent un réservoir pour le VIH (Lafeuillade, 2012).

Le VIH utilise aussi les DCs pour transiter des muqueuses (où a lieu la primo-infection) vers les organes lymphoïdes secondaires, où résident la majorité des cellules cibles du VIH-1, les LT CD4+. En effet, les DCs sont les premières cellules à entrer en contact avec le virus : elles vont fixer le virus par l'intermédiaire de molécules de surface comme DC-SIGN, puis migrer vers les organes lymphoïdes secondaires et transmettre le virus aux lymphocytes.



**Figure 5. Cycle de réplication du VIH-1**  
Avec RT : la réverse transcriptase et IN : l'intégrase.

### 1. Entrée virale

L'infection VIH débute par l'attachement du virus à sa cellule cible via sa protéine d'enveloppe. La gp120 (sous forme de trimère) interagit en premier avec la molécule de CD4 (Figure 6). Elle subit alors un changement de conformation, qui lui permet d'interagir avec l'un de ses

corécepteurs (CCR5 ou CXCR4). Ce phénomène entraîne la modification de la structure de la gp41 et permet à son peptide hydrophobe « fusogénique » (qui se situe à son extrémité N-terminale ou N-term) de se déployer et de pénétrer dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire. Cette étape, après un dernier changement conformationnel de la gp41, aboutit au rapprochement et à la fusion des membranes cellulaire et virales (Blumenthal et al., 2012). Les virus R5, utilisant CD4 et CCR5 pour l'entrée virale, sont responsables de la primo-infection et sont retrouvés de façon prédominante chez les patients asymptomatiques. Au cours de l'évolution de la maladie, les virus X4 (utilisant CD4 et CXCR4) émergent et sont associés à une forte diminution des cellules T impliquant une progression rapide vers la phase SIDA.

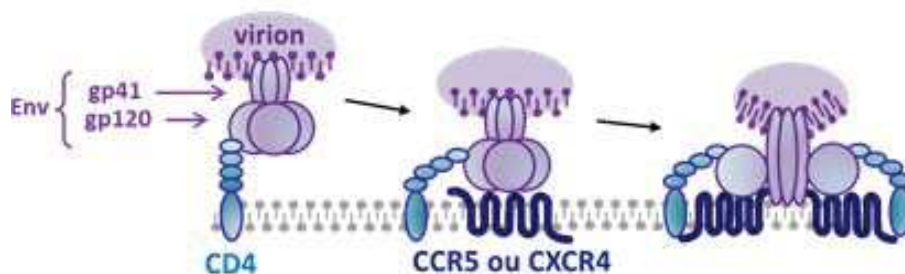


Figure 6. Entrée du virus

## 2. Transcription inverse

La capside est un élément essentiel au virus qui contient et protège le matériel génétique et les facteurs nécessaires à la transcription inverse. On peut se la représenter comme une sorte de cage, qui permet aux nucléotides d'entrer ou sortir mais qui maintient un micro environnement favorable au déroulement de la reverse transcription. Suite à la fusion, elle est libérée dans le cytoplasme de la cellule hôte où la reverse transcription peut avoir lieu. Le matériel viral est en fait transporté via le réseau de microtubules vers le noyau de la cellule. La réverse transcription et la décapsidation se déroulent en même temps, lors de ce transport : ces deux mécanismes sont étroitement liés (Arhel, 2010). L'ARN simple brin du virus est donc rétrotranscrit en ADN proviral double brin par la réverse transcriptase (ou transcriptase inverse) (Le Grice, 2012).

### 3. Import nucléaire et intégration

L'ADN proviral est ensuite importé dans le noyau via un complexe de préintégration, où il interagit avec plusieurs protéines virales et cellulaires (dont l'intégrase, Vpr, ou la capsid) afin de pouvoir passer par les pores nucléaires (Jayappa et al., 2012). Dans le noyau, l'ADN viral non intégré se trouve sous deux formes, linéaires et circulaires. Les formes circulaires ne s'intègrent pas, au contraire de l'ADN linéaire. L'intégration ne se fait pas au hasard, puisque le génome du VIH-1 s'intègre préférentiellement dans des régions transcriptionnellement actives du génome de l'hôte. Cette réaction est catalysée par une des enzymes du virus, l'intégrase, qui permet de réaliser des jonctions entre les LTR de l'ADN proviral et l'ADN cellulaire (Craigie and Bushman, 2012).

### 4. Transcription

La transcription des gènes viraux peut alors démarrer afin de générer les protéines du virus ainsi que deux copies ARN du génome viral, destinées à l'encapsidation. Elle est initiée par différents facteurs de transcription cellulaire et par un transactivateur viral unique, la protéine Tat, afin de produire de nouvelles particules infectieuses (Schiralli Lester and Henderson, 2012). La principale fonction de cette protéine est la transcription via le LTR de l'ARN du VIH dans la cellule. En effet, plusieurs facteurs cellulaires font obstacle à la transcription effective des ARNm du VIH-1. Tat se lie à la région TAR de l'ARN du VIH et recrute des protéines de la cellule nécessaires pour arrêter la répression du LTR. Tat permet ainsi l'expression des gènes viraux.

### 5. Assemblage et maturation

Les transcrits viraux sont ensuite exportés du noyau vers le cytoplasme où ils vont être traduits en protéines. Les protéines virales ainsi que l'ARN génomique du virus vont ensuite s'assembler au niveau de la membrane plasmique afin de former une nouvelle particule virale immature. Ces particules seront ensuite expulsées de la cellule par bourgeonnement. Après bourgeonnement, la maturation des particules virales nouvellement formées se produit par

l'action de la protéase virale sur les précurseurs Gag et Gag-Pol (Sundquist and Kräusslich, 2012).

### D. La protéine virale Tat

En plus des gènes structuraux (gag, pol et env), le VIH-1 contient des séquences codantes pour des protéines accessoires et des protéines régulatrices, dont la protéine Tat. Tat est connue pour être une protéine transactivatrice, qui quand elle est exprimée, entraîne une augmentation importante de la transcription des gènes viraux, voire cellulaires. Elle exerce aussi beaucoup d'autres fonctions impliquées dans la pathogenèse de la maladie. C'est pour cela que, depuis sa découverte en 1985 (Sodroski et al., 1985), Tat a fait l'objet d'une attention toute particulière de la part des chercheurs.

#### 1. Structure et organisation de la protéine

Tat, est une petite protéine de 14 à 16 kDa selon les souches du virus, qui est codée par 2 exons situés de part et d'autre du gène *env* dans le génome du virus. Le premier exon, très conservé, code pour les acides aminés (AA) 1 à 72. L'expression de ce premier exon de Tat est suffisante pour conduire à la transactivation du LTR in vitro (Vives et al., 1994). Le second exon code pour la région C-terminale de la protéine.

Malgré sa petite taille, elle est structurellement assez complexe et comporte plusieurs régions fonctionnelles. Sa séquence a par la suite été subdivisée en cinq domaines importants (Johri et al., 2011) (Figure 7) :

- Domaine I (AA 1-20) : il s'agit de la région N-term. Elle est riche en proline et possède un tryptophane en position 11 (W11) qui est essentiel à la sécrétion de Tat et à sa capture par les cellules voisines.
- Domaine II (AA 21-40) : c'est un domaine riche en cystéines. Il compte sept cystéines très conservées, dont six sont nécessaires à la transactivation du LTR. Cette séquence aurait aussi la capacité de se fixer à CCR2, CCR3 et CXCR4 pour attirer d'autres cellules cibles par chimiotactisme
- Domaine III (AA 41-48) : constitue le core de la protéine Tat. Cette séquence très conservée est essentielle à la fonction transactivatrice de la protéine. Elle est riche en résidus hydrophobes.

- Domaine IV (AA 49-72) : c'est un domaine riche en acides aminés basiques, qui comprend une région caractéristique RKKRRQRRR, très conservée entre les souches virales. Elle est essentielle pour la liaison de Tat au TAR de l'ARN.
- Domaine V (AA 73-86/101) : il correspond à la séquence codée par l'exon 2 du gène tat, et n'est pas requis pour la transactivation. Il est riche en résidus glutamine et est impliqué dans la polymérisation des microtubules et l'apoptose des cellules T



**Figure 7. La protéine Tat du VIH-1.**

*Représentation schématique de la protéine Tat et ses six différents domaines*

*Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature (Tahirov et al., 2010), © 2010*

La structure secondaire de Tat a été beaucoup étudiée, via des techniques de dichroïsme circulaire et de RMN : la plupart de ces études n'a pas réussi à obtenir de conformation stable en l'absence d'un ligand. Ces données indiquent que Tat est une protéine de nature flexible, intrinsèquement non structurée et que sa conformation peut facilement changer en fonction de son environnement (Campbell and Loret, 2009; Shojania and O'Neil, 2010). Cette flexibilité permet à Tat d'avoir un grand nombre de partenaires d'interaction et donc beaucoup de fonctions biologiques différentes (Debaisieux et al., 2012). Certaines seront d'ailleurs détaillées par la suite, dans la partie suivante (I.D.2.).

## 2. Rôles et fonctions de Tat

### a) Synthèse des transcrits viraux

Tat est absolument nécessaire à la transactivation du génome du VIH-1 et donc à sa réplication (Sodroski et al., 1985) (Figure 8). Cette activité de Tat est de loin la plus étudiée. En l'absence de ce transactivateur, on observe la synthèse de transcrits courts et abortifs car l'ARN polymérase II peut initier la transcription mais n'est pas capable d'effectuer l'étape d'élongation, montrant ainsi le rôle de Tat dans l'étape d'élongation. C'est un facteur de transcription atypique car il se lie, non pas à l'ADN, mais à une structure ARN appelée TAR, localisée en 5' de tous les ARN messagers viraux. Il nécessite l'intervention de plusieurs cofacteurs, qui interviennent à différentes étapes du processus afin de permettre la synthèse



des transcrits viraux. Tat forme un complexe stable avec P-TEFb (*positive transcription elongation factor*), lui-même constitué de CDK9 et de la cycline T, qui va lier le TAR et induire la phosphorylation de l'ARN polymérase II. Cette dernière va donc être réactivée et permettre la production des transcrits viraux (Barboric and Peterlin, 2005).

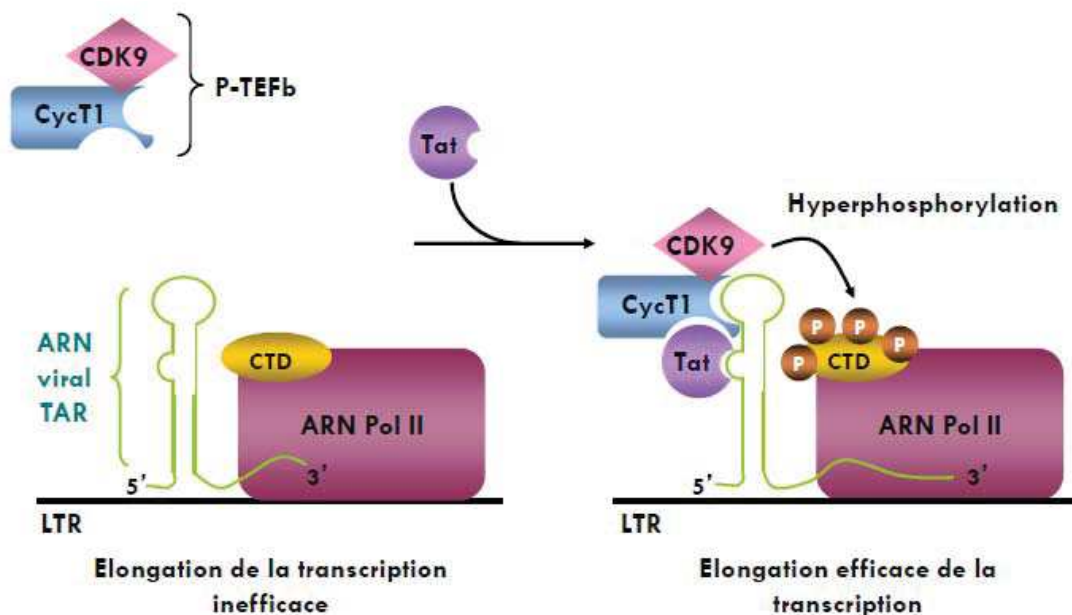


Figure 8. Rôle de Tat dans la transcription du VIH-1 (tiré de présentations de Sandie Munier et Nathalie Arhel)

D'autres études ont suggéré que Tat pourrait aussi jouer un rôle dans la reverse transcription de l'ARN du virus. En effet, Harrich et ses collaborateurs ont montré qu'il n'y avait aucune reverse transcription chez les virus délétés de Tat bien que les niveaux de reverse transcriptase soient normaux (Harrich et al., 1997).

#### b) Tat extracellulaire

##### (1) Une protéine sécrétée

Pour que Tat puisse agir de manière paracrine, elle doit d'abord traverser la membrane des cellules infectées puis passer celle des cellules non infectées (Figure 9). Le mécanisme précis de sécrétion de Tat n'est pas encore connu et ne se fait pas par la voie classique (Nickel and Rabouille, 2009). Sa sécrétion est extrêmement efficace (environ 2/3 des protéines Tat

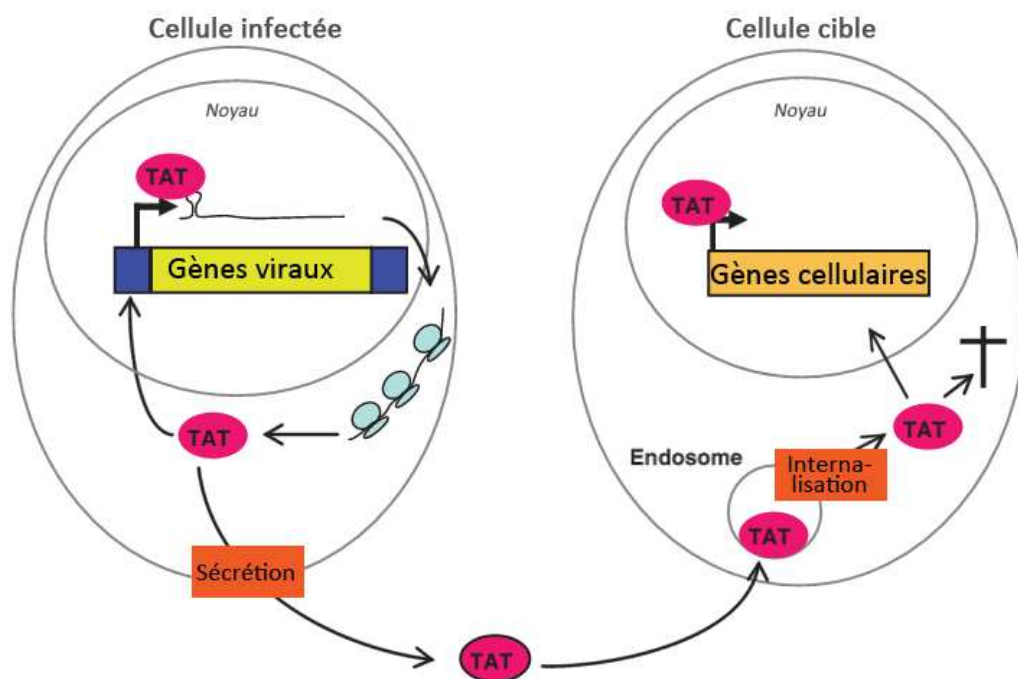
produites par une cellule infectée seront secrétées (Rayne et al., 2010)), puisque l'on retrouve Tat dans le sérum des patients. L'interaction de haute affinité entre Tat et le Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P2) semble essentielle pour recruter Tat à la membrane plasmique et lui permettre d'être sécrétée (Rayne et al., 2010). Le PI(4,5)P2 est un phospholipide présent sur le feuillet interne de la membrane plasmique et sur les phagophores ; et les mutants de Tat (Tat W11Y et Tat (49-51)A) qui sont incapables d'interagir avec le PI(4,5)P2 ne peuvent plus être sécrétés. Au jour d'aujourd'hui le processus de translocation de Tat n'a pas encore été complètement élucidé au-delà de cette étape.

Le mécanisme d'internalisation de Tat n'est pas unique : elle peut entrer par au moins deux voies d'endocytose, grâce à ses nombreux partenaires d'interaction. Parmi ses partenaires, on retrouve CD26, LRP, CXCR4, les HSPGs (*Heparan Sulfate Proteoglycans*) (Ghezzi et al., 2000; Gutheil et al., 1994; Liu et al., 2000; Tyagi et al., 2001) ou les intégrines dont certains sont ubiquitaires et permettent donc à Tat d'exercer ses fonctions dans de nombreux types cellulaires différents.

Durant ce trajet, l'exposition de Tat à de faibles pH (pH<6.0) induit un changement de conformation et son insertion membranaire (Yezid et al., 2009). Celle-ci requiert le tryptophane 11 (W11) de cette protéine. Cet acide aminé permet, comme lors de son processus de sécrétion, la stabilisation de l'interaction de Tat avec la membrane. Tat peut ensuite transloquer dans le cytosol à l'aide de la chaperonne Hsp90, qui lui permettra ensuite de retrouver sa conformation initiale (Vendeville et al., 2004).

Les effets de Tat sécrétée sont très liés à la pathogénèse de l'infection par le VIH-1. Sa sécrétion fait d'elle une toxine virale, capable de pénétrer facilement dans plusieurs types cellulaires (Figure 9). La plupart de ses fonctions favorise la dissémination du virus dans l'organisme et diminue l'immunité antivirale, dans le but de développer la maladie (Gallo, 1999). Nous allons présenter dans cette partie quelques-uns des exemples les plus représentatifs des différentes fonctions de Tat sécrétée. Il apparaît que les effets biologiques induits par Tat sont dépendants à la fois de sa concentration dans la cellule et du type cellulaire impliqué.

Comme dans les cellules productivement infectées, Tat est capable de transactiver le génome du VIH-1 dans les cellules « réservoirs » où le virus est à l'état latent. Cela lui permet de réactiver la production virale et de moduler les niveaux d'expression de nombreux gènes.



**Figure 9. Transport de Tat, une protéine intra- et extracellulaire**

Adapté avec l'autorisation de Winley Online Library, (Debaïseux et al., 2012), ©2012

## (2) Épuisement du système immunitaire

La dérégulation du réseau de cytokines observée au cours de l'infection à VIH est en grande partie due à l'effet de la protéine Tat, qui participe fortement à l'épuisement du système immunitaire. Tat est en effet capable, selon sa concentration, de moduler la production de nombreuses cytokines et voies de signalisation (comme le facteur de croissance TGF- $\beta$ , l'IL-2 ou l'IL-6 qu'elle augmente, ou l'IL-12 qu'elle diminue) (Ito et al., 1998; Scala et al., 1994; Westendorp et al., 1994; Zauli et al., 1992), qui vont aider à rendre les cellules immunitaires saines plus permissives à l'infection. En particulier, elle peut favoriser la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor*) ou anti-inflammatoires comme l'IL-4 et l'IL-10, dont la surproduction est connue pour inhiber plusieurs fonctions essentielles des cellules immunitaires (Gandhi et al., 2009).

La protéine Tat extracellulaire est cytotoxique : elle peut induire l'apoptose des cellules T CD4, des neurones et des astrocytes (Eugenin et al., 2007; Li et al., 1995; New et al., 1997). À ce titre, Tat participe donc aussi au déclin du nombre de lymphocytes T CD4 et à l'établissement de la phase SIDA. Une fois le système immunitaire effondré, Tat participe aussi activement au

développement de pathologies associées au SIDA comme le sarcome de Kaposi ou les encéphalopathies au VIH (démences liées au SIDA) (Bagashev and Sawaya, 2013; Deregibus et al., 2002).

### (3) *Tat a des propriétés immunomodulatrices*

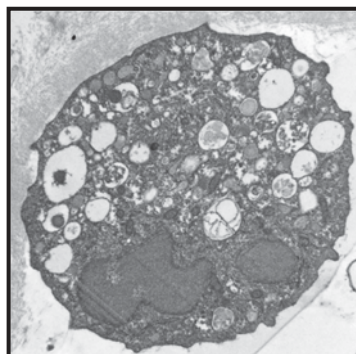
Elle peut aussi se comporter comme une chimiokine : en se fixant à leurs récepteurs, elle agit comme une molécule chimio-attractante qui recrute des cellules saines au voisinage des cellules infectées et facilite leur infection. Elle entre en compétition avec les ligands naturels de ces récepteurs et a d'ailleurs une affinité suffisante pour se lier préférentiellement à leur place sur CCR2 et CCR3 (Albini et al., 1998).

Enfin, Tat sécrétée peut induire la surexpression des corécepteurs CCR5 et CXCR4 à la surface des cellules T CD4, favorisant ainsi une fois de plus l'infection (Huang et al., 1998). Au contraire, elle diminue la concentration des molécules du CMH-I présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA) et permet ainsi au virus d'échapper au système immunitaire (Matsui et al., 1996).

## II. L'autophagie

### A. Histoire de l'autophagie

L'autophagie (du grec  $\alpha\upsilon\tau\omicron\ \phi\alpha\gamma\epsilon\iota\nu$  : « se manger soi-même ») (Klionsky, 2007) est une voie majeure de dégradation lysosomale et de recyclage des constituants cytoplasmiques après séquestration dans une vacuole appelée autophagosome (Tanida, 2011). C'est en 1963 que le terme autophagie est employé pour la première fois par le professeur Christian de Duve (prix Nobel de physiologie et de médecine en 1974 pour sa découverte des lysosomes et des peroxysomes). Sa découverte est issue de son intérêt pour la microscopie électronique, qui lui a permis d'étudier les modifications structurales de la cellule dans différentes conditions. Il a ainsi pu observer des vésicules contenant des mitochondries ou des portions de cytoplasme qui laissaient présager l'existence d'un nouveau type de structure : l'autophagosome (Figure 10) (Deter and De Duve, 1967). Cette voie ubiquitaire et constitutive est très conservée chez les eucaryotes et elle est régulée par des gènes appelés ATG (*Autophagy related*) (Suzuki et al., 2004).



**Figure 10. Autophagie**

*Image de microscopie électronique de cellule T CD4 primaire après induction d'autophagie.*

Les cellules eucaryotes ont à leur disposition deux systèmes de dégradation afin de maintenir leur homéostasie : le système UPS (*Ubiquitin proteasome system*) et l'autophagie. Ces deux mécanismes diffèrent dans leur fonction et dans la nature des substrats à dégrader mais sont finalement très complémentaires. L'autophagie est en effet capable, de dégrader des éléments de grande taille tels des organites ou des agrégats, à durée de vie longue. Les produits de ces deux types de dégradation sont recyclés et réutilisés dans le cadre de la synthèse de nouvelles molécules ou comme source d'énergie pour la cellule, notamment en

cas de carence. Des avancées plus récentes ont montré que ce dogme n'est pas complètement vrai : ces deux systèmes fonctionnent en fait de concert afin de maintenir l'homéostasie cellulaire et sont d'ailleurs souvent co-activés (Lilienbaum, 2013).

L'autophagie est aussi un processus clé de l'immunité innée et adaptative, permettant de lutter efficacement contre les agents pathogènes. Cependant, au cours de leur évolution, de nombreux agents pathogènes ont acquis la capacité d'inhiber le processus autophagique afin d'éviter leur dégradation par les lysosomes ou de détourner la machinerie cellulaire à leur avantage en se servant du processus autophagique pour leur propre réplication. Au-delà de cet aspect, l'autophagie a aussi été impliquée dans la production d'interféron de type I, la présentation antigénique, les phénomènes de tolérance, la régulation négative de la signalisation en aval des cytokines et de l'inflammation. C'est une voie de signalisation qui est vraiment au cœur de l'homéostasie cellulaire car sa dérégulation est impliquée dans de nombreuses pathologies comme le cancer, les neuro-dégénérations et les myopathies.

### B. Le processus autophagique

#### 1. Les différentes formes d'autophagie

Plusieurs voies de signalisation ciblent le lysosome afin de permettre la dégradation de certains substrats : parmi elles, on peut compter trois types d'autophagie : la microautophagie, l'autophagie dépendante des chaperonnes et la macroautophagie (Figure 11).

##### a) Microautophagie

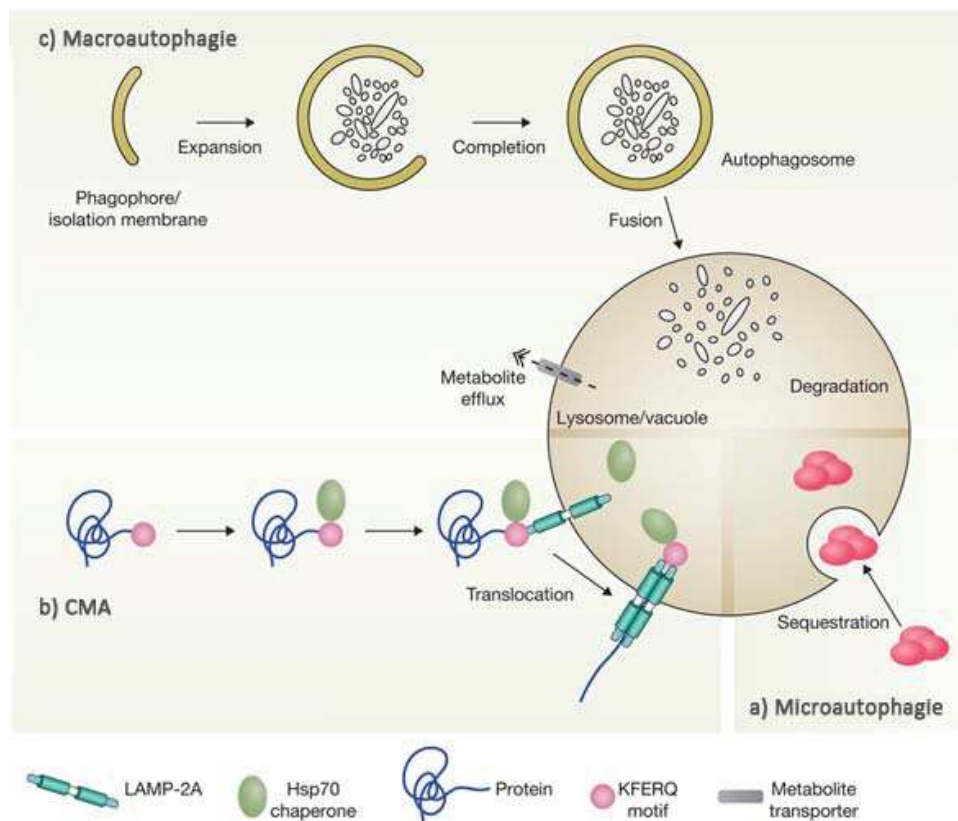
Les protéines cytoplasmiques peuvent être capturées par le lysosome lui-même suite à une invagination de sa membrane : c'est la microautophagie. Ce processus a été observé chez la levure et les mammifères. Elle peut être induite en condition de stress, comme la déprivation en nutriments ou l'hypoxie. La microautophagie (comme la macroautophagie) peut être non sélective et dégrader de petites portions de cytoplasme après invagination aléatoire du lysosome, ou bien elle peut être sélective et cibler spécifiquement des organelles comme les mitochondries ou les peroxysomes (Li et al., 2012; Mijaljica et al., 2011) (Figure 11).

### b) La CMA ou l'autophagie dépendante des chaperonnes

La CMA, ou « Chaperone-mediated autophagy » est une voie de signalisation qui permet de délivrer directement des substrats au lysosome, sans passer par des intermédiaires vésiculaires. Elle est pour l'instant uniquement décrite chez les eucaryotes. Tous les substrats de la CMA ont un motif peptidique de type « KFERQ » qui est reconnu par la chaperonne Hsc70 (*Heat shock cognate protein 70*) (Kaushik and Cuervo, 2012). Cette protéine va permettre la translocation des substrats du cytosol au lumen du lysosome, via l'oligomérisation de la protéine lysosomale LAMP2 (*Lysosomal-associated membrane protein 2*), qui va servir de récepteur (Cuervo and Wong, 2014) (Figure 11). La CMA peut aussi dégrader des protéines à durée de vie courte, comme le protéasome, avec qui elle peut donc coopérer ou au contraire entrer en compétition. Ce processus est régulé par la voie mTORC2/Akt (*Mammalian target of rapamycin*). Contrairement aux autres formes d'autophagie, la CMA est un processus exclusivement sélectif.

### c) Macroautophagie

La macroautophagie, plus communément appelée autophagie, est le processus majeur de dégradation des constituants cytoplasmiques par le lysosome. Cette voie permet la dégradation lysosomale de portions du cytoplasme après séquestration dans une vacuole à double membrane appelée autophagosome. Brièvement, lors de l'étape d'initiation, on observe la formation dans le cytoplasme d'une double membrane, le phagophore, grâce au complexe Vps34/Beclin-1. L'élongation de cette membrane, mettant en jeu 2 systèmes de conjugaison de type ubiquitination, permet la séquestration de matériel cytoplasmique dans l'autophagosome. Celui-ci peut alors fusionner avec les lysosomes pour former des autolysosomes dans lesquels va être digéré le contenu cytoplasmique séquestré (Figure 11). Au niveau basal, l'autophagie permet la dégradation des protéines avec une durée de vie longue, ou des organelles endommagées. Mais elle peut aussi être induite en condition de stress : comme une déprivation en nutriments, une hypoxie ou suite à l'invasion par un pathogène (Tanida, 2011).



**Figure 11. Schéma des différentes formes d'autophagie** (Boya et al., 2013)

a) La microautophagie permet l'internalisation de ses substrats directement dans le lysosome par invagination de sa membrane.

b) Au cours de la CMA, les protéines qui présentent la séquence KFERQ sont reconnues et dépliées par la chaperonne Hsc70. Elle et son substrat s'associent ensuite à LAMP2A à la surface du lysosome. LAMP2A oligomérise et permet la translocation de la cible dans le lysosome.

c) La macroautophagie est un mécanisme de dégradation lysosomale de portion de cytoplasme après séquestration dans une vacuole à double membrane appelée autophagosome. Ces autophagosomes fusionnent ensuite avec les lysosomes pour former des autolysosomes, dans lesquels le matériel est dégradé puis recyclé.

*Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: NATURE CELL BIOLOGY (Boya et al., 2013), ©2013*

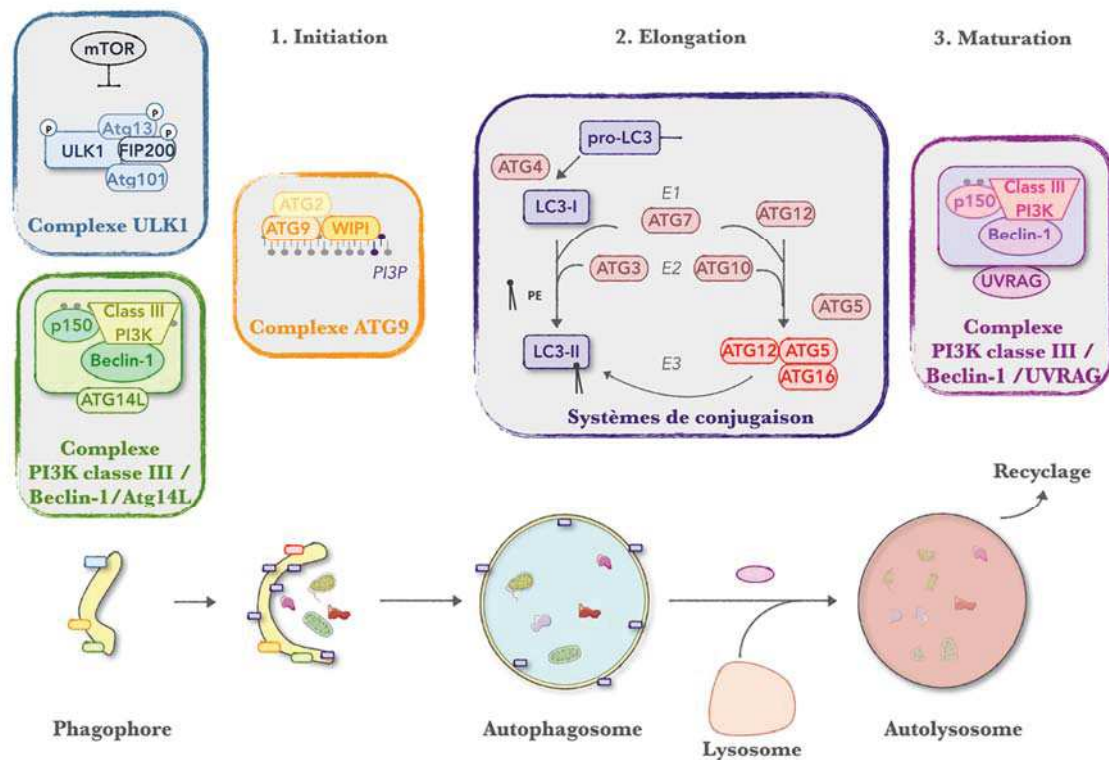
La macroautophagie étant l'objet de la présente étude, le terme autophagie fera référence à cette seule macroautophagie dans toute la suite de ce manuscrit.

Des mécanismes d'autophagie non canoniques ont également été décrits, suggérant que l'autophagie peut se produire en absence de certaines protéines autophagiques clés, par des mécanismes non conventionnels de biogénèse des autophagosomes (Codogno et al., 2012).



### 2. Mécanisme moléculaire de la macroautophagie

L'autophagie est donc un processus très conservé au cours de l'évolution, qui a pour fonction de dégrader des organelles endommagées ou des protéines présentes dans le cytosol, via des vésicules à double membrane appelées autophagosomes, afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. L'autophagie est stimulée en conditions de stress, telles que la carence en acides aminés ou en facteurs de croissance, l'hypoxie, le stress oxydatif et lors d'infections (Klionsky and Codogno, 2013). Ce processus est orchestré et régulé par une trentaine de gènes (Suzuki et al., 2004) nommés ATG (Klionsky et al., 2016), qui sont répartis en plusieurs complexes de signalisation. Elle peut être divisée en plusieurs grandes étapes. On observe tout d'abord la formation (ou **initiation**) d'une double membrane, appelée phagophore (ou encore membrane d'isolation). Celui-ci va ensuite s'allonger, au cours de l'étape d'**élongation**, et se refermer pour former une vacuole, l'autophagosome, dans lequel seront séquestrés des éléments du cytoplasme. L'autophagosome va ensuite fusionner avec le lysosome au cours de l'étape de **maturation**, pour former un autolysosome dans lequel le matériel séquestré sera déversé, dégradé par les enzymes lysosomales, puis recyclé (voir Figure 12).



**Figure 12. La machinerie de l'autophagie**  
*L'autophagie se décline en plusieurs étapes :*

- L'initiation, qui implique les complexes de signalisation ULK1, Beclin-1/PI3K/ATG14L et ATG9, conduisant à la formation du phagophore.
- L'élongation de la membrane du phagophore met en jeu deux systèmes de conjugaison de type ubiquitination : ATG12-ATG5-ATG16L1 et LC3-PE et aboutit à la formation de l'autophagosome.
- La maturation et le recyclage, au cours desquels les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes, sont dépendants du complexe de signalisation Beclin-1/PI3K/UVRAG.

#### a) Initiation

Cette étape correspond au recrutement et à l'activation de différents complexes protéiques au niveau du phagophore (Suzuki et al., 2001), à la suite d'un stress. Son origine membranaire serait multiple (Reggiori, 2006), comme par exemple la membrane plasmique (Ravikumar et al., 2010) ou le réticulum endoplasmique (Hayashi-Nishino et al., 2009),

Chez les mammifères, les deux étapes les plus précoces de ce processus sont le recrutement du complexe ULK (constitué de ULK1/2, ATG13, FIP200 (*FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa*) et ATG101) puis du complexe phosphoinositide 3-kinase (PI3K) de classe III (avec PI3K classe III/Vps34, Beclin-1, ATG14 et p150). L'activation du complexe PI3K classe III va permettre la production de PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate) qui va servir de signal

lipidique pour recruter et activer les autres effecteurs de l'autophagie possédant un domaine de fixation au PI3P (domaines FYVE) comme DFCP1 (*Double FYVE-containing protein 1*), WIPI (*WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1*), etc.

L'initiation de l'autophagie nécessite donc un grand nombre d'acteurs regroupés en trois complexes (cités ci-dessous), qui interagissent entre eux afin de former le phagophore.

### (1) *mTOR*

Le signal d'induction de l'autophagie le mieux caractérisé est la carence en acides aminés, via la voie mTOR. C'est un senseur de l'état énergétique et nutritionnel de la cellule. A ce titre, mTOR a deux fonctions majeures : la stimulation de la synthèse protéique et l'inhibition de l'autophagie (Laplante and Sabatini, 2012). mTOR participe à deux complexes appelés mTORC1 et mTORC2. Le complexe mTORC1, que l'on appellera par la suite mTOR, semble être le seul impliqué dans la régulation du déclenchement de l'autophagie. Son activité est régulée par les niveaux d'acides aminés et de glucose et est inhibée par une carence en nutriments. La rapamycine et la Torin 1, qui sont des inhibiteurs de mTOR, sont couramment utilisées pour induire l'autophagie.

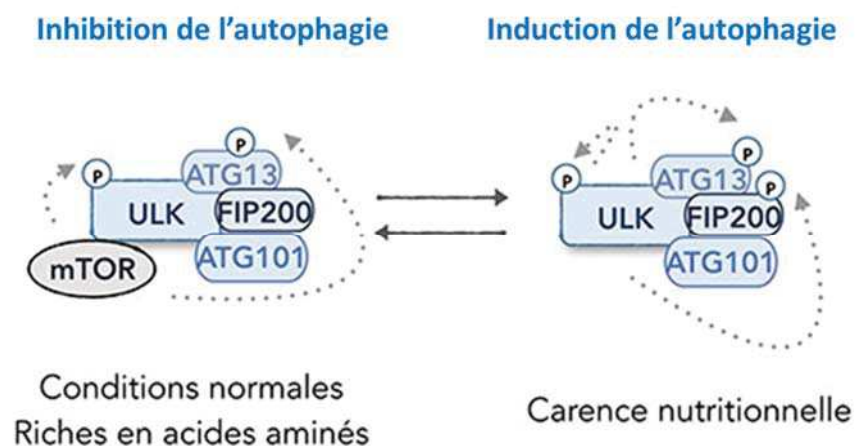
### (2) *Complexe ULK1/2*

ATG1, chez la levure, possède 5 orthologues (ULK1, ULK2, ULK3, ULK4 et STK36) chez les mammifères. Parmi eux, seuls ULK1 et ULK2 sont connus pour réguler l'autophagie. Ce sont des sérine/thréonine kinases, dont les fonctions sont redondantes et qui participent l'une et l'autre à l'induction de l'autophagie. Elles forment un complexe stable avec ATG13, FIP200 et ATG101 (Figure 13), qui permet de transmettre les signaux de mTOR régulant l'autophagie (Lin and Hurley, 2016).

Dans des conditions riches en nutriments, mTORC1 inhibe l'autophagie en s'associant avec le complexe ULK. Cette interaction induit la phosphorylation de ATG13 et ULK1/2 et inhibe son activité kinase. Au contraire, en condition de carence nutritionnelle, mTOR est inhibé. Son inactivation entraîne sa dissociation du complexe ULK et la déphosphorylation des protéines

ULK1/2 et ATG13. L'activité kinase de ULK1/2 est alors restaurée et permet son autophosphorylation et la phosphorylation de ATG13 et FIP200 (Figure 13). Cela va permettre la translocation du complexe au phagophore et conduire au recrutement et à l'activation du complexe PI3 Kinase de classe III/Beclin-1 au site de formation de l'autophagosome (Russell et al., 2013).

Il est à noter que le complexe ULK1/2 peut également être directement activé par l'AMPK (pour « AMP-activated protein kinase »), indépendamment de mTOR (Egan et al., 2011).



**Figure 13. Régulation du complexe ULK par mTOR**

Activation ou inhibition du complexe ULK par la kinase mTOR. En présence de nutriments, mTOR est activé et phosphoryle ULK1/2 et ATG13 : l'autophagie est inhibée. En cas de carence en nutriments, mTOR se dissocie du complexe ULK. ULK1/2 peut alors phosphoryler FIP200 et ATG13, ce qui conduit à l'activation de l'autophagie

### (3) Complexe Beclin-1/PI3K classe III

Le second complexe important pour l'initiation de l'autophagie est le complexe « core » formé par Beclin-1, la kinase PI3K classe III (ou Vps34), sa kinase régulatrice p150 (ou Vps15) et probablement AMBRA1, car il permet de réguler plusieurs étapes clés de l'autophagie. L'activité kinase PI3K permet de phosphoryler le phosphatidylinositol pour former le PI3P nécessaire à l'élongation du phagophore (Simonsen and Tooze, 2009). Le PI3P va servir de signal lipidique afin de recruter tous les facteurs indispensables à la formation des autophagosomes. Il recrute en effet les protéines DFPC1 (Axe et al., 2008) et WIPI1/2 (Polson et al., 2010).

Au niveau basal, Beclin-1 interagit avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL via leur domaine BH3 (Pattingre et al., 2005), qui la séquestrent et l'empêchent d'aller interagir avec la PI3K classe III. En cas d'induction d'autophagie (une carence nutritionnelle par exemple), différentes phosphorylations permettent de libérer Beclin-1 de son interaction avec Bcl-2. Les kinases c-Jun N-terminale 1 JNK1 et DAPK (*Death-Associated Protein Kinase*) vont respectivement phosphoryler Bcl-2 et Beclin-1 et donc les libérer de leur interaction (Wei et al., 2008; Zalckvar et al., 2009). Beclin-1, est alors libre de se lier à ses cofacteurs (UVRAG, Ambra1, ATG14L ou Rubicon) (He and Levine, 2010) pour former l'un des complexes majeurs impliqués dans l'induction et la régulation de l'autophagie (Figure 14). Il existe également d'autres systèmes de régulation de Beclin-1/Bcl-2, différents des phosphorylations (Decuypere et al., 2012). ATG14 active le complexe « core » et permet la biogenèse des autophagosomes. Les protéines UVRAG (*UV radiation resistance-associated gene*) et/ou Bif1 (Liang et al., 2006; Takahashi et al., 2007) potentialisent cette activation. UVRAG, une fois lié à Beclin-1 peut aussi favoriser les étapes tardives de fusion de l'autophagie : en recrutant Vps et Rab7, il peut en effet induire la fusion des différentes vésicules en présence. Au contraire, Rubicon est capable d'inhiber les étapes d'initiation et de maturation.

On utilise d'ailleurs en laboratoire des drogues ciblant ce complexe (comme la 3-Methyladenine ou 3-MA) afin de bloquer l'autophagie.

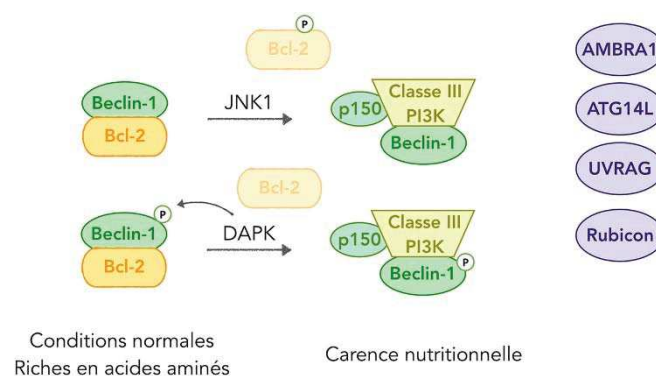


Figure 14. Le complexe PI3K de classe III et ses partenaires.

### b) Elongation

Une fois le phagophore généré, sa membrane s'allonge, s'incurve et séquestre une portion du cytoplasme pour former la vésicule à double membrane qu'est l'autophagosome : c'est

l'élongation. Cette étape nécessite l'action concertée de deux systèmes de conjugaison de type ubiquitination. Classiquement, la conjugaison de l'ubiquitine et des molécules dites «ubiquitin-like » aux substrats nécessite une enzyme d'activation (E1), une enzyme de conjugaison (E2) et une ligase (E3) (Figure 15).

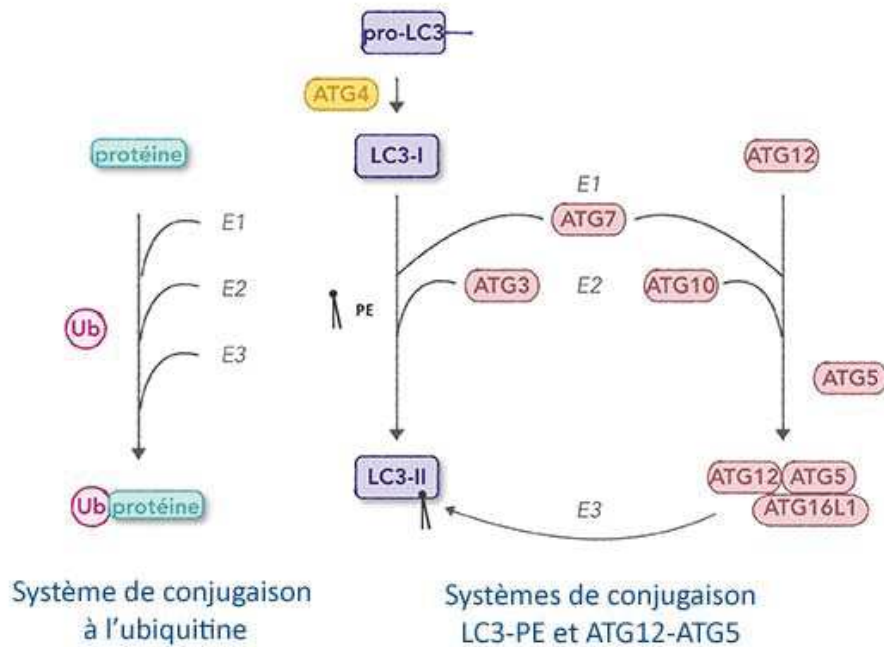
### (1) Complexe de conjugaison ATG12-ATG5/ATG16L1

Dans le premier système de conjugaison, la protéine ATG12 (qui est « *Ubiquitine-like* ») est activée par la protéine ATG7. Agissant comme une enzyme d'activation E1, ATG7 transfère ATG12 sur la protéine ATG10. ATG10 exerce alors une activité E2 de conjugaison et lie de manière covalente ATG12 à ATG5 (Mizushima et al., 1998). Aucune enzyme E3 ligase ne semble intervenir dans ce système de conjugaison. Le conjugué ATG12-ATG5 se lie alors à ATG16L1 pour former le premier complexe de conjugaison ATG5-ATG12/ATG16L1, qui jouera le rôle d'enzyme E3 pour le système présenté dans le paragraphe suivant (LC3-PE) (Figure 15). Ce complexe, essentiel à l'élongation de la membrane pré-autophagosomale, est associé à la membrane externe de l'autophagosome en formation et est ensuite dissocié une fois l'autophagosome formé (Mizushima et al., 2003).

### (2) Complexe de conjugaison LC3-PE

Le deuxième système de conjugaison concerne la protéine LC3 : c'est un système unique car c'est le seul connu permettant la conjugaison d'une protéine à un lipide, le Phosphatidylethanolamine (PE). LC3 est tout d'abord synthétisé sous la forme d'un précurseur pro-LC3 qui est immédiatement clivé par la protéase ATG4 pour produire la protéine LC3-I cytosolique. C'est cette glycine ainsi exposée en C-terminal (ou C-term), qui sera liée de manière covalente au PE par une réaction de conjugaison induite par ATG7 (E1), ATG3 (E2) et le complexe ATG12-ATG5/ATG16L1 (E3) (Tanida et al., 2004) (Figure 15). Le conjugué LC3-PE, aussi appelé LC3-II, est localisé spécifiquement sur les autophagosomes, en faisant ainsi un excellent marqueur de l'autophagie. Ainsi les deux complexes de conjugaison « *Ubiquitine-like* » vont permettre ensemble l'incorporation de LC3 aux membranes internes et externes

de l'autophagosome. Les protéines de LC3 présentes à la surface extérieure de l'autophagosome sont par la suite délipidées et clivées par ATG4 pour être recyclées.



**Figure 15. Les systèmes de conjugaison de l'autophagie.**

- *Modèle classique du système de conjugaison de l'ubiquitine.*

- *Système de conjugaison LC3-PE.*

- *Système de conjugaison ATG12-ATG5.*

*PE : Phosphatidylethanolamine ; Ub : ubiquitine*

Les protéines de la famille ATG8 sont, comme on l'a vu précédemment, des protéines dites « Ubiquitine-like » et elles sont essentielles à la formation de l'autophagosome. Cette famille de protéines ne comprend qu'un seul membre chez la levure (ATG8) mais plusieurs orthologues chez les mammifères, que l'on peut diviser en deux sous-familles :

- la famille MAP-LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) constituée de quatre membres (LC3A, LC3B, LC3B2 et LC3C). La protéine LC3B, que l'on appellera par la suite LC3, reste l'orthologue d'ATG8 le plus connu et le plus décrit dans la littérature, et c'est celui qui nous intéressera majoritairement dans la suite.



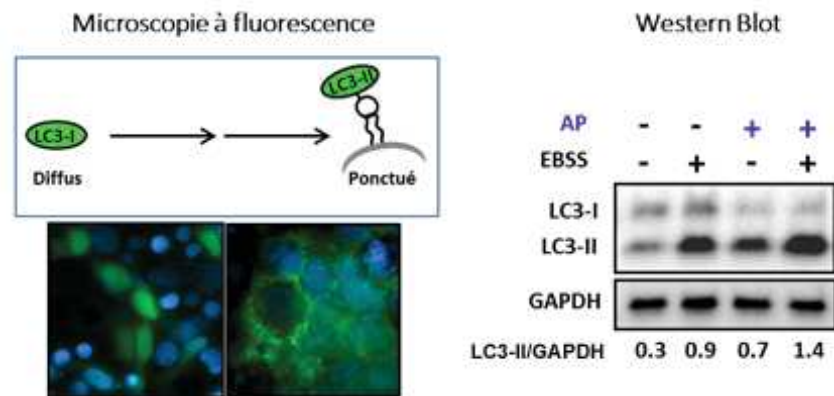
- la famille GABARAP (*GABA(A) receptor-associated protein*) constituée de quatre membres (GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 et GABARAPL3)

Ces protéines sont essentielles, car elles ne servent pas seulement à l'élongation et à la fermeture de l'autophagosome, mais aussi à lier les récepteurs autophagiques comme p62 afin de permettre la dégradation sélective de leur substrat.

LC3 existe sous deux formes : une forme non conjuguée cytosolique appelée LC3-I et une forme conjuguée au PE, qui est ancrée dans la membrane des autophagosomes, et qui est appelée LC3-II. Grâce au PE, la protéine LC3-II s'ancre à la fois dans la membrane externe et interne des autophagosomes. Après fermeture de celui-ci, les protéines de LC3-II fixées sur la membrane externe de l'autophagosome sont clivées par ATG4 et recyclées. Celles présentes sur la membrane interne de l'autophagosome restent intactes jusqu'à l'étape de fusion avec le lysosome où elles seront dégradées avec le contenu de l'autophagosome. Elle est donc présente tout au long du processus autophagique, ce qui en fait un marqueur spécifique de choix pour monitorer l'autophagie et son flux dégradatif.

Au laboratoire, nous utilisons principalement deux techniques pour suivre l'autophagie en marquant LC3 : la microscopie à fluorescence et le western blot (Figure 16). En microscopie, lorsque l'autophagie est induite, LC3-II se retrouve dans des structures ponctuées (puncta), qui correspondent aux autophagosomes. Ces puncta ne sont pas visibles quand LC3 est sous sa forme LC3-I car ils restent diffus dans le cytoplasme. En western blot, la lipidation de LC3 modifie ses propriétés électrophorétiques : LC3-I migre avec un poids moléculaire apparent de 18 kDa, tandis que LC3-II aura un poids moléculaire de 16 kDa (Figure 16). On peut alors facilement distinguer les deux formes en western blot et suivre l'induction d'autophagie (Klionsky et al., 2016).





**Figure 16. Les différentes méthodes d'analyse de l'autophagie.**

*La microscopie à fluorescence, le western blot.*

*EBSS (earle's balanced salt solution): milieu de starvation, inducteur d'autophagie; AP: anti-protéases (e64d+pepstatineA), inhibiteur des enzymes lysosomales et donc des étapes de dégradation*

### c) Maturation et recyclage

Une fois la fermeture de la membrane du phagophore terminée, l'autophagosome nouvellement formé va pouvoir fusionner avec le lysosome. Cette dernière étape du processus autophagique va permettre la dégradation et le recyclage du contenu de l'autophagosome.

Les autophagosomes matures sont adressés aux lysosomes via les microtubules et fusionnent avec ces organelles pour former des autolysosomes (Ganley, 2013). Il faut noter que l'autophagie peut aussi être connectée au processus d'endocytose. En effet, les endosomes peuvent fusionner avec les autophagosomes, formant des structures alors appelées « amphisomes », capables de fusionner à leur tour avec les lysosomes. Plusieurs protéines sont impliquées dans cette fusion, notamment la protéine UVRAG retrouvée en complexe avec le complexe PI3 Kinase de classe III/Beclin-1, Rab7, les protéines ESCRT et SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein Receptor*) (Rusten and Simonsen, 2008; Stroupe, 2011). Le matériel cytoplasmique séquestré est alors dégradé par les hydrolases à pH acide du lysosome puis recyclé et redistribué dans le cytoplasme grâce à des transporteurs présents dans la membrane lysosomale, pour une réutilisation par la cellule (Yang et al., 2006).

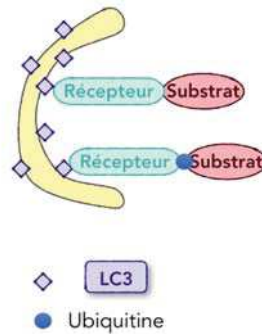
Ces étapes sont importantes dans l'étude du flux autophagique : en effet, quand on observe une induction d'autophagie en western blot ou en microscopie, on ne peut pas savoir si elle est due à une induction de la formation des autophagosomes ou à une inhibition de la maturation due à un blocage de l'étape de fusion. On peut alors utiliser des inhibiteurs de

l'acidification du lysosome (comme la chloroquine CQ ou la bafilomycine A1 BafA1), ou des inhibiteurs des enzymes lysosomales ( ou anti-protéases AP : e64d/pepstatine A) : ils empêchent respectivement la fusion de l'autophagosome avec le lysosome ou inhibent ses étapes dégradatives et induisent donc l'accumulation des autophagosomes qui ne peuvent plus être dégradés (Klionsky et al., 2016).

### 3. L'autophagie sélective

#### a) Rôle important dans la macroautophagie

Initialement, l'autophagie était décrite comme un processus de dégradation non spécifique. Dans des conditions de carence, l'autophagie basale permet en effet de fournir des nutriments à la cellule. C'est un mécanisme constitutif qui est impliqué dans le maintien de l'équilibre énergétique de la cellule et qui est donc très important pour son homéostasie (Yang and Klionsky, 2010). Cependant, de plus en plus de travaux montrent que l'autophagie est aussi un mécanisme de dégradation hautement sélectif, grâce à l'intervention de protéines adaptatrices qui fonctionnent comme des cargos (Johansen and Lamark, 2011). En effet, ces protéines ou « récepteurs autophagiques » sont d'une part capables de se lier à des protéines ou organelles ubiquitinés via leur domaine d'association à l'ubiquitine (Shaïd et al., 2013) ; et d'autre part à ATG8/LC3, et donc à l'autophagosome via leur motif LIR (*LC3 Interacting Region*) (Birgisdottir et al., 2013) (Figure 17). Cette interaction entraîne donc la dégradation des cargos et de leurs substrats par autophagie. On peut classifier les différents types d'autophagie sélective selon les cibles dégradées et plusieurs termes sont apparus pour qualifier ce processus (Voir Tableau 3 dans la partie II.B.3.d).



**Figure 17. Modèle de l'autophagie sélective**

Les récepteurs autophagiques ont la propriété d'interagir d'une part avec les protéines de la famille Atg8 et d'autre part avec un substrat spécifique qu'ils conduisent à la dégradation autophagique.

L'autophagie sélective est un mécanisme de contrôle qualité, qui permet de gérer le renouvellement de certains organelles, des agrégats protéiques ou encore de favoriser l'élimination des microorganismes pathogènes. C'est donc un processus très spécifique et très finement régulé car il se doit de différencier les organelles abîmés de ceux qui sont sains, ainsi que de reconnaître les agents pathogènes.

Le premier récepteur autophagique à avoir été identifié est p62/SQSTM1 (Séquestosome 1) : à l'origine cette protéine a été décrite comme une protéine échafaudage impliquée dans de nombreuses voies de signalisation (Moscat et al., 2007). Depuis, il a été montré que p62 est aussi impliqué dans la formation et la dégradation par autophagie des agrégats de protéines ubiquitinés (agrégophagie) (Bjørkøy et al., 2005), mais pas seulement. Cette protéine, en interagissant avec des bactéries ou des protéines virales, peut aussi permettre leur dégradation spécifique par autophagie (Mostowy and Cossart, 2012) (pour revue, cf. annexe 4).

Il semblerait donc que l'autophagie ait évolué sur 2 branches en parallèle : l'autophagie basale, non spécifique, permet de fournir des nutriments à la cellule en condition de carence ; tandis que l'autophagie sélective agit comme un contrôle qualité pour éliminer sélectivement les structures toxiques, étrangères ou surnuméraires de la cellule.

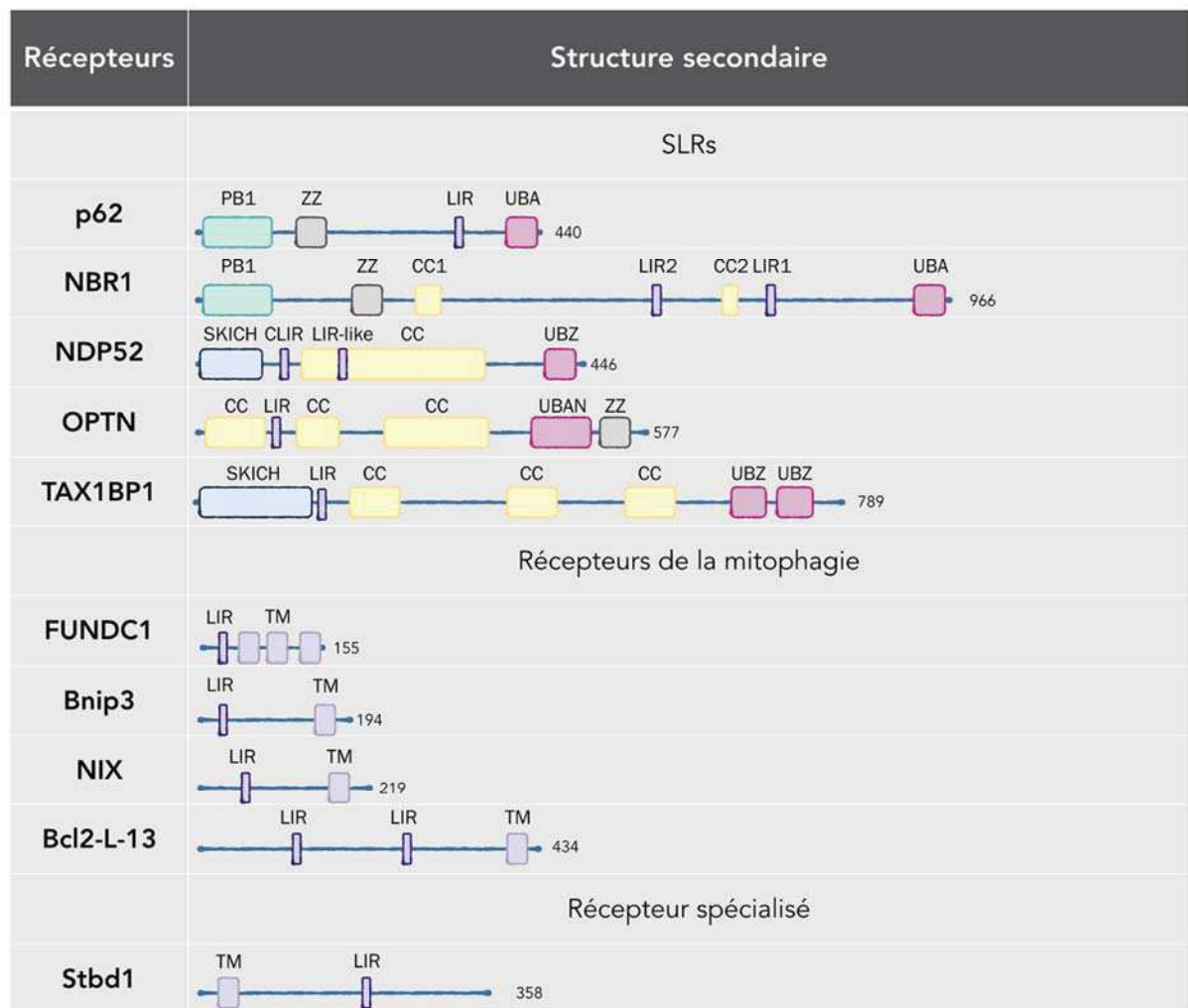
### b) Les récepteurs de l'autophagie sélective

Les récepteurs autophagiques jouent un rôle majeur au cours de l'autophagie sélective : ce sont eux qui permettent d'amener le substrat visé au processus autophagique. SQSTM1/p62 a été le premier récepteur décrit, mais depuis lors, bien d'autres récepteurs ont été identifiés et caractérisés, que ce soit chez la levure ou les mammifères (comme la protéine BNIP3 (*BCL2/adenovirus E1B protein*), FUNDC1 (*FUN14 Domain Containing 1 protein*), NBR1 (*Neighbour of breast cancer early-onset 1 gene 1*), NDP52 (*nuclear dot protein 52*), optineurine). Ils partagent tous les caractéristiques suivantes (Johansen and Lamark, 2011) :

- Ils se lient à LC3 via un motif LIR de 4 acides aminés
- Ils sont dégradés avec leur substrat par autophagie
- Ils ne sont pas impliqués dans la machinerie basale de l'autophagie
- Ils possèdent en général un domaine d'interaction protéine/protéine ou un domaine de liaison aux membranes qui jouent un rôle important et qui sont à la base de leur interaction avec différents types de substrats

Il existe différents types de récepteurs autophagiques (Figure 18) :

- Les SLRs (*sequestosome 1(SQSTM1)-like receptors*), nommés ainsi car ils partagent des caractéristiques avec p62/SQSTM1. Ils possèdent un domaine de liaison à l'ubiquitine (Kraft et al., 2010) et plusieurs d'entre eux ont été décrits chez l'homme : p62/SQSTM1, NBR1, NDP52 et l'optineurine (OPTN). Ce sont principalement ces récepteurs qui nous intéresseront dans la suite de ce manuscrit. Néanmoins, on peut aussi citer TAX1BP1 (aussi appelé T6BP pour *TRAF6-binding protein*).
- Les récepteurs autophagiques qui possèdent des domaines transmembranaires et se trouvent donc enchâssés dans des membranes. C'est, par exemple, le cas de NIX (*NIP3-like protein X*), BNIP3, FUNDC1 et Bcl2-L-13, dans le cas de la mitophagie.
- Les récepteurs spécialisés, comme Stbd1 (*starch-binding-domain-containing protein 1*), qui reconnaît spécifiquement le glycogène dans le cas de la glycophagie (Jiang et al., 2011).



**Figure 18. Les récepteurs de l'autophagie sélective**

Représentation schématique des différents domaines des principaux récepteurs de l'autophagie sélective.

PB1 : Phox and BEM1 domain; ZZ : domaine en doigt de zinc de type ZZ; CC : domaine coiled-coil; LIR : domaine de liaison à LC3 (LC3-interacting region); UBA, UBAN, UBZ : domaines de liaison à l'ubiquitine (Ubiquitin-associated domain, ubiquitin binding in ABIN and NEMO domain, Ubiquitin-binding zinc finger); SKICH : SKIP carboxyl homologue domain, TM : domaine transmembranaire, CLIR : LC3C Interacting region.

(1) Les SLRs

(a) p62/SQSTM1

p62 est une protéine adaptatrice de 440 acides aminés qui est impliquée dans beaucoup de voies de signalisation importantes pour la survie, la mort ou le métabolisme de la cellule (Katsuragi et al., 2015). Elle est constituée d'un domaine PB1 (*Phox and BEM1 domain*) en N-term, d'un domaine en doigt de zinc (ZZ), d'un domaine LIR et d'un domaine UBA (*Ubiquitine-associated domain*) en C-term (Figure 18). Le domaine PB1 de p62 est un domaine d'interaction protéine/protéine qui lui permet d'oligomériser et/ou de s'associer à d'autres protéines. En particulier, ce domaine, en association avec le domaine UBA, permet de rassembler les substrats ubiquitinés et de les agréger avant de les cibler à la dégradation (Bjørkøy et al., 2005).

Quand l'autophagie est inhibée, p62 s'accumule dans des agrégats protéiques qui sont aussi positifs à l'ubiquitine (Korolchuk et al., 2009). Ces inclusions sont souvent observées dans les neurones de patients atteints de maladies neurodégénératives (Bjørkøy et al., 2005). Ces agrégats disparaissent quand l'expression de p62 est invalidée, ce qui prouve que p62 est nécessaire non seulement à leur dégradation par autophagie (via sa liaison à LC3) mais aussi à leur formation. Lors de l'agrégation, p62 travaille en synergie avec ALFY (*Autophagy-linked FYVE*) qui joue le rôle de protéine échafaudage. Elle fait le lien entre p62 et ATG5 et permet donc à l'autophagosome de se former au plus près du substrat à dégrader, en l'occurrence des agrégats (Clausen et al., 2010; Yamamoto and Simonsen, 2011). Il est aussi important de souligner que p62 est aussi très impliqué dans la xénophagie, que ce soit contre les bactéries (cf paragraphe sur la xénophagie en II.B.4.E.3.) ou les virus (cf. chapitre III).

p62, comme les autres récepteurs de l'autophagie sélective, est dégradé en continu par l'autophagie et peut donc être utilisé, comme LC3, comme un marqueur de l'autophagie et de son flux. L'induction de l'autophagie sera donc marqué par une diminution des niveaux d'expression de p62, tandis qu'une inhibition du flux sera marqué par son accumulation. Il convient néanmoins d'être prudent avec ce marqueur, car p62 peut aussi interagir avec de nombreuses autres voies de signalisation, qui peuvent à leur tour jouer sur ses niveaux d'expression : p62 peut notamment être dégradé par le protéasome, ou subir une induction au niveau transcriptionnel en réponse à différents stimuli (Klionsky et al., 2016).

Enfin, il est important de noter que p62 est aussi impliqué dans la voie de signalisation Keap1-Nrf2 (Keap1 : *Kelch-like ECH-associated protein 1* ; Nrf2 : *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*). Cette voie de signalisation permet de détecter les déséquilibres redox au sein de la

cellule et induit la synthèse de protéines anti-oxydantes ou détoxifiantes. En conditions basales, Nrf2 est constitutivement dégradé par le protéasome via sa liaison avec Keap1. La présence de ROS (espèces réactives de l'oxygène) conduit à l'inactivation de Keap1 : en conséquence, Nrf2 est stabilisé et peut transloquer au noyau pour induire la production de protéines anti-oxydantes. Une seconde régulation de Keap1 a lieu via p62. Dans le cas où l'autophagie est dérégulée et où p62 s'accumule, Keap1 va pouvoir se lier à p62 et libérer Nrf2, qui va alors transloquer au noyau (Komatsu et al., 2010).

### (b) NBR1

NBR1 est très similaire à p62, notamment dans son architecture (Figure 18) : elle possède elle aussi un domaine PB1, un motif LIR et un domaine UBA (Kirkin et al., 2009). Son domaine PB1 lui permet de former des hétéro-oligomères avec p62 ou avec d'autres protéines possédant elles aussi un domaine PB1. Les substrats ubiquitinés, comme précédemment, interagissent avec le domaine UBA de NBR1.

Comme p62, elle est impliquée dans l'élimination des agrégats ou des protéines ubiquitinées (Kirkin et al., 2009). Des travaux plus récents ont aussi montré un rôle pour NBR1 dans la dégradation sélective des peroxysomes par autophagie (pexophagie) (Deosaran et al., 2013).

### (c) Optineurine

L'optineurine, comme les autres SLRs, se lie à ATG8/LC3 via son domaine LIR et à l'ubiquitine grâce à son domaine UBAN (*ubiquitin binding in ABIN (A20 binding and inhibitor of NK-κB) and NEMO (NK-κB essential modulator)*). On trouve aussi des domaines « *coiled-coil* » qui lui permettent d'oligomériser. Cette protéine est impliquée dans la dégradation de *Salmonella enterica* après ubiquitination de cette dernière dans le cytoplasme de la cellule infectée (Wild et al., 2011). Elle n'est pas seulement impliquée dans la xénophagie mais aussi dans d'autres types d'autophagie sélective, comme la mitophagie ou l'agréphagie. Lorsqu'une mitochondrie est endommagée, PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) se stabilise à sa membrane externe et recrute la E3 ligase Parkin, qui va à son tour ubiquitiner la mitochondrie (Lazarou et al., 2015). Cette ubiquitination permet le recrutement de OPTN via son domaine UBAN, qui va

permettre la dégradation sélective de cette mitochondrie par autophagie. Enfin, elle joue aussi un rôle dans l'élimination des agrégats protéiques, notamment impliqués dans des maladies neurodégénératives (Shen et al., 2015).

### (d) NDP52

NDP52 ressemble beaucoup à OPTN du point de vue de l'architecture de ses domaines (Figure 18) : il possède lui aussi des domaines « *coiled-coil* », des LIRs et un domaine de liaison à l'ubiquitine à son extrémité C-term (UBZ). L'un de ses domaines LIR est dit « non canonique » puisqu'il ne possède pas de résidu aromatique au début de sa séquence. Du fait de ce domaine LIR unique, NDP52 se lie spécifiquement à LC3C qui est le seul orthologue d'ATG8 à pouvoir compenser la perte du résidu aromatique (von Muhlinen et al., 2012). Son deuxième domaine LIR est lui aussi atypique et qualifié de « *LIR-like* » : il permet aussi de lier LC3A, LC3B et/ou GABARAPL2 et est essentiel à la xénophagie et à la maturation des autophagosomes durant les infections bactériennes (Verlhac et al., 2015).

Comme dans la plupart des cas, NDP52 est capable de reconnaître des substrats ubiquitinés. Cependant, il existe une autre étiquette reconnue pour cibler certains cargos à la dégradation autophagique. En effet, le récepteur NDP52 peut également reconnaître les cargos à dégrader via son interaction avec la galectine 8, comme c'est le cas au cours des infections bactériennes. NDP52 possède donc 2 moyens d'action pour lutter contre les bactéries. Dans un cas, il peut être recruté par la galectine 8, qui est une lectine connue pour détecter les invasions bactériennes. En effet, lors d'une infection par *S. Typhimurium*, la bactérie se trouve dans une vésicule appelée SCV (pour *Salmonella containing vesicle*). Mais la bactérie peut endommager cette vacuole, et dans ce cas, exposer des motifs de glycosylation. La galectine 8 se lie alors à ces sucres et recrute NDP52. Le récepteur autophagique va à son tour recruter LC3 et toute la machinerie autophagique afin de dégrader la vacuole endommagée et la bactérie concernée (Thurston et al., 2012). Dans un autre cas, plus « classique », NDP52 est capable de reconnaître les bactéries polyubiquitinées comme *Salmonella enterica* après son entrée dans le cytoplasme de la cellule hôte. Elle recrute alors LC3 et active l'autophagie qui va alors dégrader la bactérie. Dans ce cas de figure, NDP52 est aussi capable de recruter la kinase TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) (Thurston et al., 2009), qui permet d'empêcher la croissance bactérienne.



On peut aussi signaler l'existence de *TRAF6-binding protein* (T6BP), qui est très proche de NDP52 et qui sont tous deux impliqués dans l'élimination de *Salmonella* par xénophagie. T6BP, aussi appelée TAX1BP1, permet en outre de recruter la myosine VI et donc les moteurs moléculaires à l'autophagosome (Tumbarello et al., 2015).

### (2) Autophagie de précision

Les protéines TRIM (pour *Tripartite motif*) sont une vaste famille codée par plus de 70 gènes chez les mammifères (Reymond et al., 2001). Ce sont des protéines très conservées au cours de l'évolution, qui jouent des rôles très variés au sein de la cellule.

Plusieurs études récentes indiquent que les protéines de la famille des TRIMs jouent un rôle important dans un nouveau type d'autophagie sélective, dite « autophagie de précision » (Kimura et al., 2016). TRIM est à la fois un récepteur mais aussi un régulateur de ce type d'autophagie, qu'il faut bien différencier de l'autophagie sélective « conventionnelle ». En effet, comme décrit précédemment, les récepteurs comme p62 ou NDP52 vont lier leur protéine cible, le plus souvent via une molécule signal comme l'ubiquitine ou la galectine, respectivement. Elles vont ensuite aller à l'autophagosome afin de se lier aux membres de la famille ATG8 grâce à leur domaine LIR. L'autophagie de précision, quant à elle, se démarque car ce n'est pas le récepteur qui va à l'autophagosome, mais l'autophagosome qui va venir s'assembler directement sur le récepteur, qui va donc aussi servir de plateforme d'assemblage. C'est une autophagie qui se déroule donc en 2 temps :

- Les protéines de la famille de TRIM reconnaissent tout d'abord leur cible grâce à une interaction protéine-protéine directe (Kimura et al., 2015; Mandell et al., 2014a). Elles n'ont a priori pas besoin d'une molécule signal comme l'ubiquitine.
- Une fois que TRIM a lié sa cible, elle va servir de plateforme d'assemblage au phagophore (Kimura et al., 2015; Mandell et al., 2014a). TRIM va directement s'assembler avec ULK1 et Beclin-1 pour former un complexe appelé « TRIMosome ». On observe d'ailleurs des colocalisations entre TRIM et les protéines majeures de la régulation de l'autophagie (FIP200, Vps34, ATG14L, UVRAG, WIPI, ATG16L, ATG5, ATG12, AMBRA1).

Les protéines TRIMs reconnaissent un grand nombre de substrats endogènes et exogènes, grâce à leurs domaines très variés à leur extrémité C-terminale. Pour les cibles endogènes, on peut citer TRIM20, qui reconnaît des composants de l'inflammasome comme la pro-caspase

1, NLRP1 et NLRP3, ainsi que TRIM21 qui reconnaît le régulateur de la réponse interféron (IFN) type I IRF3 (Kimura et al., 2015). Concernant les substrats exogènes, la protéine la plus caractérisée est sans doute RhTRIM5 (du singe Rhésus) qui joue le rôle de facteur de restriction contre le VIH-1 (Stremlau et al., 2004), en permettant la dégradation de sa capsidie par autophagie (Mandell et al., 2014b). Comme les récepteurs de l'autophagie sélective dite « conventionnelle », certaines protéines TRIM ont la capacité de se lier aux différents orthologues d'ATG8. Cette liaison peut être directe via un motif LIR ou indirecte en se liant d'abord aux récepteurs comme p62. Il semblerait que les TRIMs se lient préférentiellement à GABARAP et LC3A. L'interaction directe avec LC3B ne semble pas se faire mais pourrait être compensée par l'interaction avec p62 (Kimura et al., 2015; Mandell et al., 2014a; O'Connor et al., 2010).

### c) Interaction avec ATG8 via le LIR

Les récepteurs autophagiques permettent d'amener leurs substrats à l'autophagosome grâce à leur interaction avec les différents orthologues d'ATG8. Le motif d'interaction présent sur ces cargos est un motif LIR (Birgisdottir et al., 2013). Les premiers LIR caractérisés furent ceux de p62 pour les mammifères et ATG19 pour la levure, grâce à l'utilisation de différents mutants et de différentes approches comme les rayons X ou la RMN qui ont permis d'élucider leurs structures (Noda et al., 2008). Ils partagent un motif commun WxxL (où x peut être n'importe quel acide aminé) ainsi que la présence de résidus acides très proches impliqués dans la liaison à ATG8.

D'après des expériences de bio-informatique, il existerait plus de soixante interactants des différents orthologues de ATG8 (Behrends et al., 2010). La comparaison de leurs motifs LIR a permis d'établir un consensus concernant cette séquence D/E-D-W/F/Y-x-x-L/I/V (Johansen and Lamark, 2011).

- La région aromatique W/F/Y s'insère dans la poche hydrophobe du domaine « Ubiquitin-like » de LC3
- Les acides aminés hydrophobes L/I/V et les résidus acides s'insèrent dans la poche hydrophobe du domaine N-term de LC3

NDP52 possède un motif LIR atypique, qui ne possède pas de résidus aromatique (von Muhlinen et al., 2012) : il ne peut donc se lier qu'à LC3C et non pas à tous les orthologues d'ATG8. En effet, LC3C possède les résidus nécessaires pour compenser cette perte du point de vue de l'interaction grâce à des liaisons hydrogènes. Il faut toutefois noter que toutes les protéines ayant un LIR ne sont pas des récepteurs pour l'autophagie sélective : certaines sont au contraire impliquées dans la formation et la maturation de l'autophagosome (comme ULK1) (Kraft et al., 2012), voire même le transport et la maturation.

### d) Différentes formes d'autophagie sélective

L'autophagie sélective est impliquée dans la dégradation d'organites défectueux ou surnuméraires dans la cellule comme les mitochondries (mitophagie), les peroxysomes (pexophagie), les ribosomes (ribophagie) ou des microorganismes pathogènes intracellulaires (xénophagie, partie II.B.4.E.3). À l'exception de la mitophagie et de la xénophagie, les autres formes d'autophagie sélective sont encore assez peu étudiées chez les mammifères (Tableau 3).

**Tableau 3.** Différents types de l'autophagie sélective en fonction du substrat dégradé et récepteur(s) associé(s).

Nom	Substrat	Récepteurs impliqués
<b>Agréphagie</b>	Agrégats protéiques	p62 (Pankiv et al., 2007), NBR1 (Kirkin et al., 2009), OPTN (Korac et al., 2013)
<b>Pexophagie</b>	Peroxisomes	NBR1 (Deosaran et al., 2013), p62 (Deosaran et al., 2013; Kim et al., 2008), ATG30 (Farré et al., 2008), ATG36 (Motley et al., 2012a)
<b>Mitophagie</b>	Mitochondries	(Feng et al., 2013; Youle and Narendra, 2011) NIX (Novak et al., 2010), BNIP3 (Hanna et al., 2012), FUNDC1 (Liu et al., 2012), ATG32 (Okamoto et al., 2009)
<b>Xénophagie</b>	Bactéries / Virus	p62 (Judith et al., 2013; Orvedahl et al., 2010; Sagnier et al., 2015; Zheng et al., 2009), NDP52 (Thurston et al., 2009), OPTN (Wild et al., 2011)
<b>Glycophagie</b>	Glycogène	Stbd1 (Jiang et al., 2011)
<b>Réticulophagie</b>	Réticulum endoplasmique	
<b>Lipophagie</b>	Gouttelettes lipidiques	

<b>Ribophagie</b>	Ribosomes	
<b>Nucléophagie</b>	Partie du noyau	
<b>Lysophagie</b>	Lysosomes	p62 (Maejima et al., 2013)

### e) La pexophagie

La pexophagie désigne la dégradation sélective des peroxysomes par macroautophagie (Manjithaya et al., 2010). Le peroxysome est un organite qui participe à la détoxification de la cellule et au métabolisme des acides gras. Il contient entre autre des enzymes oxydatives comme la catalase et l'oxydase, qui lui permettent d'oxyder le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ , membre de la famille des ROS).  $H_2O_2$  est certes une molécule importante pour la signalisation redox de la cellule, mais c'est surtout un oxydant toxique pour les cellules : sa concentration doit donc être finement régulée. La pexophagie permet à la cellule de s'adapter aux changements d'environnement en maintenant un nombre adéquat de peroxysome dans la cellule (Iwata et al., 2006; Smith and Aitchison, 2013). Les mécanismes moléculaires à la base de ce processus ont été principalement étudiés chez la levure et beaucoup moins chez les mammifères (Honsho et al., 2015).

Ce mécanisme semble être très important car l'accumulation non contrôlée des peroxysomes est associée à des maladies neurodégénératives et à un vieillissement prématuré des cellules (Legakis et al., 2002). Chez les eucaryotes, quatre récepteurs ont pour le moment été identifiés : ATG30, ATG36 (chez la levure), NBR1 et p62 (chez les mammifères) (Deosaran et al., 2013; Farré et al., 2008; Motley et al., 2012b; Yamashita et al., 2014).

Les peroxysomes peuvent être ciblés à la pexophagie via plusieurs mécanismes différents (Figure 19) :

- En cas de carence nutritionnelle, LC3 peut se lier directement à PEX14, qui est une protéine membranaire du peroxysome (Jiang et al., 2015).
- Après ubiquitination de PEX 5, p62 et NBR1 transloquent au peroxysome en se liant à l'ubiquitine et recrutent la machinerie autophagique grâce à leur domaine LIR (Deosaran et al., 2013). Zhang et ses collaborateurs ont montré que les ROS activent une cascade de signalisation qui va aboutir à la pexophagie, via la protéine kinase ATM. En effet, ATM a la faculté de phosphoryler PEX5, se faisant, elle va induire son ubiquitination et donc sa

reconnaissance par les récepteurs de l'autophagie sélective (Zhang et al., 2015). En parallèle, ATM va d'ailleurs activer ULK1 et inhiber mTOR pour induire l'autophagie (Alexander et al., 2010). Néanmoins, PEX5 n'est sans doute pas la seule protéine peroxysomale ubiquitinée et d'autres cibles de la pexophagie doivent encore être recherchées.

- Enfin, des travaux de Peter Kijun Kim et al. ont montré que l'utilisation de protéines peroxysomales (PMP34 et Pex3) fusionnées à une mono-ubiquitine était suffisante pour induire de la pexophagie (Kim et al., 2008).

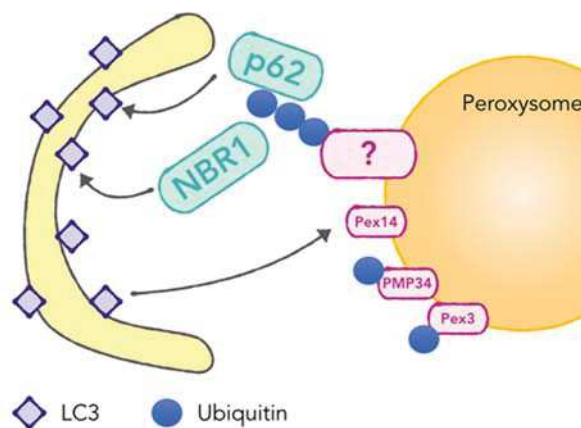


Figure 19. Mécanismes de la pexophagie chez les mammifères

Chez les levures, les peroxysomes peuvent aussi être dégradés par micropexophagie : la membrane de la vacuole peut s'invaginer et venir emprisonner sélectivement les peroxysomes. Ils seront par la suite dégradés sous l'action des hydrolases (Platta and Erdmann, 2007).

### III. Rôle de l'autophagie dans l'équilibre entre la survie et la mort cellulaire

---

L'autophagie joue un rôle important dans nombreuses grandes fonctions cellulaires comme la différenciation, le développement, le vieillissement, l'immunité et régule la balance entre la survie et la mort cellulaire.

#### A. L'autophagie : un mécanisme de survie

Au niveau cellulaire, l'autophagie est essentielle au maintien de l'homéostasie : elle assure le contrôle qualité de la cellule en éliminant les organelles abîmés ou surnuméraires et permet de maintenir le pool d'acides aminés et la production d'énergie pendant les carences nutritionnelles. En cas de stress, la cellule induit donc l'autophagie pour favoriser sa survie et éviter l'apoptose en dégradant certains de ses régulateurs (Gordy and He, 2012; Rubinstein and Kimchi, 2012).

L'un des mécanismes les mieux décrits, par lequel l'autophagie inhibe l'apoptose, est la mitophagie (Mariño et al., 2014). La mitochondrie est au cœur de la signalisation de l'apoptose : elle libère entre autres des protéines activatrices des caspases comme le cytochrome c. Les mitochondries endommagées sont particulièrement susceptibles d'activer l'apoptose, mais la mitophagie permet de limiter le phénomène. Ces mitochondries endommagées ont une diminution de leur potentiel membranaire  $\Delta\Psi_m$ , ce qui est synonyme, soit d'un problème dans la chaîne respiratoire mitochondriale, soit de la perméabilisation de la membrane interne de la mitochondrie. Ce changement de potentiel induit l'accumulation de PINK1, et l'ubiquitination de certaines protéines présentes à la membrane de la mitochondrie (comme VDAC1, MFN1 et 2) par la E3 ligase PARKIN. Les organelles endommagées vont ainsi être ciblées par des récepteurs autophagiques et amenées à l'autophagosome (Youle and Narendra, 2011).

L'autophagie peut aussi empêcher la mort de certaines cellules en dégradant sélectivement certaines protéines pro-apoptotiques afin de réduire leur abondance dans le cytosol, comme la caspase 8 (Hou et al., 2010). On peut aussi signaler la dégradation de p62 comme un

mécanisme pour protéger la cellule de la mort (Mathew et al., 2009). En effet, p62, quand elle est surexprimée, entraîne la production de ROS qui peuvent mener à la mort cellulaire.

### B. L'autophagie en tant que mécanisme de mort cellulaire

Même si l'autophagie reste un processus qui permet aux cellules de survivre en conditions de stress, il a été proposé que, dans certains cas, l'autophagie représente une forme alternative de mort cellulaire (aussi appelée « mort cellulaire de type 2 »). Des observations morphologiques réalisées au microscope électronique ont en effet montré que la mort cellulaire pouvait s'accompagner d'un grand nombre d'autophagosomes et des autres marqueurs caractéristiques de l'autophagie. Il faut néanmoins être prudent avec ces observations car l'induction d'autophagie dans ces cellules peut au contraire résulter d'une tentative de la cellule pour survivre et non pas d'une mort cellulaire autophagique. Il faut donc bien différencier la mort « par » autophagie de la mort « avec » autophagie (Galluzzi et al., 2012; Shen and Codogno, 2011).

L'autophagie peut effectivement être une forme de mort cellulaire dans les situations où l'apoptose est inhibée. Il faut pour cela que la mort de la cellule remplisse plusieurs critères : (i) elle doit se faire sans activation des caspases, (ii) on doit observer une induction d'autophagie, et (iii) elle doit être bloquée en présence d'inhibiteurs pharmacologiques de l'autophagie (Shen and Codogno, 2011). Par exemple, des cellules délétées du gène BAX (une des protéines majeures de régulation de l'apoptose), et qui ne peuvent donc pas induire d'apoptose, peuvent quand même mourir en réponse à différents stimuli : cette mort est d'ailleurs dépendante de certains ATGs, car l'inhibition de ATG5 et Beclin-1 est suffisante pour permettre la survie de ces cellules (Shimizu et al., 2004). On sait aussi que quand les caspases sont inhibées par des drogues, cela induit l'autophagie et la mort cellulaire. Cette inhibition des caspases conduit en fait à la dégradation par autophagie sélective de la catalase, qui est une enzyme du peroxysome. La cellule n'est alors plus détoxifiée, ce qui cause une accumulation de ROS qui finit par tuer la cellule (Yu et al., 2006). Ces situations restent très rares et ne correspondent pas à la réalité physiologique de la cellule : les cellules utilisent peut être cette voie de mort cellulaire en l'absence d'autres options. Les processus impliqués dans cette mort cellulaire dite dépendante de l'autophagie ne sont pas très clairs, mais les exemples de la littérature (Nezis et al., 2010a, 2010b; Yu et al., 2006) suggèrent que, dans la plupart des

cas, un facteur de survie dont l'absence conduirait à l'apoptose, serait dégradé par autophagie. La mort autophagique joue aussi un rôle important dans le remodelage tissulaire au cours de développement ainsi que dans les cellules cancéreuses (Baehrecke, 2003).

### C. Autophagie et apoptose : des mécanismes intimement liés

De façon intéressante, de plus en plus de travaux montrent que l'autophagie et l'apoptose sont des processus étroitement liés. En effet, l'autophagie peut être indépendante de l'apoptose, l'inhiber ou au contraire être nécessaire à son induction. Cependant, les voies de signalisation responsables de ces connexions ne sont pas claires.

Un lien moléculaire entre ces deux processus provient de l'interaction entre la protéine autophagique Beclin-1 et les protéines de la famille de Bcl-2. Cette interaction pourrait jouer un rôle de « rhéostat » entre autophagie et apoptose et ainsi déterminer le devenir de la cellule. On sait déjà que l'interaction Beclin-1 / Bcl-2 peut inhiber l'autophagie, mais elle aurait aussi un rôle sur l'apoptose. En effet, Beclin-1 possède un domaine BH3, qui lui permet de se lier aux protéines de la famille de Bcl-2. En se liant à son récepteur, le domaine BH3 de Beclin-1 peut, au choix, inhiber les protéines Bcl-2 et Bcl-XL qui sont anti-apoptotiques, ou activer les protéines BAX et BAD, qui sont pro-apoptotiques. Beclin-1 peut donc à son tour réguler l'apoptose (Galonek and Hardwick, 2006). La protéine DAPK, qui est un suppresseur de tumeur, est elle aussi capable de contrôler aussi bien l'apoptose que l'autophagie via le rhéostat Beclin-1/ Bcl-2, en réponse à divers signaux de stress comme un stress du RE. Elle agit en phosphorylant Beclin-1 dans son domaine BH3, ce qui entraîne sa dissociation de Bcl-2 et donc l'induction de l'autophagie.

Au cours de l'apoptose, les caspase activées peuvent cliver leurs substrats, parmi lesquels Beclin-1. Cela a pour conséquence de perturber et d'empêcher les fonctions de Beclin-1 dans la machinerie moléculaire de l'autophagie. Le fragment de Beclin-1 ainsi généré transloque à la mitochondrie où il va favoriser la libération de facteurs pro-apoptotiques (Wirawan et al., 2010). Plusieurs autres ATGs (ATG5, ATG4, PI3K) sont aussi la cible des caspases (Betin and Lane, 2009; Yousefi et al., 2006).

Des travaux ont montré que la protéine anti-apoptotique FLIP peut aussi inhiber l'autophagie. C'est une protéine connue pour pouvoir se lier aux caspases initiateurs 8 et 10 et ainsi inhiber



leur recrutement aux récepteurs de mort et leur activation. Il a été montré que FLIP peut aussi entrer en compétition avec ATG3 pour la liaison avec ATG8. En empêchant le système de conjugaison d'être efficace, FLIP empêche l'élongation des autophagosomes et donc inhibe l'autophagie (Lee et al., 2009).

p53 est un facteur de transcription connu, qui régule la mort cellulaire programmée : il est activé dans de nombreuses conditions (comme des dégâts à l'ADN, ou une hypoxie). Il permet d'induire l'apoptose en favorisant la transcription des membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 et d'autres protéines effectrices essentielles. p53 peut aussi induire l'autophagie en inhibant mTOR (par différentes voies) (Feng et al., 2005) et en activant la transcription du gène *DRAM1* (*Damage-Regulated Autophagy Modulator 1*) dont le produit est une protéine lysosomale qui stimule l'autophagie (Crichton et al., 2006). La protéine p53 localisée dans le noyau est un facteur de transcription qui active l'autophagie mais le rôle de p53 semble plus ambigu puisque, localisé dans le cytoplasme, il réprime l'autophagie (Tasdemir et al., 2008).

Les autophagosomes, indépendamment du flux, peuvent aussi servir de plateforme d'activation aux caspases, et par là même jouer un rôle dans la mort de la cellule (Young et al., 2012).

## IV. Rôle de l'autophagie au cours des infections virales

---

Durant ma thèse, j'ai eu l'opportunité de participer à l'élaboration d'une revue sur les relations entre l'autophagie, et plus particulièrement l'autophagie sélective, et les virus (Annexe 4).

### A. Autophagie et défense contre les agents pathogènes

Le rôle essentiel de l'autophagie dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et dans la réponse au stress en fait, logiquement, un processus important dans les mécanismes d'immunité innée et adaptative. En effet, différents signaux permettant la reconnaissance des agents pathogènes peuvent induire l'autophagie. Parmi ces signaux, on retrouve les PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), comprenant les TLRs (*Toll-Like Receptors*), les NLRs (*NOD-Like Receptors*), et les RLRs (*RIGI-Like Receptors*), les PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), les DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*), l'interféron de type I, sécrété en réponse aux infections virales, l'interleukine IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  (Deretic, 2012).

C'est l'étude du rôle de l'autophagie au cours des infections bactériennes, notamment par *Streptococcus pyogenes* et *Mycobacterium tuberculosis*, qui a permis de mieux comprendre la xénophagie (Amano et al., 2006; Deretic et al., 2006). Suite à ces premiers travaux, il a été montré que l'autophagie jouait un rôle sur un nombre croissant de bactéries (par exemple *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* et *Salmonella thyphimurium*), mais aussi des parasites (*Toxoplasma gondii*) et des virus (par exemple le virus Sindbis SINV, le virus du Chikungunya CHIKV ou VIH).

Des relations complexes ont été mises en place au cours de l'évolution entre l'autophagie et les agents pathogènes. Par conséquent, même si ce mécanisme restreint la virulence de nombreux agents infectieux dans les organismes eucaryotes, ces derniers ont développé des moyens pour éviter l'autophagie, la bloquer ou, au contraire, l'utiliser afin de se répliquer efficacement (Wileman, 2013).

Les virus sont des parasites intracellulaires : leur survie dépend donc de leur capacité à vaincre les défenses antivirales de la cellule et à prendre le contrôle de la machinerie cellulaire afin de favoriser leur réplication.

L'autophagie est un des plus anciens mécanismes de défense contre les infections. Par conséquent, les virus ont évolué pour mettre en place des stratégies afin de contrer ou détourner ce mécanisme et en tirer profit pour leur multiplication. Les interactions plus précises entre l'autophagie et le VIH-1 seront détaillées plus loin, dans une sous partie qui leurs sera consacrée (Chapitre IV.C).

### B. Relation autophagie/virus

#### 1. L'autophagie : un mécanisme antiviral détourné par les virus

##### a) Induction de l'autophagie par les virus

De nombreux virus, qu'ils soient à ADN ou à ARN, induisent une augmentation du nombre d'autophagosomes dans les cellules infectées. Cette augmentation peut être le fruit soit d'une induction de l'autophagie, soit d'une inhibition du flux, qui conduit à l'accumulation des autophagosomes. Il faut donc dans ce contexte être particulièrement attentif à la dynamique du flux autophagique (Klionsky et al., 2016). Néanmoins, l'autophagie est souvent rapidement activée après une infection virale et plusieurs mécanismes ont été clairement identifiés, qui diffèrent selon le virus impliqué et/ou la cellule hôte. Selon le signal qui va l'induire, elle pourra être soit anti virale, soit provirale.

Des travaux réalisés sur l'infection par Sindbis ou par le virus de l'hépatite C (HCV) montrent que ces virus induisent l'autophagie dans les cellules qu'ils infectent. L'infection de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) exprimant GFP-LC3 (*Green fluorescent protein* couplée à LC3) par le virus Sindbis montre en effet une augmentation du nombre de cellules avec des puncta de GFP-LC3, et donc d'autophagosomes. En parallèle, les niveaux d'expression de p62 diminuent alors que sa quantité d'ARNm reste stable, ce qui montre que le flux induit par le virus Sindbis est complet et dégradatif (Orvedahl et al., 2010). Dans le cas d'une infection par HCV, Ke et ses collaborateurs ont montré qu'en présence d'AP, de CQ ou de BafA1, le niveau d'expression de LC3-II était plus important dans les cellules infectées que

dans les contrôles non infectées, ce qui prouve qu'HCV induit une réponse autophagique complète (Ke and Chen, 2011).

Plusieurs étapes du cycle viral sont capables d'induire l'autophagie, dont l'attachement du virus ou sa réplication. Deux des exemples les plus connus d'induction de l'autophagie après liaison du virus à un récepteur de surface de la cellule hôte concernent CD46 et CD4. CD46 est un récepteur transmembranaire très impliqué dans l'immunité : il est aussi reconnu comme récepteur d'entrée par de nombreux agents pathogènes (comme Herpès virus 6, certains adénovirus, ou encore la rougeole). Les souches atténuées du virus de la rougeole sont en effet capables d'induire l'autophagie après engagement de ce récepteur via une association indirecte au complexe Beclin-1 (Joubert et al., 2009). Dans le cas de la liaison d'un virus à CD4, il s'agit du VIH-1. Notre équipe a montré que Env, et plus particulièrement l'activité fusogénique de la gp41, exprimée à la surface de cellules infectées, est responsable du déclenchement de l'autophagie dans les cellules T CD4 non infectées (Denizot et al., 2008; Espert et al., 2006). (Voir chapitre 5)

Plusieurs virus peuvent aussi induire l'autophagie de manière indirecte. En effet, en initiant leurs étapes de réplication, de nombreuses infections induisent un stress cellulaire (stress du réticulum endoplasmique, production de ROS, dépolarisation des mitochondries) qui est déjà connu pour être un des stimuli induisant l'autophagie. En particulier, HCV est capable d'activer les voies de signalisation associée au stress du réticulum endoplasmique (ou UPR pour *Unfolded Protein Response*) (Ke and Chen, 2011). Chakrabarti et ses collaborateurs ont montré que l'activation de la RNase L durant les infections virales induisait elle aussi l'autophagie (Chakrabarti et al., 2012). La RNase L est une nucléase activée par les virus, qui détruit les ARNs viraux et cellulaires présents dans la cellule. Elle aurait aussi la capacité d'induire l'apoptose (Zhou et al., 1997) et la pyroptose (Chakrabarti et al., 2015) dans ces cellules, illustrant bien les liens entre ces voies et l'importance de la RNase L dans l'immunité antivirale. Classiquement, l'autophagie est aussi activée indirectement après stimulation des PRRs ou après la production d'IFN $\gamma$ .

Certaines protéines virales participent aussi à l'induction de l'autophagie et peuvent à elles seules l'activer. C'est le cas par exemple de la protéine C du virus de la rougeole (Measle Virus) (Richetta et al., 2013), ou des protéines NS4B, NS5A et NS5B du virus de l'hépatite C (Sir et al., 2012).

A la suite de son activation par ces différents signaux, l'autophagie joue un rôle majeur dans l'élimination des agents pathogènes intracellulaires par un processus d'autophagie sélective appelé xénophagie. Le rôle de la virophagie est encore assez peu étudié et sera détaillé plus loin, dans le paragraphe IV.C qui lui sera consacré.

### b) Implication dans la réponse immunitaire antivirale

L'autophagie peut également exercer son rôle antiviral en participant aux réponses immunitaires innée et adaptative.

#### (1) *Immunité innée*

Durant une infection, il existe plusieurs senseurs cytosoliques et endosomaux qui permettent de détecter les acides nucléiques étrangers et d'induire une réponse immunitaire innée. Elle est induite immédiatement après l'infection par un signal de danger émis suite à l'interaction entre les PRRs et des molécules du non soi appelées PAMPs. Les PRRs regroupent entre autres les TLRs, les RLRs et les NLRs (Bowie and Unterholzner, 2008; Deretic, 2012). Ces récepteurs induisent une cascade de signalisation qui active des facteurs de transcription comme le NF- $\kappa$ B, qui va à son tour permettre la transcription de protéines antimicrobiennes et activer d'autres types de défense. La majorité des TLRs recrutent la protéine adaptatrice MyD88 après leur engagement, ainsi que, pour certains, la protéine adaptatrice TRIF. Ces 2 protéines entraînent des voies de signalisation qui permettent d'activer les facteurs de transcription IRF et induisent donc la production d'IFN-I.

Plusieurs études indiquent que l'activation de certains TLRs induit l'autophagie dans certains types cellulaires (Deretic, 2009; Xu et al., 2008). Par exemple, les TLR7 et 3 (très impliqués dans les réponses innées aux virus) induisent l'autophagie in vitro après leur activation par de l'ARN simple brin et double brin présent dans les génomes viraux (Delgado et al., 2008; Shi and Kehrl, 2008). Le mécanisme précis n'est pas encore connu mais on sait qu'il fait intervenir les protéines MyD88 et TRIF, décrites précédemment. Elles permettraient le recrutement de Beclin-1 et inhiberaient son interaction avec Bcl-2, induisant par là même l'autophagie (Shi and Kehrl, 2008).

L'autophagie et/ou les ATG peuvent aussi, en retour, cibler des ligands directement aux TLRs et favoriser leur activation. Lee et al. ont montré que la production d'IFN $\alpha$  par les DCs plasmacytoides infectées par le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) est dépendante de l'autophagie, et plus spécifiquement d'ATG5 (Lee et al., 2007). Elle permet en effet de cibler les intermédiaires de la réplication virale au TLR7 présent dans les endosomes tardifs. Quand on traite les cellules infectées avec de la 3-MA, le TLR7 n'est plus activé et il n'y a plus de production d'IFN $\alpha$ .

D'autres voies de signalisation peuvent moduler et être modulées par l'autophagie. On peut ainsi penser, de manière non exhaustive, à :

- La protéine kinase R (PKR), qui fait partie des ISG (pour *Interferon stimulated genes*). Elle est la cible de nombreuses protéines virales qui cherchent à contrer sa voie de signalisation, car elle est un facteur essentiel dans l'action antivirale des IFN. Elle et son substrat eIF2 $\alpha$  sont nécessaires à l'induction de l'autophagie dans les cellules infectées par un virus (voir chapitre III sur les virus).
- L'autophagie permet d'exercer un contrôle de l'inflammation en régulant négativement l'inflammasome. L'inflammasome est un complexe multi-protéique composé d'un récepteur appartenant à la famille des NLR, d'une protéine adaptatrice nommée ASC et de la pro-caspase 1. L'activation de l'inflammasome conduit au clivage de la pro-caspase 1 en caspase 1 active, qui clive alors les précurseurs pro-IL1 et pro-IL18 afin de générer des interleukines inflammatoires IL1 et IL18 actives. Il a été décrit que l'activation de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 sont augmentées lorsque l'autophagie est inhibée, suggérant que l'autophagie agit négativement sur l'inflammation (Shi et al., 2012). A l'inverse, l'activation de l'inflammasome semble conduire à l'activation de l'autophagie.
- L'autophagie intervient également dans le contrôle de l'inflammation, en régulant négativement la voie NF- $\kappa$ B grâce à la dégradation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B lui-même ou la dégradation de protéines intervenant dans la signalisation (Faure and Lafont, 2013).
- IRGM contribue aussi à l'autophagie dans le cadre de la réponse immunitaire innée. Elle est impliquée dans la régulation de l'autophagie grâce à son interaction avec les mitochondries. C'est une cible importante des virus à ARN qui s'en servent pour

moduler l'autophagie à leur avantage (Grégoire et al., 2011) (voir chapitre III sur les virus).

- Beaucoup de cytokines, dont la synthèse des gènes est d'ailleurs activée par NF- $\kappa$ B, sont capables de moduler l'autophagie, que ce soit pour l'induire (comme IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6 et TGF- $\beta$ ) ou l'inhiber (IL-4, IL-10 et IL-13). On observe aussi des boucles de régulations, positives et négatives, car l'autophagie peut elle aussi réguler la production et la sécrétion de ces cytokines et par là même réguler l'inflammation et la coordination entre les différentes réponses du système immunitaire (Harris, 2011).

### (2) *Immunité adaptative*

L'autophagie ne se limite pas à la réponse immunitaire innée, mais participe aussi activement à la réponse immunitaire adaptative. Elle est en effet impliquée dans la présentation antigénique par le CMH. Dans les CPA, l'autophagie contribue à la présentation de peptides dérivés de protéines virales : les autophagosomes sont en effet capables de fusionner avec les compartiments de charge du CMH-II pour leur fournir du matériel viral. D'ailleurs, si on inhibe le complexe Vps34 dans les CPA, on observe une diminution de la présentation de certains antigènes (Nimmerjahn et al., 2003). Une autre étude, faite sur un antigène du virus Epstein-Barr EBNA-1, montre qu'en bloquant l'acidification du lysosome, on observe une accumulation de cet antigène dans des autolysosomes et que sa présentation aux cellules T par les molécules du CMH en est diminuée (Paludan et al., 2005). Par conséquent, l'autophagie participe à l'activation des clones T CD4 de certains antigènes. Elle est aussi importante dans le processus de sélection thymique des lymphocytes T CD4, qui permet l'acquisition de la tolérance au soi (Kuballa et al., 2012; Nedjic et al., 2008).

Quelques travaux ont montré que l'autophagie pouvait aussi avoir de l'influence sur la voie de présentation des antigènes par le CMH-I mais les preuves restent pour l'instant limitées. L'inhibition de l'autophagie, par l'utilisation de drogues pharmacologiques ou de siRNA dirigés contre la machinerie, ne perturbe d'ailleurs pas la présentation antigénique (Nimmerjahn et al., 2003; Paludan et al., 2005). Néanmoins, il semblerait que l'autophagie contribue au moins partiellement à la présentation d'antigènes pathogéniques, notamment en ce qui concerne les étapes tardives de l'infection par le virus de l'herpès de type 1 HSV-1 (English et al., 2009).

L'autophagie joue un rôle plus important dans la présentation croisée au CMH-I : il s'agit de la présentation par le CMH de classe I d'un antigène exogène après sa phagocytose. Comme précédemment, l'inhibition de l'autophagie n'a aucune incidence sur cette cross présentation (Lee et al., 2010), mais son induction, au contraire, a la capacité d'améliorer de manière significative la présentation antigénique aux CD8 (Li et al., 2008).

### c) Echappement de l'autophagie par les virus

De nombreux virus ont évolué afin d'être en mesure de contrer l'autophagie à plusieurs niveaux du processus, ce qui suggère bien que l'autophagie est antivirale. En effet, ils peuvent l'inhiber, soit en empêchant la formation des autophagosomes, soit en bloquant ses étapes tardives de maturation et de fusion (Figure 20). Dans le premier cas, une absence d'augmentation, voire une diminution du nombre des autophagosomes est observée. C'est notamment le cas de plusieurs virus de la famille des virus herpès comme HSV-1, HCMV (*Human CytoMegalovirus*) ou KSHV (*Kaposi's Sarcoma-associated Herpes Virus*) (Cavignac and Esclatine, 2010).

HSV-1, par exemple, est capable de bloquer l'initiation de l'autophagie via plusieurs mécanismes. Tout d'abord, il code pour la protéine ICP34.5, qui est capable de se lier à Beclin-1 et donc de l'empêcher de rejoindre le complexe Vps34 (Orvedahl et al., 2007). Il code aussi pour une deuxième protéine Us11, qui est une protéine produite plus tardivement et qui permet un deuxième blocage de l'autophagie en interagissant avec la PKR (*dsRNA-dependent protein kinase*). PKR est connue pour son rôle antiviral, qu'elle exerce en phosphorylant le facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$ , et, qui va bloquer la traduction. La forme phosphorylée de eIF2 $\alpha$  est aussi connue pour induire l'autophagie. Ainsi, Us11 peut empêcher l'arrêt de la traduction des protéines induit par la PKR et inhiber l'autophagie induite en réponse à l'infection par HSV-1 (Lussignol et al., 2013). Les autres herpèsvirus, comme KSHV, et l'herpesvirus murin 68 (MHV68) codent aussi des protéines capables de se lier de manière compétitive à Beclin-1 (avec beaucoup d'affinité) afin d'inhiber son interaction à Vps34 et donc empêcher la formation des autophagosomes : KSHV code pour VBcl-2 et MHV68 pour M11 (Ku et al., 2008; Liang et al., 2008).



En revanche, d'autres virus bloquent plutôt les étapes tardives de l'autophagie. On observe alors une augmentation du nombre d'autophagosomes dans le cytoplasme des cellules cibles due à une absence de fusion avec les lysosomes et des étapes de dégradation. Ce mécanisme d'inhibition de l'autophagie a, par exemple, été observé au cours de l'infection par le poliovirus (Jackson et al., 2005), le virus de la Dengue (Metz et al., 2015), le virus de l'hépatite B (HBV) (Liu et al., 2014), l'hépatite C (Sir et al., 2012) ou le virus de la grippe (Gannagé et al., 2009).

### 2. Détournement de l'autophagie par les virus

En plus de pouvoir inhiber ou bloquer l'autophagie, certains virus ont développé des stratégies pour pouvoir l'utiliser à leur avantage. Plusieurs virus se multiplient donc plus facilement quand l'autophagie est induite et/ou fonctionnelle (Figure 20).

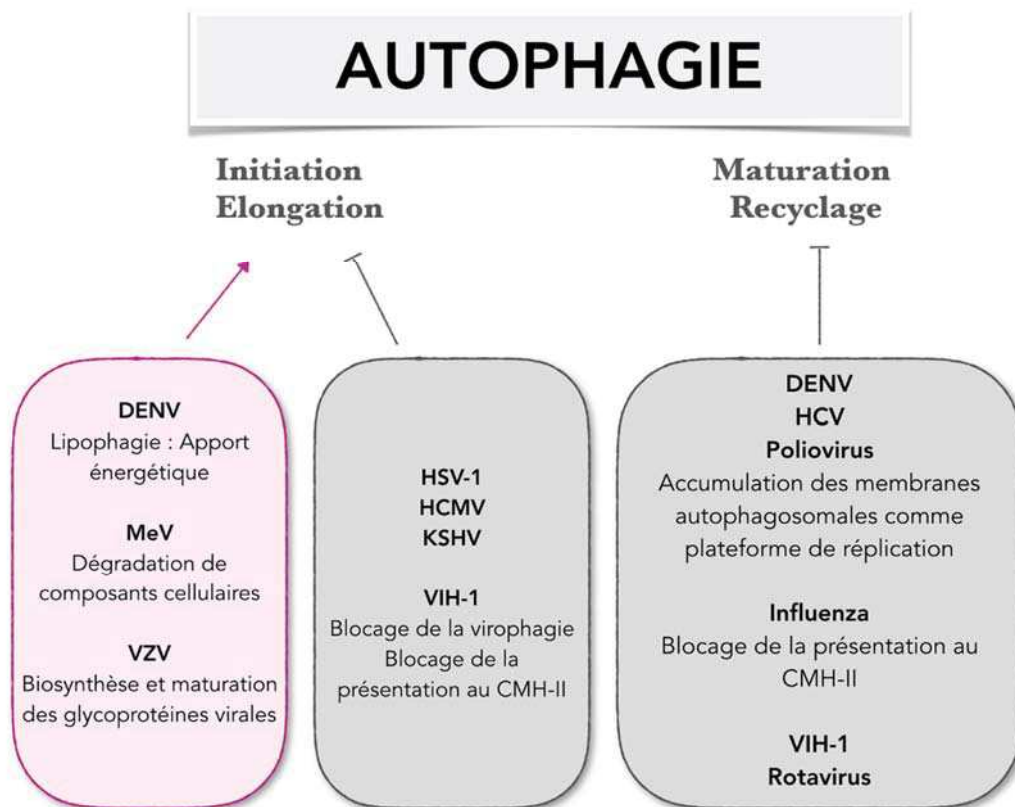
Dans les cas de l'infection par le poliovirus ou HCV, le blocage des phases tardives de l'autophagie permettrait d'accumuler des membranes autophagosomales qui serviraient de plate-forme de réplication (Jackson et al. 2005; Sir et al. 2012). Cela prouve que les virus ont élaboré des stratégies leur permettant d'utiliser l'autophagie dans leur propre intérêt et que celle-ci est donc en un sens devenue provirale (Figure 20). D'une manière générale, il semblerait que ce soit majoritairement les virus à ARN qui exploitent les autophagosomes de cette manière pour favoriser leur réplication, avec chacun quelques spécificités. Le virus coxsackie de type B3 (ou CVB3) et le rotavirus ont totalement détourné l'autophagie : ils l'induisent pour pouvoir mieux la bloquer lors de ses étapes de maturation afin d'accumuler des autophagosomes, qui serviront de plateforme de réplication, tout en évitant leur propre dégradation (Crawford et al., 2012; Kemball et al., 2010). Dans le cas du virus Influenza, l'inhibition de la fusion entre autophagosomes et lysosomes par la protéine virale M2 préviendrait la dégradation des protéines virales et leur présentation par le CMH, et réduirait ainsi la réponse immunitaire contre cette infection (Gannagé et al. 2009).

Enfin, le processus autophagique complet est quelquefois utilisé pour fournir l'énergie nécessaire aux virus pour leur réplication. Dans ce cas, une inhibition de l'autophagie bloquerait la dernière étape de maturation des virus, et empêcherait la formation de

nouvelles particules virales infectieuses. C'est le cas, entres autres, du poliovirus (Jackson et al., 2005). Cette stratégie est également utilisée par le virus de la Dengue (DENV) qui induit la dégradation autophagique de gouttelettes lipidiques et de triglycérides dans le but de produire de l'ATP (adénosine triphosphate) nécessaire à sa réplication (Heaton and Randall, 2010). Dans le cas du virus de la rougeole (Measles Virus, MeV), l'autophagie est induite, fonctionnelle et bénéficie au virus en limitant la mort des cellules infectées et en permettant une meilleure réplication virale (Richetta et al., 2013). Le virus de la varicelle (*Varicella Zoster Virus*, VZV) induit l'autophagie dans ses cellules cibles et l'utilise pour la biosynthèse et la maturation de ses glycoprotéines (Buckingham et al., 2014).

Les organismes infectés vont aussi chercher à contenir et à éliminer les microorganismes pathogènes en induisant la mort programmée des cellules infectées. En induisant l'autophagie, les virus chercheraient alors plutôt à faciliter la survie de leur cellule hôte jusqu'à ce que leur cycle répliatif soit accompli. Il a d'ailleurs été montré que l'autophagie limite l'apparition de l'apoptose dans les cellules infectées par CHIKV, SINV ou le virus de la grippe (Joubert et al., 2012; Orvedahl et al., 2010; Zhirnov and Klenk, 2013).

L'ensemble de ces données montrent l'amplitude et la complexité des relations existantes entre les infections virales et la réponse autophagique de l'hôte. Le rôle majeur de l'autophagie dans l'immunité innée a donc imposé une pression de sélection sur les virus. La recherche des mécanismes par lesquels l'autophagie exerce ses effets antiviraux est donc essentielle dans le but de restaurer cette immunité. On peut alors penser que, dans le cas où l'autophagie ne serait pas bloquée par les virus, elle devrait être extrêmement sélective de l'infection.



**Figure 20. Modulation de l'autophagie par les virus**

*Les virus peuvent soit induire l'autophagie (exemples en rose sur le schéma), soit l'inhiber (exemples en gris sur le schéma) afin de se répliquer efficacement.*

## C. Autophagie sélective au cours des infections virales

### 1. Virophagie

Comme nous l'avons vu dans la partie concernant l'autophagie et l'immunité antivirale (en IV.B.1.), les autophagosomes peuvent transporter de manière spécifique des agents pathogènes aux PRRs et aux compartiments de chargement du CMH afin d'induire des réponses immunitaires. Mais l'autophagie peut aussi cibler sélectivement des protéines virales afin de les dégrader, grâce aux récepteurs décrits dans la partie concernant l'autophagie sélective (paragraphe II.B.3.b). Ce champ d'étude est relativement récent dans le cadre des virus, et peu de cibles ont pour l'instant été décrites. Le premier cas de dégradation sélective d'une protéine virale par autophagie a été rapporté par le groupe de Beth Levine et concerne l'infection par le virus Sindbis. Dans cette étude, les auteurs ont

montré que l'infection par ce virus à tropisme neuronal induit l'autophagie dans les neurones de souris infectées. La caractérisation du rôle de l'autophagie au cours de cette infection leur a permis de montrer que le récepteur autophagique p62/SQSTM1 conduit sélectivement la protéine de capsid du virus Sindbis à la dégradation par autophagie. De façon intéressante, cette dégradation n'a pas d'effet sur la réplication virale mais a un rôle dans la survie des cellules infectées, ce qui constitue un avantage pour le virus. Les auteurs suggèrent que la dégradation sélective par autophagie de la capsid virale permettrait de limiter son expression et d'empêcher son agrégation qui constituerait un signal de mort cellulaire. Il est à noter que le domaine UBA de p62/SQSTM1, impliqué dans la liaison de ce récepteur à l'ubiquitine, n'est pas requis pour son interaction avec la capsid du virus Sindbis, suggérant ainsi une dégradation indépendante de cette étiquette (Orvedahl et al. 2010). La capsid du CHIKV est également dégradée par autophagie, après sa liaison à p62. (Judith et al., 2013). Contrairement aux deux cas précédents, la dégradation de protéines virales par autophagie sélective n'est pas toujours avantageuse pour le virus. En effet, dans le cas du VIH-1 (rétrovirus de la famille des lentivirus), le transactivateur viral Tat est sélectivement conduit à la dégradation par le récepteur p62/SQSTM1. Ce processus fait de l'autophagie un puissant mécanisme anti-VIH. Cette dégradation de Tat via p62, sera décrite plus en détail dans la partie résultats.

Il est intéressant de noter que le transactivateur viral Tax du virus de la leucémie T humaine (HTLV-1 pour *Human T cell Leukemia Virus*) semble également être une cible de dégradation par autophagie. En effet, le blocage de l'autophagie permet d'augmenter l'expression de cette protéine dans des cellules HeLa. Cependant, les auteurs n'ont pas étudié le rôle potentiel de l'autophagie sélective dans ce contexte (Tang et al., 2013). Une autre protéine du VIH-1 semble être la cible d'une dégradation autophagique. En effet, il a été montré que la protéine de capsid de ce virus est dégradée sélectivement par autophagie grâce à son interaction avec le facteur de restriction TRIM5. Dans ces travaux, TRIM5 se comporte comme un récepteur autophagique puisqu'il permet la dégradation de la capsid via son interaction avec la protéine autophagique LC3. De plus, cette dégradation sélective aurait un rôle dans la restriction de l'infection par le VIH-1 (Mandell et al., 2014b). Cependant ces travaux sont controversés. En effet, une autre étude a montré que, bien que l'expression de TRIM5 soit régulée par autophagie et que TRIM5 soit associé à plusieurs facteurs de la machinerie

autophagique, la restriction de l'infection due à cette protéine n'était pas associée à son rôle dans l'autophagie (Imam et al., 2016).

### 2. Inhibition de l'autophagie sélective par les virus

L'autophagie sélective de protéine virale est un moyen pour la cellule hôte de lutter contre l'infection même si, dans certains cas, ce processus peut également être bénéfique au virus en permettant la survie cellulaire. Afin de s'affranchir des effets antiviraux de l'autophagie sélective, certains virus sont en mesure de cibler directement l'action des récepteurs autophagiques. C'est le cas de CVB3 dont les protéases 2Apro et 3Cpro sont capables de cliver des récepteurs autophagiques. Plus précisément, p62/SQSTM1 est clivée au niveau de sa glycine 241 par la protéase 2Apro virale. Ce clivage fournit deux fragments de p62/SQSTM1 qui ne sont plus en mesure d'exercer une fonction dans l'autophagie sélective. Cette même protéase peut également cliver NBR1, un autre récepteur autophagique similaire à p62/SQSTM1. Ce dernier est également la cible de l'activité de la protéase 3Cpro virale. De façon intéressante, les auteurs montrent que les fragments C-terminaux résultant du clivage de ces deux récepteurs autophagiques ont un potentiel dominant négatif sur la fonction des récepteurs natifs, grâce à la conservation de leur capacité à interagir avec LC3 (Shi et al., 2014). Les auteurs ne mentionnent pas quelles pourraient être les cibles virales ou cellulaires dont la dégradation serait inhibée par ces clivages protéolytiques.

La protéine p62 est également prise pour cible au cours de l'infection par le virus de la dengue. En effet, dans le cas de cette infection, il semblerait que l'autophagie soit induite dans un premier temps puis inhibée. De plus, il apparaît que p62 est dégradée progressivement par le protéasome au cours de l'infection. p62 semble se comporter comme un facteur de restriction virale au cours de cette infection puisque les auteurs montrent que la restauration d'une expression stable de cette protéine conduit à l'inhibition de la réplication virale. Le virus de la dengue est donc en mesure d'inhiber l'autophagie sélective en dégradant le récepteur p62 (Metz et al., 2015).

**Tableau 4. Autophagie sélective et infections virales**

A) Protéines virales ciblées par autophagie sélective et récepteur impliqué

B) Récepteurs autophagiques ciblés par les virus.

### A. Virophagie

Virus	Cible	Récepteur
<b>SINV</b>	Capside	p62
<b>CHIKV</b>	Capside ubiquitinée	p62
<b>VIH-1</b>	Tat	p62
<b>VIH-1</b>	Capside	TRIM5
<b>HTLV-1</b>	Tax	?

### B. Récepteurs autophagiques ciblés par les virus

Virus	Mécanisme d'action	Récepteurs ciblés
<b>CVB3</b>	Protases virales 2Apro et 3Cpro	p62, NBR1
<b>DENV</b>	Dégradation par le protéasome	p62

## V. Rôle de l'autophagie au cours de l'infection par le VIH-1

---

De plus en plus de travaux montrent que l'autophagie et l'infection par le VIH sont étroitement liées. Ces liens sont complexes, car ils dépendent à la fois du type cellulaire étudié (CD4, DCs, macrophages) mais aussi du statut infectieux de la cellule (infectée productivement ou non). Comme beaucoup d'autres virus, le VIH est capable de contrôler et moduler l'autophagie, afin de l'utiliser à son avantage et favoriser sa réplication (Figure 21).

### 1. Dans les cellules T CD4

#### a) Infectées

Dans les lymphocytes T CD4 productivement infectés par le virus, l'autophagie induite par Env est bloquée et contrôlée par le virus (Espert and Biard-Piechaczyk, 2009; Espert et al., 2009; Zhou and Spector, 2008) (Figure 22). Ces observations suggèrent que l'autophagie est un processus anti-VIH et que ce virus a développé des stratégies afin de bloquer l'autophagie pour permettre une réplication efficace. Dans ce sens, nous avons montré que l'induction d'autophagie diminue la production virale dans des cellules T CD4 infectées par le VIH-1 (Sagnier et al., 2015). Très peu de travaux ont élucidé les mécanismes antiviraux de l'autophagie au cours de l'infection par le VIH-1 et cela fera l'objet de la première partie de ma thèse (voir Résultats I). En effet, nous avons récemment montré que le VIH bloque l'autophagie afin d'éviter la dégradation de son transactivateur Tat, cible spécifique de ce processus via son interaction avec p62 (Sagnier et al., 2015).

Ces résultats sont en accord avec des données très récentes de la littérature, qui suggèrent que l'autophagie pourrait aussi jouer un rôle important dans le contrôle de la charge virale chez les patients dits « Long Term Non Progressors » et « Elite Controllers » (Nardacci et al., 2014). Ces patients restent asymptomatiques pendant de très longues périodes, et certains d'entre eux (les « Elite controllers ») parviennent même à maintenir leur charge virale en dessous des seuils de détection sans traitement. L'autophagie est en effet plus élevée dans les cellules mononuclées du sang périphérique de ces patients, comparée aux patients dits « Normal Progressors » et semble donc anti-virale.

Expérimentalement, après coculture entre des cellules T CD4 et des cellules infectées par le VIH-1, on observe une population de cellules T CD4 infectées, où l'autophagie est bloquée et où les niveaux d'expression de LC3-II et de Beclin-1 sont diminués (Espert et al., 2009; Zhou and Spector, 2008).

Cela suggère qu'au moins une protéine virale synthétisée après intégration du virus est capable de bloquer l'autophagie : cela expliquerait aussi pourquoi les cellules qui ne sont pas productivement infectées ne parviennent pas à contrôler l'autophagie. Des travaux de mon équipe ont montré que la protéine Vif du virus, qui est exprimée dans les cellules infectées, est responsable de cela, en inhibant la formation des autophagosomes. A noter que Vif ne bloque pas totalement l'autophagie, suggérant que d'autres protéines agissent en synergie avec elle (Borel et al., 2015).

Enfin, il faut noter que la relation autophagie-VIH est complexe car il semblerait que la réplication du virus nécessite la présence de nombreux ATGs. L'équipe de Ben Berkhout a en effet utilisé des techniques d'interférence par l'ARN pour montrer que ATG5, GABARAPL2, ATG12, ATG16L ou encore ATG7 étaient essentielles au cycle viral (Brass et al., 2008; Eekels et al., 2012, 2011) Cela suggère que le VIH utilise au moins quelques-uns des composants de l'autophagie. En effet, les protéines ATG ont aussi des rôles indépendamment de la voie autophagique (Bestebroer et al., 2013) et c'est peut-être aussi à ce titre qu'elles sont impliquées dans la relation entre l'autophagie et l'infection par le VIH.

### b) Non infectées

Comme précisé précédemment dans l'introduction (Chapitre I.A.3.), l'infection par le VIH est caractérisée par le déclin progressif du nombre de lymphocytes T CD4 (LT CD4) chez les patients non traités, ce qui mène à l'apparition de la phase SIDA et des maladies opportunistes. De nombreuses données de la littérature ont montré que l'apoptose est très largement impliquée dans la destruction de ces cellules. Les causes sont multiples, incluant une toxicité directe du virus, une activation chronique du système immunitaire et une induction de l'apoptose par certaines protéines virales (Alimonti et al., 2003; Fauci, 1996; Gougeon, 2005; Varbanov et al., 2006). Plusieurs mécanismes de mort cellulaires ont été impliqués dans la mort des cellules T CD4 infectées, mais aussi et surtout dans les lymphocytes T CD4 quiescents bystanders, c'est-à-dire non infectés de façon productive (Finkel et al., 1995).



En effet, chez les patients, une large majorité (95%) des LT CD4 qui meurent ne sont pas infectés ou sont résistants à l'infection (Finkel et al., 1995).

Les résultats obtenus dans l'équipe montrent que Env (et plus particulièrement l'activité fusogénique de la gp41), exprimée à la surface des cellules infectées, est responsable après contact du déclenchement de l'autophagie dans les cellules T CD4 « bystanders » non infectées. Ce processus autophagique doit être complet et dégradatif pour entraîner l'apoptose de ces cellules T CD4 non infectées (Denizot et al., 2008; Espert et al., 2006) (Figure 22). En effet, quand on bloque l'autophagie à différentes étapes, que ce soit par l'utilisation de drogues (comme la 3-MA ou la BafA1) ou de siRNA (dirigés contre Beclin-1 ou ATG7), on observe une inhibition de l'apoptose induite par Env. Ceci indique qu'un facteur de survie, dont l'absence conduirait à l'apoptose, serait dégradé par autophagie. Actuellement, mon projet de recherche consiste à découvrir quelles sont les cibles de l'autophagie induite par Env, dont la dégradation conduit à la mort des cellules T CD4 non infectées. Cela fera l'objet de la seconde partie de ma thèse (cd partie Résultats II.).

L'induction d'autophagie est dépendante du processus de fusion de la gp41 avec la membrane plasmique, après la fixation par Env du récepteur CD4 et de son corécepteur (CXCR4 ou CCR5). Le mécanisme d'induction de l'autophagie par la gp41 reste inconnu, mais s'opère indépendamment des voies de signalisation de CD4 et de ses corécepteurs. La délétion de l'extrémité C-terminale de la gp41 permet d'ailleurs d'induire plus de fusion avec la cellule cible et donc plus d'autophagie et d'apoptose (Denizot et al., 2008).

De plus, une étude protéomique effectuée par notre équipe et des collaborateurs a permis de mettre en évidence l'induction de plusieurs protéines à fonction anti-oxydante dans ces cellules non infectées après leur contact avec Env. En parallèle, nous avons constaté la présence de forts taux de ROS dans ces cellules et donc l'induction d'un stress oxydatif (Molina et al., 2007).

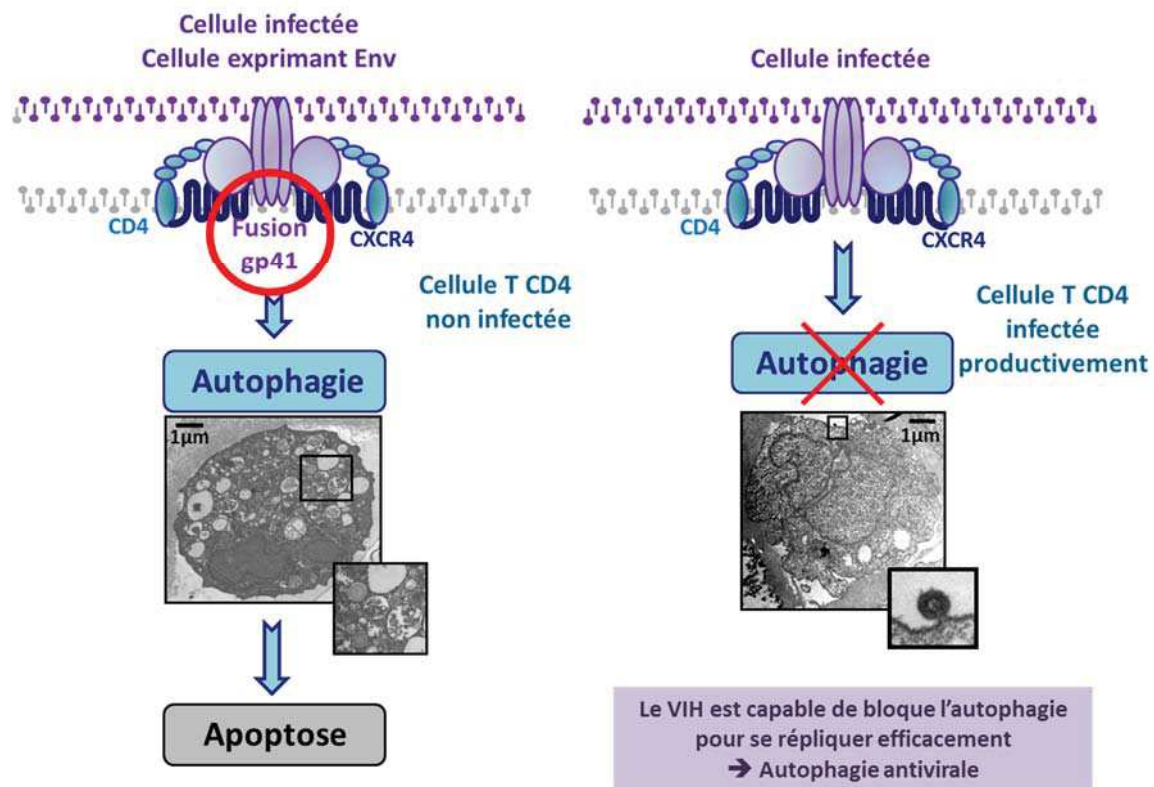


Figure 21. Rôle de l'autophagie dans les lymphocytes T CD4 durant l'infection par le VIH-1

Un autre type de mort cellulaire de ces cellules bystanders a très récemment été identifié : ces cellules peuvent aussi mourir par pyroptose, suite à une infection abortive (Doitsh et al., 2014). La pyroptose est une mort cellulaire programmée qui est caractérisée par l'activation de la caspase 1 et la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et IL-18).

## 2. Dans les autres types cellulaires

Les résultats obtenus dans les autres types cellulaires tendent à montrer que l'autophagie est également anti-virale dans ces cellules, puisqu'elle est systématiquement inhibée par le virus (Figure 22).

Comme les lymphocytes T CD4, les macrophages expriment les récepteurs et corécepteurs du VIH et peuvent donc être infectés par le virus. On peut cependant noter qu'ils sont plus souvent infectés par des virus à tropisme R5, qui ont besoin de moins de récepteurs disponibles à la surface de la cellule cible (Peters et al., 2006, 2004). Chez les monocytes/macrophages non infectés, au contraire des cellules T CD4 bystanders, on

n'observe pas d'induction de l'autophagie après contact avec Env (Espert et al., 2009). Cette inhibition est due à l'activation des voies Src-Akt et Stat3 par la protéine virale Tat et l'IL-10 (Van Grol et al., 2010) (Figure 22). Ces résultats sont en adéquation avec la physiopathologie de l'infection par le VIH : seuls les lymphocytes T CD4 sont déplétés ; la population des monocytes et des macrophages, quant à elle, reste intacte (Espert et al., 2009).

A l'inverse, dans les macrophages infectés, le VIH semble capable de manipuler l'autophagie pour favoriser sa réplication : celle-ci est en effet induite, puis contrôlée par le virus lui-même après une infection productive (Espert et al., 2009; Kyei et al., 2009). Notre équipe, qui s'est intéressée au sujet, a montré qu'on observait une augmentation du nombre de vacuoles autophagiques dans les macrophages infectés (au contraire des CD4 infectés où le nombre d'autophagosomes diminue) (Espert et al., 2009). Nef est en effet capable de se lier à Beclin-1 afin de bloquer les étapes dégradatives de l'autophagie (Espert et al., 2009; Kyei et al., 2009). On trouve aussi le précurseur Gag sur des structures membranaires enrichies en LC3-II : cela suggère que l'autophagie pourrait favoriser la maturation de Gag et la production de nouvelles particules virales (Kyei et al., 2009). L'induction de l'autophagie, grâce à la protéine Nef, semble également favoriser la synthèse de nouvelles particules virales : quand on inhibe ces étapes, on diminue en effet la production de nouveaux virions et la quantité de Gag-p24. En effet, Nef se lie entre autres à ATG5, ATG10 et IRGM et c'est cette dernière interaction qui permet l'accumulation des autophagosomes et augmente la réplication du VIH-1 (Grégoire et al., 2011). Par contre, le virus bloque les étapes de maturation et de fusion afin d'éviter sa dégradation. Pour se faire, la protéine virale Nef se lie à Beclin-1 et l'empêche de promouvoir la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Espert et al., 2009; Kyei et al., 2009) (Figure 22). La protéine Nef semble donc au cœur du contrôle de l'autophagie dans les macrophages infectés car elle permet au virus, d'une part d'induire les étapes d'initiation de l'autophagie pour favoriser sa réplication, et d'autre part d'inhiber les étapes de fusion afin d'empêcher sa dégradation. Ces résultats suggèrent que l'autophagie basale est nécessaire à la réplication virale dans les macrophages mais que le virus inhibe les étapes dégradatives du flux, qui sont anti-virales. Une autre voie permet néanmoins d'inhiber la multiplication du virus dans ces cellules : en effet, la vitamine D3 est capable d'induire l'autophagie et se faisant, d'inhiber de manière significative la réplication du VIH (Campbell and Spector, 2012, 2011).

Nous avons évoqué dans l'introduction l'existence d'un transcrit anti-sens chez le VIH qui code pour la protéine ASP. Cette protéine, a priori très instable dans les cellules de mammifères, semble colocaliser avec LC3, avec qui elle forme des puncta. Son expression induit l'autophagie dans les cellules monocytaires U937 (augmentation des niveaux d'expression de LC3-II et Beclin-1) et favorise la réplication virale (Clerc et al., 2011; Torresilla et al., 2013).

Les DCs jouent un rôle majeur dans la mise en place de la réponse immunitaire du fait de leurs fonctions essentielles à l'interface entre l'immunité innée (reconnaissance du pathogène) et l'immunité adaptative (apprêtement et présentation d'antigènes via les molécules du CMH). Les DCs sont les premières cellules du système immunitaire à entrer en contact avec le VIH au niveau des muqueuses. Elles sont principalement réfractaires à l'infection mais peuvent internaliser le virus grâce à différents récepteurs présents à leur surface, comme DC-SIGN. Dans ces cellules, l'autophagie est rapidement inhibée par le virus (et plus précisément par Env) qui active mTOR (Blanchet et al., 2010) (Figure 22). En bloquant l'autophagie, le virus échappe à la dégradation et limite les réponses immunitaires : l'équipe de Vincent Piguet a en effet observé une inhibition de la réponse TLR et une diminution de la présentation antigénique du VIH-1 par le CMH-II (Blanchet et al., 2010).

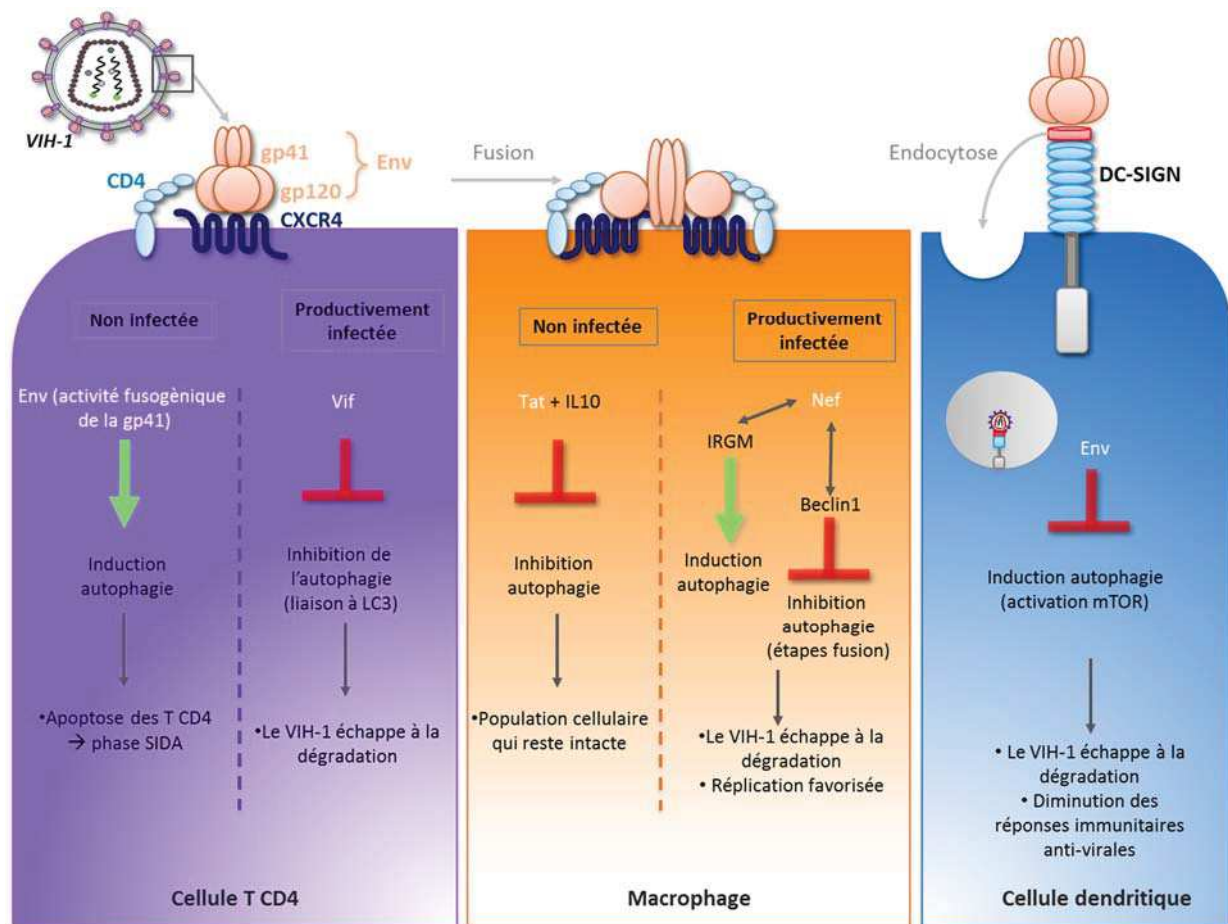


Figure 22. Relations entre autophagie et VIH dans ses cellules cibles

Le VIH peut également accéder au cerveau, où il va pouvoir infecter les macrophages, les cellules gliales, les astrocytes et les précurseurs neuronaux. Cela est à l'origine de désordres neurocognitifs associés au SIDA. Dans ce contexte, on observe une accumulation d'autophagosomes dans le cerveau des patients séropositifs post-mortem, mais le mécanisme par lequel l'autophagie est altérée n'a pas encore été totalement élucidé (Zhou et al., 2011). A ce propos, l'autophagie est un mécanisme particulièrement impliqué dans le vieillissement, et son altération semble cohérente avec les symptômes de ces patients : un vieillissement accéléré du cerveau et plus de risques de développer une maladie neurodégénérative (Fields et al., 2013).

J'ai également eu l'opportunité de participer à l'élaboration d'une revue et d'un chapitre de livre, qui seront présentés en annexe, concernant les relations entre autophagie et VIH dans les différents types cellulaires (cf. Annexes 1 et 2).



# Objectifs de la thèse



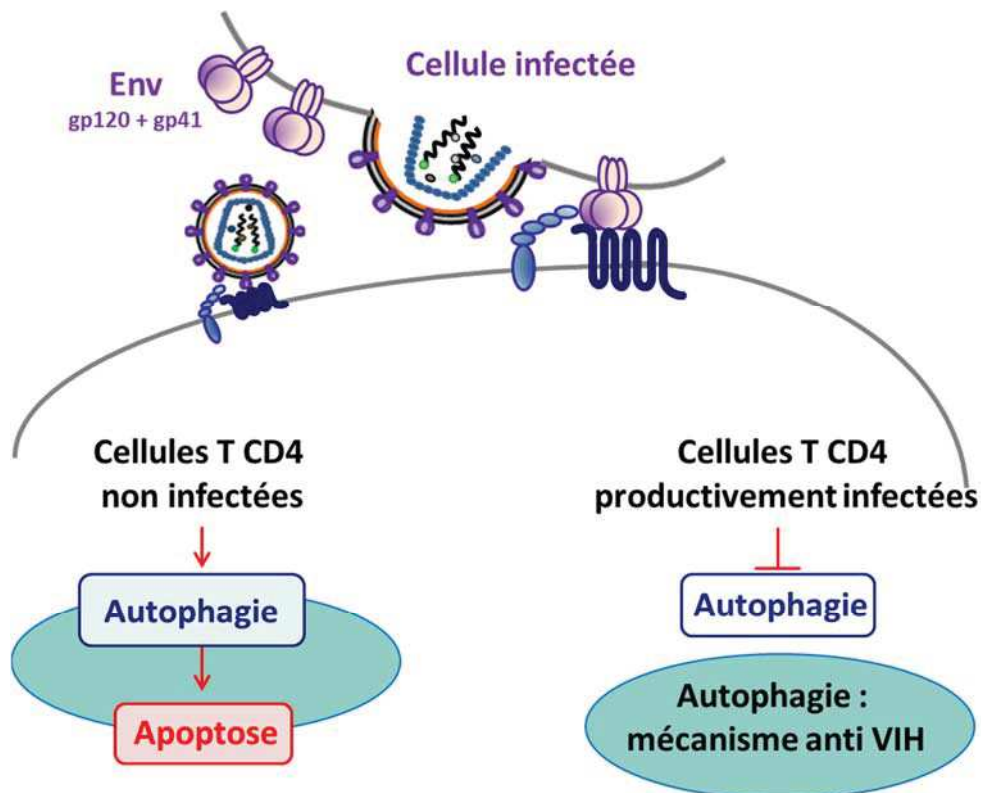


L'autophagie est sans doute l'un des plus anciens mécanismes cellulaires de défense contre les agents pathogènes. Les virus ont su s'adapter pour contrer l'autophagie et/ou l'utiliser à leur propre profit. C'est notamment le cas du VIH, pour lequel il existe des liens complexes avec l'autophagie, selon le type cellulaire, et le statut infectieux de la cellule impliquée.

Dans l'équipe, nous avons montré que Env, et plus particulièrement l'activité fusogénique de la gp41, exprimée à la surface de cellules infectées, est responsable du déclenchement de l'autophagie dans les cellules T CD4 non infectées. De plus, cette autophagie est responsable de la mort par apoptose de ces cellules, et donc, au moins en partie, de leur déplétion qui va conduire à la phase SIDA en l'absence de traitement. Les événements de fusion induits par la gp41 se produisent très rapidement après le contact entre Env et ses récepteurs (Denizot et al., 2008; Espert et al., 2006). De façon cohérente, nous avons observé que l'autophagie déclenchée par gp41 est également induite très rapidement dans les cellules T CD4 cibles. Ce premier contact entre le virus et la cellule cible peut donc conduire à deux situations (Figure 23) :

- soit les cellules cibles sont infectées de façon productive (le provirus est intégré à la cellule hôte et de nouvelles particules virales sont produites), et dans ce cas le processus autophagique est contrôlé et bloqué dans la cellule cible. Ces observations suggèrent que l'autophagie est un processus anti-VIH et que ce virus a développé des stratégies afin de bloquer l'autophagie pour permettre une réplication efficace.
- soit les cellules cibles ne sont pas productivement infectées car le cycle viral est interrompu après l'étape d'entrée, et dans ce cas l'autophagie n'est pas inhibée et conduit à la mort par apoptose des cellules cibles dites « non infectées ».

Ces observations soulèvent donc plusieurs grandes questions, parmi lesquelles : comment l'autophagie est-elle antivirale dans les cellules productivement infectées, et comment l'autophagie conduit-elle à l'apoptose dans les cellules T CD4 non infectées après contact avec Env. Au cours de ma thèse, je me suis attachée à répondre à ces deux questions en m'intéressant plus particulièrement au rôle de l'autophagie sélective dans ces deux contextes d'infection (Figure 23).



### Rôle de l'autophagie sélective

Figure 23. Liens entre l'autophagie et le VIH-1 dans les lymphocytes T CD4

*En bleu sur le schéma, les différents contextes où je vais m'intéresser au rôle de l'autophagie sélective.*

Dans la première partie de ma thèse, j'ai recherché les mécanismes par lesquels l'autophagie exerçait son effet antiviral lors de l'infection par le VIH-1 : en effet, notre équipe a montré que dans les cellules T CD4 productivement infectées, les protéines d'enveloppe du VIH étaient capables d'induire rapidement l'autophagie lors des premières étapes d'infection. Mais ce processus est rapidement bloqué par le virus, ce qui suggère bien que l'autophagie exerce une activité anti-VIH. Nous avons ainsi prouvé que l'autophagie est délétère pour le virus en dégradant sélectivement son transactivateur Tat, alors que c'est une protéine absolument nécessaire à la transcription des gènes viraux et donc à la synthèse de nouvelles particules virales.

Par la suite, je me suis intéressée aux cellules T CD4 qui ne sont pas productivement infectées. Notre équipe a montré que, dans ce cas, l'autophagie est nécessaire au déclenchement de l'apoptose induite par Env dans les lymphocytes T CD4 non infectés, suggérant que la

dégradation de composés cellulaires par ce processus pourrait être responsable de l'apoptose. L'induction de la production de ROS en réponse à Env nous permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'autophagie, induite par Env, conduirait à la dégradation sélective d'un facteur antioxydant, entraînant l'accumulation d'espèces oxydées dans les cellules cibles et ainsi, leur mort par apoptose.



# Résultats

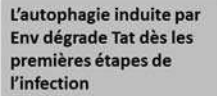


## I. Dégradation sélective de Tat par autophagie

---

### A. Introduction et contexte

Les mécanismes antiviraux de l'autophagie au cours de l'infection par le VIH-1 ont été très peu étudiés et l'objectif de ce projet a donc été de les rechercher. Nous avons ainsi pu montrer que le VIH-1 bloque l'autophagie dans les cellules T CD4 productivement infectées afin d'éviter la dégradation de son transactivateur viral Tat, via son interaction avec p62 (Sagnier et al., 2015). Tat est, en effet, une protéine du VIH qui est absolument nécessaire pour la transcription des gènes viraux et donc pour la synthèse de nouvelles particules virales. Cette dégradation de Tat est spécifique grâce à l'intervention du récepteur autophagique p62, qui est une protéine connue pour adresser spécifiquement les protéines et les organelles ubiquitinées à la dégradation par autophagie, via son interaction avec les protéines de la famille ATG8. Dans le cas du transactivateur Tat, cette interaction ne dépend pas de son ubiquitination ; elle est donc médiée par un mécanisme non conventionnel. En plus de son rôle de transactivateur viral, la protéine Tat a aussi la capacité d'être sécrétée par les cellules infectées et capturée par les cellules voisines non infectées, où elle peut alors induire la transcription de différents facteurs cellulaires ou leur mort par apoptose de ces cellules. Nous avons montré que cette Tat sécrétée peut aussi être dégradée par autophagie, élargissant le rôle de sa dégradation par autophagie à d'autres mécanismes potentiels. Pour résumer, nous savons que l'autophagie est induite par Env durant les toutes premières étapes de l'infection mais que cette autophagie est rapidement bloquée afin d'éviter la dégradation de Tat et favoriser la transcription des gènes viraux et donc la réplication virale (Figure 24).



L'autophagie induite par Env est inhibée aux étapes tardives de l'infection afin d'éviter la dégradation de Tat et donc permettre au virus de se répliquer efficacement.



B. Article

Article dans Journal of Virology :

**Autophagy Restricts HIV-1 Infection by Selectively Degrading  
Tat in CD4 T Lymphocytes**

Sophie Sagnier\*, Coralie F. Daussy\* (co-premier auteur),  
Sophie Borel, Véronique Robert-Hebmann, Mathias Faure,  
Fabien P. Blanchet, Bruno Beaumelle, Martine Biard-  
Piechaczyk, Lucile Espert

*Reprinted by permission from American Society for Microbiology:*

*Journal of Virology, © 2015*



# Autophagy Restricts HIV-1 Infection by Selectively Degrading Tat in CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes

Sophie Sagnier,<sup>a</sup> Coralie F. Daussey,<sup>a</sup> Sophie Borel,<sup>a</sup> Véronique Robert-Hebmann,<sup>a</sup> Mathias Faure,<sup>b,c,d,e,f</sup> Fabien P. Blanchet,<sup>a</sup> Bruno Beaumelle,<sup>a</sup> Martine Biard-Piechaczyk,<sup>a</sup> Lucile Espert<sup>a</sup>

CPBS, Université de Montpellier, UMR 5236 CNRS, Montpellier, France<sup>a</sup>; CIRI, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, Lyon, France<sup>b</sup>; INSERM U1111, Lyon, France<sup>c</sup>; Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France<sup>d</sup>; Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France<sup>e</sup>; CNRS, UMR 5308, Lyon, France<sup>f</sup>

## ABSTRACT

Autophagy is a ubiquitous mechanism involved in the lysosomal-mediated degradation of cellular components when they are engulfed in vacuoles called autophagosomes. Autophagy is also recognized as an important regulator of the innate and adaptive immune responses against numerous pathogens, which have, therefore, developed strategies to block or use the autophagy machinery to their own benefit. Upon human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection, viral envelope (Env) glycoproteins induce autophagy-dependent apoptosis of uninfected bystander CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, a mechanism likely contributing to the loss of CD4<sup>+</sup> T cells. In contrast, in productively infected CD4<sup>+</sup> T cells, HIV-1 is able to block Env-induced autophagy in order to avoid its antiviral effect. To date, nothing is known about how autophagy restricts HIV-1 infection in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. Here, we report that autophagy selectively degrades the HIV-1 transactivator Tat, a protein essential for viral transcription and virion production. We demonstrated that this selective autophagy-mediated degradation of Tat relies on its ubiquitin-independent interaction with the p62/SQSTM1 adaptor. Taken together, our results provide evidence that the anti-HIV effect of autophagy is specifically due to the degradation of the viral transactivator Tat but that this process is rapidly counteracted by the virus to favor its replication and spread.

## IMPORTANCE

Autophagy is recognized as one of the most ancient and conserved mechanisms of cellular defense against invading pathogens. Cross talk between HIV-1 and autophagy has been demonstrated depending on the virally challenged cell type, and HIV-1 has evolved strategies to block this process to replicate efficiently. However, the mechanisms by which autophagy restricts HIV-1 infection remain to be elucidated. Here, we report that the HIV-1 transactivator Tat, a protein essential for viral replication, is specifically degraded by autophagy in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. Both Tat present in infected cells and incoming Tat secreted from infected cells are targeted for autophagy degradation through a ubiquitin-independent interaction with the autophagy receptor p62/SQSTM1. This study is the first to demonstrate that selective autophagy can be an antiviral process by degrading a viral transactivator. In addition, the results could help in the design of new therapies against HIV-1 by specifically targeting this mechanism.

Macroautophagy, herein referred to as autophagy, is a major cellular catabolic pathway highly regulated in eukaryotes. It is involved in the degradation of cytoplasmic material after its sequestration in vacuoles called autophagosomes. The autophagosomes fuse with lysosomes to form autolysosomes in which the sequestered material is degraded and then recycled (1). Since the discovery of the Atg genes that regulate this process, autophagy has been found to be involved in a number of important cellular functions, including cellular homeostasis, development, aging, or innate and adaptive immune responses (2, 3). Autophagy is believed to be one of the most ancient defense processes against invading pathogens. Its antiviral effect has been described in many studies through different mechanisms, including a direct degradation of cytoplasmic viral components, as shown, for example for the Sindbis virus (SIN) capsids that are specifically targeted to autophagy upon interaction with p62 (4, 5). Importantly, pathogens have evolved different means to inhibit or use autophagy to their own profit (6).

At the molecular level, two signaling complexes are involved in the induction, the elongation, and the closure steps of autophagy, leading to the formation of autophagosomes. Briefly, the class III

phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), associated with p150 and beclin 1, is responsible for the formation of the phagophore. Two ubiquitination-related conjugation systems, leading to the formation of the Atg12-Atg5-Atg16L complex and the Atg8-phosphatidylethanolamine (PE) complex, are required for the elongation and closure of the autophagosome. These two conjugates are formed upon the action of a unique E1-activating enzyme called Atg7. ATG8-PE is inserted in the autophagic vacuole membranes

Received 24 July 2014 Accepted 17 October 2014

Accepted manuscript posted online 22 October 2014

Citation Sagnier S, Daussey CF, Borel S, Robert-Hebmann V, Faure M, Blanchet FP, Beaumelle B, Biard-Piechaczyk M, Espert L. 2015. Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Virol* 89:615–625. doi:10.1128/JVI.02174-14.

Editor: R. W. Doms

Address correspondence to Lucile Espert, lucile.espert@cpbs.cnrs.fr. S.S. and C.F.D. contributed equally to this article.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. doi:10.1128/JVI.02174-14

and is present all along the pathway, a characteristic that makes it an autophagosomal marker. As autophagy proceeds, ATG8-PE is finally degraded in autolysosomes. Six orthologs of ATG8 exist in mammals, three microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) proteins (LC3A, -B, and -C), one gamma-aminobutyrate receptor-associated protein (GABARAP), and two GABARAP-like proteins (GABARAPL1 and GATE16/GABARAPL2). All of these proteins are synthesized as precursors that are rapidly processed at their C termini, leading to the exposure of a glycine residue that can be conjugated to PE (7–9). LC3B is still the most extensively studied ATG8 protein and will be referred to hereafter as LC3.

Autophagy can be a very selective process by the action of adaptor proteins behaving as autophagy cargo receptors, themselves degraded by autophagy due to their interaction with LC3 (10). Autophagy cargo receptors share at least one domain, the LIR domain (LC3-interacting region), allowing interaction with ATG8 family members and thus targeting the cargos to autophagosomes (11). p62/SQSTM1 (sequestosome 1, hereafter called p62) is a typical autophagy receptor that interacts with ubiquitinated substrates via its UBA domain (*ubiquitin-associated domain*) and that is able to multimerize via its PB1 domain (NH<sub>2</sub>-terminal Phox and Bem1p domain). These two motifs are important for selective autophagic degradation of ubiquitinated substrates (10, 12–14). Of note, p62 has been involved in the lysosomal-mediated degradation of incoming pathogens, a process termed “xenophagy” (15, 16).

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infects immune cells, mainly CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and macrophages. In most instances, viral entry is mediated by the interaction of the viral envelope (Env) glycoproteins (gp120 and gp41) with CD4 and a coreceptor, mainly CCR5 or CXCR4, expressed at the surface of the target cells, to initiate a membrane fusion event. The gp120 protein interacts first with CD4, triggering conformational changes leading to increased exposure of gp120 regions able to bind to the coreceptor. This interaction induces a structural rearrangement in gp41 and the insertion of its N terminus fusion peptide into the target cell membrane, leading to the fusion between viral and cell membranes and thus to viral entry (17). The RNA viral genome is then retro-transcribed in DNA by the viral reverse transcriptase and is transported to the nucleus, where it integrates the genome of the host cell by the action of the viral integrase. After the integration step, the viral transactivator Tat enables the transcription of the viral DNA, leading to the production of the viral components necessary to synthesize new infectious particles that are released from the infected cells. The HIV-1 replication cycle can thus be divided in two phases: the early phase, from viral entry to provirus integration, and the late phase, from transcription of viral genes to the release of new viral particles (18, 19).

Tat is a small HIV-1 protein of 80 to 103 amino acids, depending on the viral strain, necessary for the transcription of all the viral genes after its binding to the TAR RNA loop present in the HIV-1 long terminal repeat (LTR) promoter (20). In addition to its role in infected cells, Tat can be secreted and captured by bystander cells, where it can induce apoptosis or modulate the expression of cellular proteins, in particular, proinflammatory cytokines (21–24).

Complex links exist between HIV-1 and autophagy, depending on the cell types and on the infectious status of the target cell type, i.e., if the target cell is productively infected or not (25–27). In

dendritic cells, HIV-1 is able to block autophagy, impeding viral antigen presentation (28, 29). In CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, we previously demonstrated that autophagy is induced by the gp41 fusogenic function and that this process leads to apoptosis of uninfected bystander CD4<sup>+</sup> T cells, i.e., cells that have been in contact with infected cells without being productively infected (30, 31). In contrast, autophagy is blocked in productively infected CD4<sup>+</sup> T cells (32).

In macrophages that have been challenged by the virus but not productively infected, autophagy is inhibited via the activation of Stat3 and Src-Akt by Tat and interleukin-10 (IL-10) (33). HIV-1 Tat also suppresses STAT1 activation triggered by gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) in monocytes and IFN- $\gamma$ -induced autophagy in primary macrophages, suggesting that inhibition of autophagy could impair the immune defenses by blocking the antigen processing required for the recognition and killing of intracellular pathogens (34). These results are consistent with the fact that macrophages do not undergo Env-mediated apoptosis and are not subjected to depletion during HIV-1 infection.

The mechanism by which autophagy exerts its restriction activity against HIV-1 infection in CD4<sup>+</sup> T cells remains to be fully characterized. We demonstrate here that p62 interacts with Tat and targets it to lysosomal-mediated degradation via selective autophagy. This interaction is not mediated by a conventional domain of p62 since the UBA or the PB1 domain of this protein is not involved. Interestingly, both neo-synthesized Tat in infected cells and exogenous Tat internalized by uninfected cells are sensitive to autophagic degradation, indicating that all the functions of Tat could be counteracted by autophagy. In conclusion, we propose that degradation of the viral transactivator Tat by selective autophagy is a potent though unrecognized antiviral cellular mechanism against HIV-1 infection of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes.

## MATERIALS AND METHODS

**Ethics statement.** Primary CD4<sup>+</sup> T cells were purified from blood obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS). Procedures using human cells were approved by the Human Experimentation and Ethics Committee of the CNRS Institute. The HIV-1 infection experiments were performed in a biological safety level 3 laboratory. Cell culture was performed in a biological safety level 2 laboratory.

**Cell culture.** The original HEK.293T cell line, HEK cells expressing wild-type (WT) CD4 and wild-type CXCR4 (HEK/CD4/CXCR4), and HEK cells stably expressing Env at their surface were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with antibiotics and 10% fetal calf serum (FCS). MAGIC5B cells (cell line expressing CXCR4 and CCR5 and  $\beta$ -galactosidase under the control of the HIV long-terminal repeat [LTR]) were obtained from T. Masashi (Tokyo, Japan) and cultured in DMEM supplemented with antibiotics and 10% FCS. MOLT cells are nonadherent human acute lymphoblastic leukemia cells. The chronically HIV-1-infected MOLT cells (MOLT-X4) and the uninfected parental cell line (MOLT) were provided by J. Blanco (Barcelona, Spain). The 8.E5 cell line is a CEM-derived T cell line containing a single integrated copy of HIV-1 and unable to produce infectious virions. T cell lines were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with antibiotics and 10% FCS. Primary CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells and purified by negative selection using the CD4<sup>+</sup> Rosette separation technique (Stem Cell Technologies). Cells were phenotypically analyzed, stimulated with 2  $\mu$ g of phytohemagglutinin (PHA) for 24 h, and maintained in culture by the addition of 100 U/ml of interleukin 2 (IL-2) (Boehringer Mannheim) every 2 to 3 days.

**Reagents and Abs.** Torin 1 (To) was purchased from Tocris, and 3-methyladenine (3-MA), PHA, E64d, and pepstatin A (anti-protease

[AP]) were purchased from Sigma-Aldrich. T20 was obtained from the NIH AIDS Reagent Program. Anti-LC3 (catalog no. L7543), anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; catalog no. G9545), anti-ATG7 (catalog no. A2856), and anti-FLAG-horseradish peroxidase (HRP) (catalog no. A8592) were obtained from Sigma-Aldrich; anti-Tat (catalog no. sc65912) and anti-beclin 1 (catalog no. sc11427) were purchased from Santa-Cruz Biotechnologies. The monoclonal anti-p24 antibody (Ab) was from the NIH AIDS Reagent program.

**Plasmids.** The pNL4-3 molecular clone was obtained from the NIH AIDS Reagent Program. The different p62 constructs, cloned in a pENTR plasmid, were a kind gift from Terje Johansen (University of Tromsø, Tromsø, Norway). After an LR Clonase reaction, we cloned the different p62 cDNAs in pDEST vectors in order to obtain glutathione S-transferase (GST)-fused proteins, using Gateway cloning technology (Life Technologies). The LC3B cDNA was first cloned in a pENTR vector and then cloned in a pDEST vector using Gateway cloning technology (Life Technologies). The GST-LC3 F52A mutant was obtained by mutagenesis using a QuickChange kit from Stratagene. The FLAG-tagged Tat (86 residues; BH10 isolate) was cloned in the pBi-GL expression vector under the control of a tetracycline response element (TRE) (the FLAG tag is placed at the C-terminal part of Tat). To express the gene of interest, the plasmid needs to be cotransfected with a pUHD-neo vector responsible for the expression of the tTA regulatory proteins needed to transactivate the TRE. A pBi-Tat K50/51A mutant expressing the FLAG-Tat K50/51A mutant was generated from pBi-Tat using a QuickChange kit from Stratagene (35). The FLAG-Tat K71R expression vector was a kind gift from Monsef Benkirane (as with pBi-GL-Tat, the FLAG tag is located at the C terminus of Tat) (36).

The different constructs expressing Vif, Nef, and Vpr were cloned in a pENTR plasmid and transferred in a pCI-neo3×FLAG expression vector after an LR Clonase reaction using Gateway cloning technology (Life Technologies). The expression vector coding for GFP-LC3 (where GFP is green fluorescent protein) was kindly provided by T. Yoshimori (Osaka University, Japan) and R. Willey (NIAID, NIH). The expression vector coding for Gag was kindly provided by Nathalie Chazal (Centre d'Études d'Agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé [CPBS], Montpellier, France) (37).

**TEM analysis.** Cells were fixed *in situ* with 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer (pH 7.4) for 60 min at 4°C, postfixed with 2% osmium tetroxide, and then washed in cacodylate buffer containing 0.5% tannic acid. After extensive washes in 0.1 M Sorensen phosphate buffer (pH 7.2), cells were included in a fibrin clot as described by Charret and Fauré-Fremiet (38). Cells were then postfixed with 2% osmium tetroxide and 0.5% tannic acid, dehydrated, and embedded in Epon (Embed-812; Electron Microscopy Sciences, Inc.). Sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a Hitachi H7100 transmission electron microscope (TEM).

**HIV-1 infection and production.** To produce HIV virions, HEK cells were transfected with pNL4-3, and supernatants were collected at 2 days posttransfection. Viral particles were concentrated by ultracentrifugation. Jurkat cells were then challenged for 24 h with dilutions of the concentrated viruses. Flow cytometry analysis of Gag<sup>+</sup> cells was performed in order to quantify the multiplicity of infection (MOI). Quantification of viral particle production was performed with a p24 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) from Innogenetics (Innotest HIV antigen monoclonal Ab [MAb]) according to the manufacturer's instructions. CD4<sup>+</sup> T cells were infected with concentrated viruses at an MOI between 0.1 and 1. Coculture experiments were done with chronically HIV-infected (MOLT-X4) or uninfected (MOLT) T cells cocultured for indicated times (see the figure legends) with HEK/CD4/CXCR4 or MAGIC5B cells. Quantification of HIV infection of target cells was measured by flow cytometry (for HEK cells) or β-galactosidase activity assay (for MAGIC5B cells).

**GST pulldown experiments.** Constructs expressing GST proteins fused to wild-type LC3 (GST-LC3), mutated LC3 (GST-LC3 F52A), wild-

type p62 (GST-p62), or mutated p62 (GST-p62ΔLIR, GST-p62ΔUBA, and GST-p62ΔPB1, with deletions of the LIR, UBA, and PB1 domains, respectively) were cotransfected in HEK cells with the pBi-FLAG-Tat and pUHD vectors. Corresponding empty vectors were used as controls. Anti-proteases (E64d plus pepstatin A) were added to the transfected cells in order to optimize the expression of Tat. Cell lysis was performed at 24 h posttransfection in 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7, and 0.5% NP-40 at 4°C. After centrifugation for 20 min at 4°C, the lysates were incubated with glutathione-conjugated Sepharose beads for 2 h at 4°C. Unbound proteins were removed by four washes with cold lysis buffer. Bound proteins were then eluted by boiling for 10 min in Laemmli buffer and separated by gel electrophoresis, followed by immunoblotting with specific antibodies.

**Flow cytometry.** The percentage of HIV-1-infected cells was determined by quantifying the cellular levels of p24<sup>Gag</sup> by flow cytometry using an HIV KC57 fluorescein isothiocyanate (FITC) kit according to the manufacturer's instructions (Beckman Coulter). Briefly, cells were fixed and permeabilized, and the anti-p24 antibody was added to the cells. After staining for 30 min, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), and fluorescence intensity was measured on a Coulter Epics XL Flow Cytometer (Beckman Coulter).

**β-Galactosidase assay.** A chemiluminescent reporter assay system, Galacto-Star β-Galactosidase Reporter Gene Assay System for Mammalian Cells, from Life Technologies, was used to quantitate β-galactosidase activity according to the manufacturer's instructions. Briefly, 0.5 × 10<sup>6</sup> MAGIC5B cells were lysed in 200 μl of lysis buffer provided by the manufacturer. Fifty microliters of cell lysate was used in each assay, in duplicates. The results were normalized by quantifying the total protein concentrations using a Bradford assay from Sigma-Aldrich.

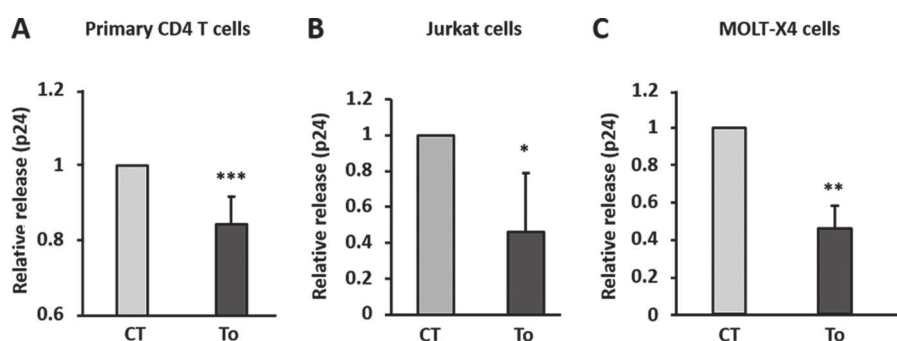
**Transfections.** A total of 0.5 × 10<sup>6</sup> HEK or HEK/CD4/CXCR4 cells were cultured in six-well plates 24 h prior to transfection. Plasmids were then transfected using TurboFect reagent (Fermentas) according to the manufacturer's instructions. Smartpool p62 small interfering RNA (siRNA) and control siRNA (siCT) were from ABgene. Beclin 1 siRNA and Atg7 siRNA were synthesized and annealed by Eurogentec. The mRNA sequences to be targeted for beclin 1 and Atg7 siRNAs were 5'-CAGUUUGGCACAAUCAUA-3' and 5'-GCAUCAUCUUCGAAGUGA A-3', respectively. Transfection of siRNA into HEK/CD4/CXCR4 or MAGIC5B cells (0.5 × 10<sup>6</sup> cells maintained in six-well plates) was performed with LipoRNAiMax reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. In the case of siRNA and plasmid cotransfections, 0.25 × 10<sup>6</sup> HEK cells were first transfected with siRNA using LipoRNAiMax reagent, and 24 h later, siRNA-transfected cells were transfected with the plasmid using TurboFect reagent.

**Western blotting.** Cell lysates were loaded in 12% ProSieve 50 gels (Lonza) and transferred to polyvinylidene (PVDF) membranes. After a blocking step for 1 h at room temperature in PBS containing 0.5% casein, membranes were incubated overnight at 4°C with the primary antibody (Ab) in the blocking buffer. After three washes with PBS supplemented with 0.05% Tween, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with peroxidase-coupled secondary Ab. Upon extensive washes, membranes were incubated with Luminata Western HRP Substrate (Millipore). Proteins were detected by chemiluminescence and imaged with a G-box camera (Syngene imaging system). The expression level of GAPDH was used as a loading control in all of the Western blotting experiments and for quantification. Quantification of protein expression was done with Genesys software (Syngene).

The form of LC3 conjugated to PE, named LC3-II, presents a higher electrophoretic mobility in gels and was, therefore, used to quantify autophagy.

**Fluorescence analysis of autophagy.** HEK/CD4/CXCR4 cells were cultured in six-well plates and transfected with pEGFP-LC3 using TurboFect reagent (Fermentas) according to the manufacturer's instructions. Transfected cells were then left to adhere on coverslips before coculture with MOLT cells (negative control) or chronically infected cells (MOLT-





**FIG 1** Autophagy has an anti-HIV-1 effect in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. Primary CD4<sup>+</sup> T cells (A) or Jurkat cells (B) were infected with HIV-1 at an MOI of 1 for 3 days. Cells were then extensively washed to eliminate excess free viruses and cultured for 24 h in the presence of 2  $\mu$ M torin 1 to induce autophagy. HIV Gag-p24 levels were quantified by ELISA in the culture supernatants. (C) Chronically infected MOLT-X4 cells were treated for 24 h with 2  $\mu$ M torin 1, and the HIV Gag-p24 concentration was quantified in the culture supernatants by ELISA. Data are representative of triplicates from at least three independent experiments. CT, control. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

X4) for the indicated times (from 2 h to 48 h) (see Fig. 4A). Human primary CD4<sup>+</sup> T cells were transfected with pEGFP-LC3 using a Nucleofector apparatus (Amaxa Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Transfected primary T cells were then cocultured on coverslips for 4 h with effector cells either expressing or not expressing the viral envelope at their surface (HEK.Env or HEK cells, respectively). Coverslips were washed with PBS, and cells were fixed in a 3.7% paraformaldehyde-PBS solution for 10 min at room temperature and analyzed by epifluorescence using a Leica microscope. Autophagic cells were defined as cells containing at least five GFP-LC3 puncta. More than 100 transfected cells were analyzed by two different investigators. Results are from at least three independent experiments.

**Statistics.** Analysis of the variance of the results was performed after arc sine transformation of the data when percentages were compared (39).

## RESULTS

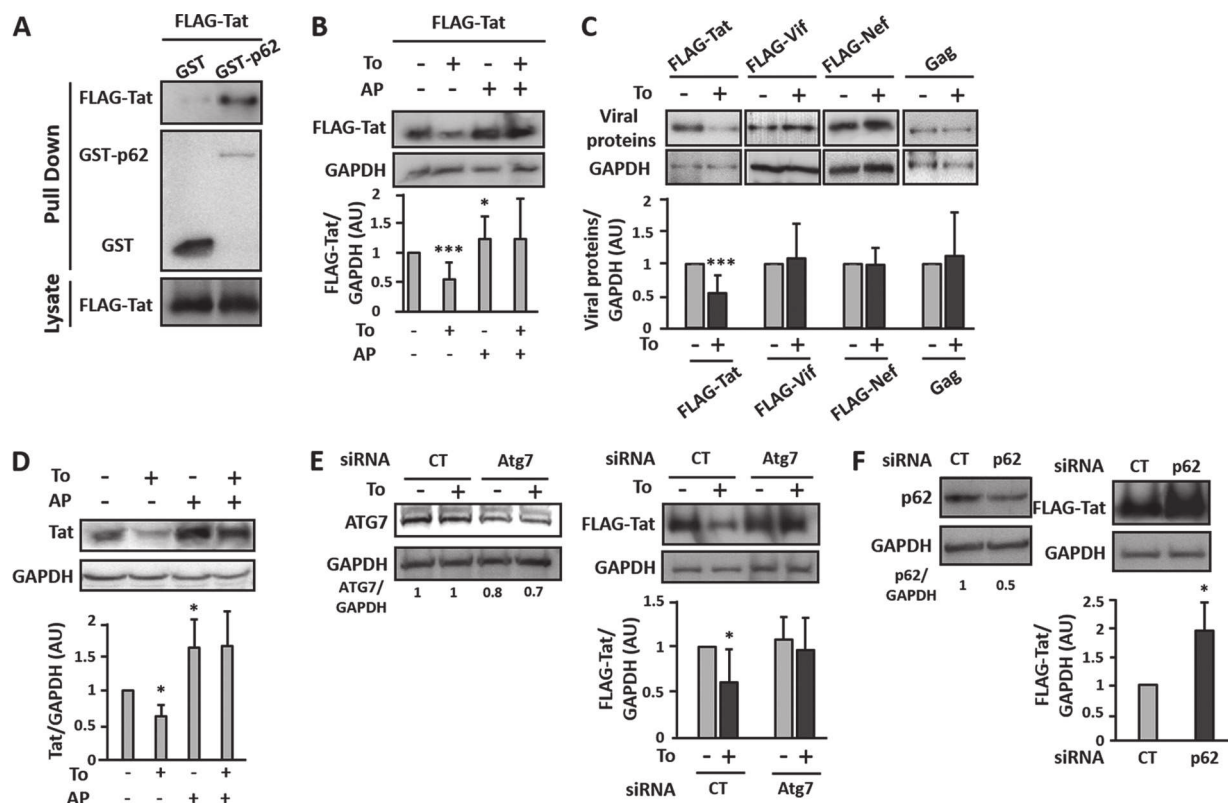
**Induction of autophagy decreases viral production in HIV-1-infected CD4<sup>+</sup> T lymphocytes.** We, along with others, have previously shown that autophagy is blocked in productively HIV-1-infected CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, suggesting that autophagy is an anti-HIV process counteracted by this virus (32, 40). To examine this hypothesis, activated primary CD4<sup>+</sup> T cells were infected by HIV-1 for 3 days (~20% infection). Then, autophagy was induced by adding torin 1, an inhibitor of the mTOR kinase, for 24 h. The level of viral particle production was measured by quantifying the viral capsid protein p24 by ELISA. As expected, we detected a significant decrease of HIV-1 p24 levels in the supernatants of cells treated with torin 1 (Fig. 1A). The same results were obtained when torin 1 was added to infected Jurkat cells (Fig. 1B) or chronically infected CD4<sup>+</sup> T cells (MOLT-X4) (Fig. 1C). Thus, addition of torin 1 decreases viral production, supporting the anti-HIV role of autophagy.

**Tat interacts with p62 and is specifically degraded by torin 1-induced autophagy.** We performed a two-hybrid screen to analyze the interactions between several HIV-1 proteins (Tat, Vif, Vpr, and Nef) and a bank of ATG proteins. Among the viral proteins tested, the transactivator Tat was the only viral protein able to bind p62 (data not shown), which is highly suggestive of a role for selective autophagy. This interaction was further confirmed *in vitro* using a GST pulldown assay in which Tat was found to interact with GST-p62 but not GST alone (Fig. 2A). As p62 is an autophagy receptor involved in the specific degradation of proteins or organelles by autophagy, we then analyzed whether induction

of autophagy could affect the expression level of Tat. To this end, we transfected human embryonic kidney (HEK) cells with a plasmid expressing a FLAG-Tat construct, and autophagy was induced upon addition of torin 1 for 3 h. We observed a significant decrease in Tat levels upon torin 1 treatment (Fig. 2B). Importantly, this effect was reversed in cells pretreated with a cocktail of anti-proteases ([APs] E64d plus pepstatin A) previously described to block lysosomal-mediated degradation (Fig. 2B). Furthermore, inhibition of lysosomal proteases, in the absence of autophagy induction, led to increased levels of Tat expression in cells, suggesting that the viral transactivator can be degraded by lysosomes (Fig. 2B and D). The levels of the ectopically expressed viral proteins Gag, Vif, and Nef were not affected by the addition of torin 1 (Fig. 2C). These data strongly suggest that the torin 1-induced decrease in Tat level is selective and relies on an autophagy-dependent lysosomal-mediated degradation. The results were confirmed in a context of viral infection using HIV-1 chronically infected T cells (MOLT-X4 cells) which constitutively produce the viral Tat protein. As shown in Fig. 2D, Tat levels were also decreased in MOLT-X4 cells upon torin 1 treatment for 3 h, and the autophagy-inducing drug effect could be reversed by AP treatment. Since Tat is essential for the HIV-1 replication cycle, these results extend further those presented in Fig. 1, in which drug-mediated induction of autophagy strongly decreased viral release.

To confirm that the autophagic process is responsible for the lysosomal-mediated degradation of Tat, we downregulated the expression of the essential autophagy-related protein ATG7 using siRNA. As shown in Fig. 2E, while the control siRNA did not prevent torin-1-induced Tat degradation, the viral transactivator expression levels were significantly increased in cells for which ATG7 expression was reduced. Notably, even if siRNA-mediated ATG7 decreased expression was only 30%, Tat levels became totally insensitive to torin 1 treatment, confirming the contribution of the autophagy pathway in Tat degradation. This result also indicates that this process is finely tuned and relies on a fully functional autophagy process.

Since we observed that Tat was interacting with p62 (Fig. 2A), we aimed at analyzing Tat levels when p62 expression was decreased. Remarkably, we noted that the siRNA-mediated decrease of p62 expression correlated with a significant increase in Tat protein signal compared to levels obtained in lysates from siCT-



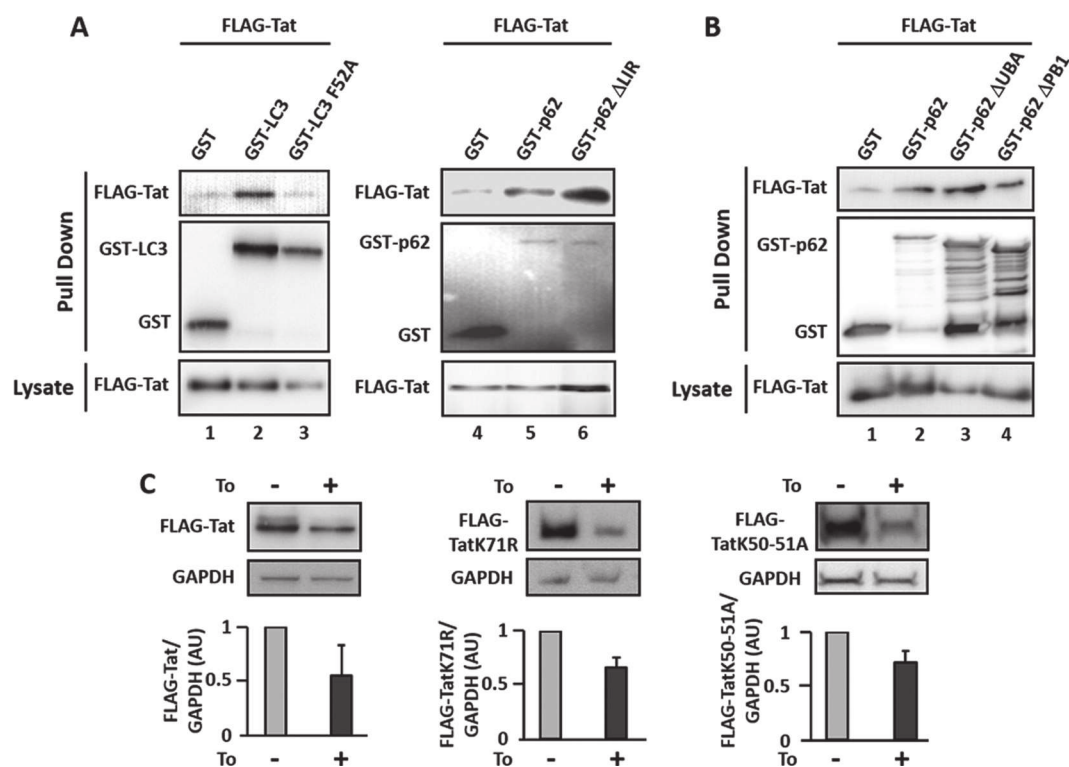
**FIG 2** Tat interaction with p62 leads to its selective degradation by autophagy. (A) HEK cells were cotransfected with the FLAG-Tat vector and the GST or GST-p62 plasmid. At 24 h posttransfection, cells were lysed, and lysates were subjected to GST pull-down before immunoblotting with anti-FLAG or anti-GST Ab. A fraction of lysates was preserved and used as an input control and immunoblotted with the anti-FLAG Ab. The result is representative of at least five different experiments. (B) HEK cells were transfected with plasmids expressing FLAG-Tat. After 24 h, the transfected cells were either left untreated or treated with 2  $\mu$ M torin 1 in the presence or absence of anti-proteases (APs; E64d plus pepstatin A; 10  $\mu$ g/ml each) for 3 h. The expression level of FLAG-Tat was revealed by Western blotting using anti-FLAG Ab. Levels of expression were quantified by densitometry and normalized to GAPDH expression levels. Data are representative of at least eight independent experiments for FLAG-Tat. (C) HEK cells were transfected with plasmids expressing Flag-Tat, FLAG-Nef, FLAG-Vif, or Gag. After 24 h, the transfected cells were either left untreated or treated with 2  $\mu$ M torin 1 for 3 h. The expression level of the FLAG-tagged proteins or Gag was revealed by Western blotting using anti-FLAG or anti-p24<sup>Gag</sup> Ab, respectively. Levels of expression were quantified by densitometry and normalized to GAPDH expression levels. Data are representative of at least three independent experiments. (D) Chronically infected MOLT-X4 cells were either left untreated or treated for 3 h with 2  $\mu$ M torin 1 in the presence or absence of AP. Cell lysates were then subjected to immunoblotting with anti-Tat Ab and anti-GAPDH Ab as a loading control. Tat expression levels were quantified by densitometry and normalized to GAPDH protein levels. Data are representative of at least three independent experiments. (E) HEK cells, previously transfected with unspecific (siCT) or ATG7-specific (siAtg7) siRNA, were transfected with the FLAG-Tat vector for 24 h. Cells were then either left untreated or treated with 2  $\mu$ M torin 1 for 3 h before lysis. Cell lysates were immunoblotted with anti-Atg7 Ab, anti-FLAG Ab, or anti-GAPDH Ab as a loading control. Expression levels of Atg7 (left panels) and Tat (right panels) were quantified by densitometry and normalized to GAPDH protein levels. Data are representative of at least three independent experiments. (F) HEK cells were transfected with a p62-specific siRNA (sip62) or control siRNA (siCT) and then transfected with the plasmid expressing FLAG-Tat. The following day, cells were lysed, and p62 and Tat levels were assessed in lysates by Western blotting using Abs against p62 and FLAG. Sample loading was controlled by immunoblotting with anti-GAPDH Ab. Expression levels of p62 (left panels) and Tat (right panels) were quantified by densitometry and normalized to GAPDH protein levels. Data are representative of four independent experiments. AU, arbitrary units. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

treated cells (Fig. 2F). Overall, these results demonstrated that the autophagy pathway significantly contributes to Tat degradation and that the autophagy receptor p62, shown to interact with Tat, could confer selectivity in this process.

**The interaction between Tat and p62 is ubiquitin independent.** As we demonstrated that Tat interacts with p62 and since p62 is known to induce the selective autophagic degradation of substrates by interacting with LC3, we further analyzed whether Tat could be present in complexes with LC3. We thus performed GST pull-down experiments after cotransfection of plasmids expressing GST-LC3 and FLAG-Tat in HEK cells. As shown in Fig. 3A, Tat coprecipitates with GST-LC3. To assess whether this interaction was p62 dependent, we cotransfected cells with constructs expressing FLAG-Tat and a GST-tagged mutant of LC3

unable to interact with p62 (GST-LC3 F52A) (36, 41). We observed that Tat did not coprecipitate with LC3 F52A (Fig. 3A), indicating that the interaction between Tat and LC3 was indirect and seemingly regulated by p62. To confirm this hypothesis, we tested the interaction between Tat and a mutated form of p62 that does not interact with LC3 (GST-p62 $\Delta$ LIR). As expected, this mutant still interacted with Tat with an apparently increased efficacy, which could be explained by the lack of targeting to autophagy-mediated degradation and thus a prolonged protein complex stability (Fig. 3A, lane 6).

The autophagy receptor p62 has been reported to selectively direct ubiquitinated proteins or ubiquitinated organelles to autophagic degradation via specific recognition of ubiquitin moieties through its UBA domain, and the PB1 domain contributes to



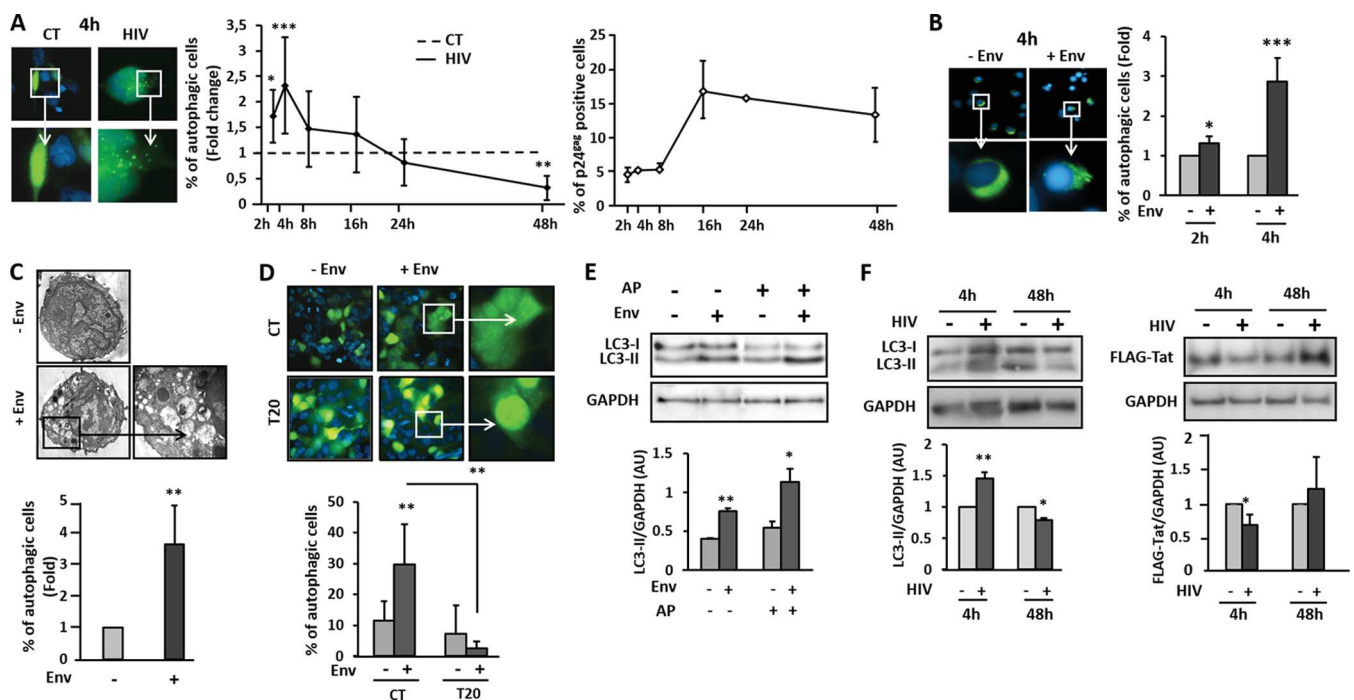
**FIG 3** p62-dependent interaction of Tat with LC3. (A) HEK cells were cotransfected with the FLAG-Tat vector and plasmids expressing either GST, GST-LC3, GST-LC3 F52A, GST-p62, or GST-p62 $\Delta$ LIR, as indicated. At 24 h posttransfection, cells were lysed, and lysates subjected to GST pull-down before immunoblotting with anti-FLAG Ab and anti-GST Ab. In each case, a fraction of lysates was preserved and used as an input control and immunoblotted with the anti-FLAG Ab. (B) HEK cells were cotransfected with plasmids expressing FLAG-Tat and either GST alone, GST-p62, GST-p62 $\Delta$ UBA, or GST-p62 $\Delta$ PB1 before GST pull-down. Results are representative of at least three independent experiments. (C) HEK cells transfected with plasmids expressing wild-type FLAG-Tat (Tat WT) or mutated forms of Tat (Tat K71R or Tat K50/51A) were either left untreated or treated or with 2  $\mu$ M torin 1 for 3 h. Lysates obtained from each condition were used to analyze the expression levels of Tat and GAPDH as previously described. FLAG-Tat levels were quantified by densitometry upon normalization with GAPDH expression levels in the corresponding samples. AU, arbitrary units.

this process. We thus analyzed the interaction between Tat and mutated forms of p62 in which the UBA (GST-p62 $\Delta$ UBA) or the PB1 (GST-p62 $\Delta$ PB1) domain was deleted. As shown in Fig. 3B (lanes 3 and 4), Tat still interacted with these two p62 mutants, indicating that ubiquitination might not influence the interaction between p62 and Tat *in vitro*. In accordance with this result, Tat mutants on known ubiquitinated lysines, previously reported to regulate Tat activity and stability (K71 and K50/51A, respectively) (36, 42, 43) are still degraded upon induction of autophagy by torin 1 (Fig. 3C).

**Autophagy is induced by HIV-1 envelope glycoproteins (Env) at the very first steps of HIV-1 infection.** To further decipher whether Tat degradation by autophagy could be relevant *in vivo*, we analyzed its occurrence in the context of HIV-1 infection. Indeed, we already demonstrated that autophagy is induced in uninfected bystander CD4<sup>+</sup> T lymphocytes after 48 h of coculture with Env-expressing cells (31). We extended this finding with experiments showing that the fusogenic function of gp41 is responsible for the observed Env-induced autophagy (30). Given that the gp41-mediated fusion process is an early HIV-1 entry event, we investigated whether autophagy could be induced very rapidly after contact of Env with its receptors on target cells before productive infection. To this aim, HEK cells expressing HIV receptors (HEK/CD4/CXCR4) and transfected with a plasmid expressing GFP-LC3 were cocultured with chronically infected T cells

(MOLT-X4) or with uninfected T cells (MOLT) as a negative control. The level of autophagy and the percentage of infected cells were analyzed at different time points of coculture. As shown in Fig. 4A, autophagy was rapidly induced in read-out cells upon coculture with MOLT-X4, with a peak around 4 h corresponding to the early phase of HIV-1 infection (19). Autophagy was then negatively regulated and finally completely inhibited after 24 h of coculture, a step corresponding to the late phases of HIV-1 infection. Importantly, induction of autophagy is inversely correlated with the level of infection. Of note, the same pattern was obtained when GFP-LC3-transfected cells were challenged with cell-free HIV-1 (data not shown). We next analyzed whether the viral envelope was contributing to this early autophagy induction during early events of HIV-1 infection of CD4<sup>+</sup> T cells. Primary CD4<sup>+</sup> T cells, expressing GFP-LC3, were cocultured with effector cells stably expressing Env, or not, at their surface (HEK.Env or HEK cells, respectively). As shown in Fig. 4B, Env alone was able to rapidly and significantly induce autophagy in target cells. To confirm and reinforce these data, we took advantage of another autophagy read-out by analyzing the phenotype of primary CD4<sup>+</sup> T cells by transmission electron microscopy upon 4 h of coculture with HEK cells stably expressing Env or not. We detected the appearance of numerous autophagic vacuoles in the cytoplasm of target CD4<sup>+</sup> T cells only in the presence of Env (Fig. 4C). Thus, Env is able to induce autophagy in target cells upon early contact with





**FIG 4** Autophagy is induced at early steps of HIV-1 infection. (A) HEK/CD4/CXCR4 cells, previously transfected with a plasmid expressing GFP-LC3, were cocultured with either MOLT cells (CT, negative control) or chronically infected MOLT-X4 cells (HIV) for the indicated times. The number of autophagic HEK/CD4/CXCR4 cells was counted by three different experimenters, and the result is the mean of three independent experiments. The percentage of autophagic cells obtained after coculture with MOLT-X4 cells was normalized with the percentage of autophagic cells obtained after coculture with MOLT cells. A representative pattern of GFP-LC3 puncta in HEK/CD4/CXCR4 cells upon 4 h of coculture with MOLT-X4 cells is presented on the left-hand side and compared to the fluorescence pattern obtained upon 4 h of coculture with control MOLT cells. In parallel, the percentage of HIV-infected cells was quantified by flow cytometry using the anti-p24 Ab. (B) Human primary CD4<sup>+</sup> T cells were transfected with a plasmid expressing GFP-LC3 and cocultured with HEK cells (negative control) or Env-transfected HEK cells for 2 h or 4 h. Quantification was performed as described above, and the results are presented as mean fold value of each condition from three independent experiments. A representative pattern of GFP-LC3 puncta in primary CD4<sup>+</sup> T cells upon 4 h of coculture with HEK-Env cells is presented and compared to the fluorescence pattern obtained upon 4 h of coculture with control HEK cells. (C) Human primary CD4<sup>+</sup> T cells were cocultured with HEK cells expressing Env, or not, for 4 h, and autophagic vacuoles were observed by transmission electron microscopy. The percentage of autophagic cells is presented. (D) Human primary CD4<sup>+</sup> T cells were cocultured with HEK cells expressing Env, or not, for 4 h in the presence or absence of AP. CD4<sup>+</sup> T cells were harvested, and lysates were immunoblotted with anti-LC3 Ab and anti-GAPDH Ab as a loading control. LC3-II levels were quantified by densitometry and normalized with GAPDH expression levels. (E) HEK/CD4/CXCR4 cells were transfected with the FLAG-Tat vector and then cocultured with MOLT cells (negative control) or with MOLT-X4 cells for 4 h and 48 h. Suspension cells were removed by washing, and autophagy induction was monitored in the lysates of target cells upon immunoblotting with anti-LC3 Ab (left panel). Tat levels were assessed with the anti-FLAG Ab (right panel), while sample loading was controlled with the anti-GAPDH Ab for each condition. LC3-II and Tat levels were quantified by densitometry upon normalization with GAPDH expression levels in the corresponding samples. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

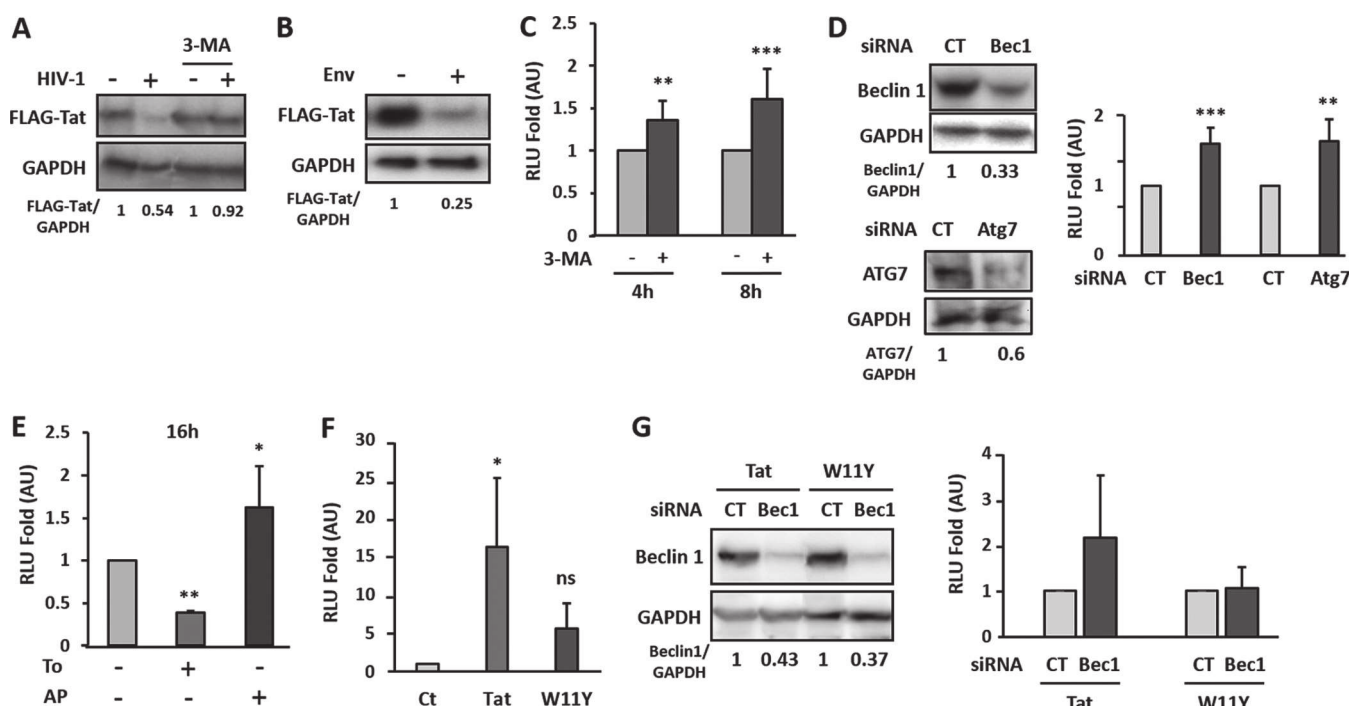
infected cells. It is interesting that, as shown for Env-mediated autophagy in longer kinetics of coculture (30), this early autophagy induction was dependent on the gp41 fusogenic function. Indeed, the addition of T20 to the coculture, a gp41-mediated fusion peptide inhibitor, completely abolished the Env-induced autophagy (Fig. 4D).

We then analyzed whether later steps of autophagy could be induced or blocked when cellular lysosomal proteases were inhibited by AP. As evidenced in Fig. 4E, the increased level of LC3-II obtained upon 4 h of contact with Env-expressing HEK cells was further enhanced in lysates from cells also pretreated with AP, confirming that the induced autophagy flux was not blocked during the early time points of contact between the viral envelope and CD4<sup>+</sup> T cells.

To confirm that Tat could be a selective target for autophagic degradation in the context of productive infection, we analyzed its expression levels upon Env-induced autophagy during HIV-1 infection. For this purpose, we transfected a plasmid expressing FLAG-Tat in HEK/CD4/CXCR4 cells and cocultured these cells

with MOLT-X4 cells for 4 h, a time previously shown to correspond to the peak of Env-mediated autophagy induction, or 48 h, a time for which autophagy was seemingly inhibited (Fig. 4A). As expected, the level of LC3-II was increased up to 70% after 4 h of coculture while being decreased by 40% upon 48 h of coculture with MOLT-X4 cells, strongly supporting an early induction of autophagy followed by its blockade during HIV-1 infection. Remarkably, Tat expression levels were inversely correlated to those of LC3-II, meaning that Tat is depleted when autophagy is induced, while this effect was not observed under conditions where autophagy is inhibited by the virus (Fig. 4F).

**Env-induced autophagy triggers Tat degradation and consequently represses HIV-1 LTR activation.** In order to assess the contribution of Env-mediated autophagy induction in Tat degradation, we transfected a plasmid expressing FLAG-Tat in HEK/CD4/CXCR4 cells and treated these cells with the autophagy initiation inhibitor 3-methyladenine (3-MA) before coculture for 4 h with uninfected or chronically HIV-infected T cells. As shown in Fig. 5A, Tat levels markedly decreased upon coculture with



**FIG 5** Autophagy-mediated Tat degradation inhibits HIV-1 LTR activation and viral replication. (A) HEK/CD4/CXCR4 cells transfected with the FLAG-Tat vector were cocultured with uninfected (MOLT) or chronically HIV-1-infected cells (MOLT-X4) cells for 4 h in the presence or absence of 10 mM 3-MA. Tat expression was monitored by Western blotting using the anti-FLAG Ab and quantified upon normalization with GAPDH levels. (B) HEK/CD4/CXCR4 cells, transfected as above, were cocultured for 4 h with effector control cells (Env negative) or cells expressing HIV-1 envelope (8.E5 cells). Tat detection and quantification were done as previously described. (C) MAGIC5B cells were cocultured with MOLT-X4 cells for 4 h or 8 h in the presence or absence of 3-MA. After cell lysis,  $\beta$ -galactosidase activity was quantified by luminescence and normalized to the condition in the absence of 3-MA for each time of coculture. Data represent the means  $\pm$  standard errors of at least three independent experiments. (D) MAGIC5B cells were transfected with control (CT) or beclin 1 (Bec1)- or Atg7-specific siRNA for 16 h. Transfected cells were then cocultured with MOLT-X4 cells for 4 h. The cells were washed, harvested, and then lysed. A fraction of lysates was kept to control beclin 1, ATG7, and GAPDH levels by immunoblotting (left panels) while remaining lysates were used to measure  $\beta$ -galactosidase activity, normalized to the activity obtained from cells transfected with CT siRNAs for each time point. Data are means  $\pm$  standard errors of four independent experiments. (E) MAGIC5B cells cocultured with MOLT-X4 cells were incubated or not with 2  $\mu$ M torin 1 for 16 h in the presence or absence of AP. Fold induction of  $\beta$ -galactosidase activity was calculated as the enzymatic activity obtained in treated cells compared to that in untreated cells. Data are representative of at least three independent experiments. (F) MAGIC5B cells were incubated for 48 h with 200 nM recombinant wild-type Tat (Tat), mutant Tat (W11Y), or medium alone (Ct) before  $\beta$ -galactosidase activity was assayed. (G) MAGIC5B cells, treated as in described for panel D, were incubated for 48 h with 200 nM recombinant Tat or W11Y. A fraction of lysates was kept to for beclin 1 and GAPDH levels by immunoblotting while remaining lysates were used to measure  $\beta$ -galactosidase activity. Data are representative of at least five independent experiments. RLU, relative light units. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

MOLT-X4 cells, while they were fully rescued in the presence of 3-MA. This result confirms that Env-mediated autophagy flux induction is responsible for Tat degradation. We reproduced the experiments using 8.E5 cells as donor cells. These CD4<sup>+</sup> T cells are productively infected, thus expressing Env at the surface, but because they do not express the reverse transcriptase, they do not produce infectious viral particles. With this model, the Env-mediated autophagy induction was even more pronounced, as evidenced by the increased and sustained Tat degradation observed in target cells (Fig. 5B).

While viral challenge could rapidly and transiently induce autophagy, productive infection appeared to block this defense mechanism, thus potentially protecting the viral transactivator Tat from degradation. Interestingly, Tat can exert multiple effects on bystander cells when secreted from productively infected cells. For instance, secreted Tat was reported to transactivate the expression of genes under the control of the HIV LTR in bystander cells. To examine whether incoming Tat could be degraded by autophagy, we used HeLa cells expressing CD4 and CXCR4 together with  $\beta$ -galactosidase under the control of the HIV LTR promoter

(MAGIC5B cells) (44). MAGIC5B cells were cocultured for 4 h and 8 h with MOLT-X4 cells in the presence or absence of 3-MA, and  $\beta$ -galactosidase activity was measured. Enzymatic activity could be detected in reporter target cells, supporting the bystander effect of secreted Tat. Transactivation was significantly increased in the presence of 3-MA, strongly suggesting that autophagy controls Tat-mediated transactivation of the HIV LTR (Fig. 5C). Because 3-MA could have some side effects possibly affecting Tat secretion from infected cells, we aimed at confirming these results by directly downregulating the expression of essential ATG proteins in target cells. Therefore, MAGIC5B cells were transfected with siRNA directed against beclin 1 or Atg7 or unrelated siRNA before coculture with MOLT-X4 cells. As expected, the level of  $\beta$ -galactosidase activity was increased at both time points of coculture when beclin 1 or Atg7 expression was silenced (Fig. 5D). Inversely, autophagy induction should inhibit HIV LTR transactivation due to Tat degradation (Fig. 2). Indeed, when MAGIC5B cells were cocultured with MOLT-X4 cells in the presence of torin 1, we observed a significant decrease of  $\beta$ -galactosidase activity, inversely correlated with the increased enzymatic activity ob-

tained upon autophagy flux blockade with AP (Fig. 5E). Hence, the effect of drug-mediated autophagy induction on transactivation by Tat appeared to be sustained, as evidenced by the decreased transactivation upon 16 h of coculture (Fig. 5E). These data thus show that the autophagy pathway can be a major regulator of Tat-mediated transactivation and viral replication. This conclusion is valid whether Tat is produced intracellularly (i.e., by infected cells) or delivered from the outside (i.e., endocytosed).

Indeed, to confirm that the detected viral promoter transactivation was exclusively Tat dependent and controlled by autophagy, we took advantage of a previously described Tat mutant that lacks its single tryptophan residue (Tat-W11Y). This mutant retains transactivation activity but is unable to enter bystander cells (35) (Fig. 5F). MAGIC5B cells were transfected with a beclin 1-specific siRNA or a control siRNA and then treated with 200 nM recombinant wild-type Tat (Tat-WT) or Tat-W11Y, and  $\beta$ -galactosidase activity was measured after 48 h. We observed that, in contrast to cells treated with Tat-WT, transactivation was not significant when Tat-W11Y was used (Fig. 5G). These results confirm that transactivation by incoming Tat is targeted by selective autophagy.

## DISCUSSION

HIV-1, like other viruses, has to deal with cellular defenses in order to replicate efficiently. Although several cellular HIV-1 restriction factors have been identified, most of them were shown to be affected by viral countermeasures (45). We previously demonstrated that HIV-1 Env induces autophagy in uninfected CD4<sup>+</sup> T lymphocytes via the fusogenic function of gp41, leading to their apoptotic cell death (30, 31). In this study, we demonstrate that induction of autophagy is readily detectable early after viral challenge in an Env-dependent manner, while being compromised at later times. Autophagic activity is inversely correlated with HIV-1 production. We further provide evidence that autophagy, when pharmacologically induced in productively infected CD4<sup>+</sup> T cells, leads to a significant decrease in viral production, thus identifying this cellular pathway as an HIV-1 restriction mechanism. This observation led us to decipher the molecular mechanism of the autophagy-mediated antiviral effect. A two-hybrid screen revealed a strong and specific interaction between p62 (also called SQSTM1), an autophagy receptor, and the viral transactivator Tat. We first confirmed the interaction between the proteins at the cellular level in pulldown assays and confirmed that Tat expression levels were modulated in cells upon autophagy activation or inhibition. We then demonstrated that Tat expression was significantly increased in p62-deficient cells, suggesting that p62 could be a mediator of Tat degradation by selective autophagy. We therefore analyzed the domains of p62 possibly involved in the interaction with Tat. Surprisingly, the interaction between Tat and p62 did not rely on a functional UBA domain of p62, suggesting that ubiquitination would not regulate p62-mediated Tat degradation, in contrast to the general paradigm reported for other substrates (46). Consistently, Tat mutations at the level of lysines, which were previously shown to regulate Tat stability and activity, did not prevent its degradation upon autophagy induction. Although we cannot exclude modification of other residues or the involvement of unidentified cellular proteins belonging to the complex Tat/p62, our data represent the first demonstration of selective autophagic degradation of a viral transactivator. Indeed, in a context of viral infection, a selective p62-mediated degrada-

tion has been demonstrated only for two structural viral proteins, the capsid protein of the chikungunya virus (CHIKV) and the capsid protein of the Sindbis virus (SIN) (4, 47). In the case of CHIKV, p62 binds to ubiquitinated capsid and targets it to autophagic degradation, while in the case of the SIN, and reminiscent of our data for Tat, the interaction between p62 and the SIN capsid does not require the p62 UBA domain, highlighting a potential original mechanism by which p62 recognizes autophagic substrates. As p62 could frequently interact with viral proteins (48), it would be interesting to decipher the molecular mechanism behind this ubiquitin-independent p62-mediated autophagic degradation, with a particular emphasis on the identification of other putative cellular partners linking p62 to its substrates. One potential candidate is the histone deacetylase HDAC6, whose deacetylase activity was shown to be regulated upon interaction with p62 (49). Furthermore, HDAC6 was also reported to deacetylate Tat, leading to a decrease in Tat transactivation activity (50).

Although cellular factors are involved in HIV-1 transcription, Tat is absolutely required for HIV-1 replication since it is needed for the elongation of viral transcripts (20). Tat is thus a perfect target to shut down viral production. Interestingly, Tat was shown to be actively secreted from infected cells and captured by several cell types (21, 42). Our results suggest that incoming Tat is also a target for autophagic degradation following internalization by bystander cells. The consequences of this degradation on the different known effects of Tat and, in particular, on the homeostasis of target cells warrant further investigation.

We discovered that autophagy is induced by HIV-1 Env at the very first steps of infection. This Env-induced autophagy is time regulated and initially triggers the degradation of any incoming Tat, avoiding the death of the target cells long enough to allow the virus to initiate its replication. If productive infection of the target cells proceeds, the virus blocks autophagy, and Tat, thereby protected from degradation, can fulfill its transcriptional role, enabling robust viral production.

Intracellular Tat concentration is tightly regulated. Indeed, we demonstrated here that Tat can be degraded by basal constitutive autophagy and upon Env-induced autophagy. Tat was also reported to inhibit the autophagy process in uninfected cells (33, 34), underlining the complex relationship between autophagy and this viral protein. This also seems to be the case for another retroviral transactivator, the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax protein. Indeed, it has been demonstrated that Tax is a substrate for autophagy degradation, but the underlying mechanism is still unknown (51). They also demonstrated that Tax is able to block the degradative phases of autophagy, suggesting that this viral protein could control its own stability and turnover (51).

Highly active antiretroviral therapy (HAART) can efficiently block viral replication and reduce the levels of circulating virus below the detection limit. Despite its efficacy, the virus is not eradicated due to the establishment of latent but replication-competent proviruses in reservoir cells probably located in peripheral blood and tissues. Viral latency is characterized by HIV-1 LTR transcriptional repression, and, interestingly, a hallmark of this process is the low level of Tat. Thus, specific degradation of Tat by autophagy could adversely contribute to the establishment of HIV-1 latency, which should be taken into account in the context of future antiviral strategies.



Since Tat is absolutely required for viral transcription, many therapeutic strategies targeting this viral protein have been considered, such as Tat antagonists (52), dominant negative Tat (53, 54), Tat-inhibitory peptides (55–58), or siRNAs against Tat (59–61). However, none of these strategies has been successful to date. The autophagy-mediated degradation of Tat presented here could represent a new way to target this viral protein in infected cells, blocking viral transcription and thus viral replication. Indeed, while HAART acts directly on viral enzymatic proteins, the induced degradation of Tat by autophagy could represent a new strategy based on a cellular response. Interestingly, some sirolimus-derived compounds (rapamycin and rapamune), which are strong inducers of autophagy and already used in therapeutics, were shown to possess anti-HIV-1 properties (62). Recently, Campbell and Spector demonstrated that vitamin D<sub>3</sub> inhibits HIV replication through induction of autophagy (63). It would be interesting, therefore, to examine the autophagy-induced degradation of Tat in these contexts and its possible outcome on inhibition of HIV replication.

The results obtained in our study provide new evidence of the antiviral action of autophagy and highlight why the viruses have evolved strategies to block this process.

## ACKNOWLEDGMENTS

The work was supported by institutional funds from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Montpellier University I and II (UMI and UMII) and by grants from Sidaction and the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS). S.S. was the recipient of a fellowship from ANRS and Sidaction.

We thank M. Benkirane for providing the Tat K71R construct, T. Johansen for the GST-p62 plasmids, T. Yoshimori for the GFP-LC3 construct, and N. Chazal for the Gag expression vector. The anti-p24 antibody was obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH.

## REFERENCES

1. Tanida I. 2011. Autophagy basics. *Microbiol Immunol* 55:1–11. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00271.x>.
2. Suzuki K, Noda T, Ohsumi Y. 2004. Interrelationships among Atg proteins during autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21:1057–1065. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.1152>.
3. Uchiyama Y, Shibata M, Koike M, Yoshimura K, Sasaki M. 2008. Autophagy-physiology and pathophysiology. *Histochem Cell Biol* 129:407–420. <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-008-0406-y>.
4. Orvedahl A, MacPherson S, Sumpter R, Jr, Tallozy Z, Zou Z, Levine B. 2010. Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host Microbe* 7:115–127. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2010.01.007>.
5. Sumpter R, Jr, Levine B. 2011. Selective autophagy and viruses. *Autophagy* 7:260–265. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.7.3.14281>.
6. Deretic V, Saitoh T, Akira S. 2013. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 13:722–737. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3532>.
7. Pyo JO, Nah J, Jung YK. 2012. Molecules and their functions in autophagy. *Exp Mol Med* 44:73–80. <http://dx.doi.org/10.3858/emmm.2012.44.2.029>.
8. Weidberg H, Shpilka T, Shvets E, Elazar Z. 2010. Mammalian Atg8s: one is simply not enough. *Autophagy* 6:808–809. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.6.6.12579>.
9. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. 2010. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J* 29:1792–1802. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.74>.
10. Johansen T, Lamark T. 2011. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 7:279–296. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.7.3.14487>.
11. Birgisdottir AB, Lamark T, Johansen T. 2013. The LIR motif—crucial for selective autophagy. *J Cell Sci* 126:3237–3247. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.126128>.
12. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T. 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171:603–614. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200507002>.
13. Bjorkoy G, Lamark T, Johansen T. 2006. p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery. *Autophagy* 2:138–139. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.2.2.2405>.
14. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T. 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282:24131–24145. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M702824200>.
15. Ishimura R, Tanaka K, Komatsu M. 2014. Dissection of the role of p62/Sqstm1 in activation of Nrf2 during xenophagy. *FEBS Lett* 588:822–828. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.045>.
16. Knodler LA, Celli J. 2011. Eating the strangers within: host control of intracellular bacteria via xenophagy. *Cell Microbiol* 13:1319–1327. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01632.x>.
17. Arrildt KT, Joseph SB, Swanson R. 2012. The HIV-1 env protein: a coat of many colors. *Curr HIV/AIDS Rep* 9:52–63. <http://dx.doi.org/10.1007/s11904-011-0107-3>.
18. Freed EO, Mouland AJ. 2006. The cell biology of HIV-1 and other retroviruses. *Retrovirology* 3:77. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-3-77>.
19. Mohammadi P, Desfarges S, Bartha I, Joos B, Zangger N, Munoz M, Gunthard HF, Beerenwinkel N, Telenti A, Ciuffi A. 2013. 24 hours in the life of HIV-1 in a T cell line. *PLoS Pathog* 9:e1003161. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003161>.
20. Ott M, Geyer M, Zhou Q. 2011. The control of HIV transcription: keeping RNA polymerase II on track. *Cell Host Microbe* 10:426–435. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2011.11.002>.
21. Debaisieux S, Rayne F, Yezid H, Beaumelle B. 2012. The ins and outs of HIV-1 Tat. *Traffic* 13:355–363. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01286.x>.
22. Huigen MC, Kamp W, Nottet HS. 2004. Multiple effects of HIV-1 trans-activator protein on the pathogenesis of HIV-1 infection. *Eur J Clin Invest* 34:57–66. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2362.2004.01282.x>.
23. Rayne F, Vendeville A, Bonhoure A, Beaumelle B. 2004. The ability of chloroquine to prevent tat-induced cytokine secretion by monocytes is implicated in its in vivo anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *J Virol* 78:12054–12057. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.21.12054-12057.2004>.
24. Vendeville A, Rayne F, Bonhoure A, Bettache N, Montcourrier P, Beaumelle B. 2004. HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses. *Mol Biol Cell* 15:2347–2360. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E03-12-0921>.
25. Biard-Piechaczyk M, Borel S, Espert L, de Bettignies G, Caux O. 2012. HIV-1, ubiquitin and ubiquitin-like proteins: the dialectic interactions of a virus with a sophisticated network of post-translational modifications. *Biol Cell* 104:165–187. <http://dx.doi.org/10.1111/boc.201100112>.
26. Borel S, Espert L, Biard-Piechaczyk M. 2012. Macroautophagy regulation during HIV-1 infection of CD4<sup>+</sup> T cells and macrophages. *Front Immunol* 3:97. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00097>.
27. Espert L, Biard-Piechaczyk M. 2009. Autophagy in HIV-induced T cell death. *Curr Top Microbiol Immunol* 335:307–321. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8\\_15](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8_15).
28. Blanchet FP, Moris A, Nikolic DS, Lehmann M, Cardinaud S, Stalder R, Garcia E, Dinkins C, Leuba F, Wu L, Schwartz O, Deretic V, Piguet V. 2010. Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunoamphisomes in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses. *Immunity* 32:654–669. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.04.011>.
29. Blanchet FP, Piguet V. 2010. Immunoamphisomes in dendritic cells amplify TLR signaling and enhance exogenous antigen presentation on MHC-II. *Autophagy* 6:816–818. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.6.6.12623>.
30. Denizot M, Varbanov M, Espert L, Robert-Hebmann V, Sagnier S, Garcia E, Curriu M, Mamoun R, Blanco J, Biard-Piechaczyk M. 2008. HIV-1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells. *Autophagy* 4:998–1008. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.6880>.
31. Espert L, Denizot M, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, Gay B, Varbanov M, Codogno P, Biard-Piechaczyk M. 2006. Autophagy is involved in T cell

- death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J Clin Invest* 116: 2161–2172. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI26185>.
32. Espert L, Varbanov M, Robert-Hebmann V, Sagnier S, Robbins I, Sanchez F, Lafont V, Biard-Piechaczyk M. 2009. Differential role of autophagy in CD4 T cells and macrophages during X4 and R5 HIV-1 infection. *PLoS One* 4:e5787. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005787>.
  33. Van Grol J, Subauste C, Andrade RM, Fujinaga K, Nelson J, Subauste CS. 2010. HIV-1 inhibits autophagy in bystander macrophage/monocytic cells through Src-Akt and STAT3. *PLoS One* 5:e11733. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011733>.
  34. Li JC, Au KY, Fang JW, Yim HC, Chow KH, Ho PL, Lau AS. 2011. HIV-1 trans-activator protein dysregulates IFN-gamma signaling and contributes to the suppression of autophagy induction. *AIDS* 25:15–25. <http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0b013e328340fd61>.
  35. Rayne F, Debaisieux S, Yezid H, Lin YL, Mettling C, Konate K, Chazal N, Arold ST, Pugniere M, Sanchez F, Bonhoure A, Briant L, Loret E, Roy C, Beaumelle B. 2010. Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate enables efficient secretion of HIV-1 Tat by infected T-cells. *EMBO J* 29: 1348–1362. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.32>.
  36. Bres V, Kiernan RE, Linares LK, Chable-Bessia C, Plechakova O, Treand C, Emiliani S, Peloponese JM, Jeang KT, Coux O, Scheffner M, Benkirane M. 2003. A non-proteolytic role for ubiquitin in Tat-mediated transactivation of the HIV-1 promoter. *Nat Cell Biol* 5:754–761. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1023>.
  37. Schneider R, Campbell M, Nasioulas G, Felber BK, Pavlakis GN. 1997. Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J Virol* 71:4892–4903.
  38. Charret R, Fauré-Fremiet E. 1967. Technique de rassemblement de microorganismes: preinclusion dans un caillot de fibrine. *J Microsc* 6:1063–1066.
  39. Zar JH. 1996. Biostatistical analysis, 3rd ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ.
  40. Zhou D, Spector SA. 2008. Human immunodeficiency virus type-1 infection inhibits autophagy. *AIDS* 22:695–699. <http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282f4a836>.
  41. Shvets E, Fass E, Scherz-Shouval R, Elazar Z. 2008. The N terminus and Phe52 residue of LC3 recruit p62/SQSTM1 into autophagosomes. *J Cell Sci* 121:2685–2695. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.026005>.
  42. Johri MK, Mishra R, Chhatbar C, Unni SK, Singh SK. 2011. Tits and bits of HIV Tat protein. *Expert Opin Biol Ther* 11:269–283. <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.2011.546339>.
  43. Kiernan RE, Vanhulle C, Schiltz L, Adam E, Xiao H, Maudoux F, Calomme C, Burny A, Nakatani Y, Jeang KT, Benkirane M, Van Lint C. 1999. HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *EMBO J* 18:6106–6118. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/18.21.6106>.
  44. Kimpton J, Emerman M. 1992. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. *J Virol* 66:2232–2239.
  45. Strebel K. 2013. HIV accessory proteins versus host restriction factors. *Curr Opin Virol* 3:692–699. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2013.08.004>.
  46. Rogov V, Dotsch V, Johansen T, Kirkin V. 2014. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell* 53:167–178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.014>.
  47. Judith D, Mostowy S, Bourai M, Gangneux N, Lelek M, Lucas-Hourani M, Cayet N, Jacob Y, Prevost MC, Pierre P, Tangy F, Zimmer C, Vidalain PO, Couderc T, Lecuit M. 2013. Species-specific impact of the autophagy machinery on Chikungunya virus infection. *EMBO Rep* 14: 534–544. <http://dx.doi.org/10.1038/embo.2013.51>.
  48. Gregoire IP, Rabourdin-Combe C, Faure M. 2012. Autophagy and RNA virus interactomes reveal IRGM as a common target. *Autophagy* 8:1136–1137.
  49. Yan J, Seibenhener ML, Calderilla-Barbosa L, Diaz-Meco MT, Moscat J, Jiang J, Wooten MW, Wooten MC. 2013. SQSTM1/p62 interacts with HDAC6 and regulates deacetylase activity. *PLoS One* 8:e76016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0076016>.
  50. Huo L, Li D, Sun X, Shi X, Karna P, Yang W, Liu M, Qiao W, Aneja R, Zhou J. 2011. Regulation of Tat acetylation and transactivation activity by the microtubule-associated deacetylase HDAC6. *J Biol Chem* 286:9280–9286. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.208884>.
  51. Tang SW, Chen CY, Klase Z, Zane L, Jeang KT. 2013. The cellular autophagy pathway modulates human T-cell leukemia virus type 1 replication. *J Virol* 87:1699–1707. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02147-12>.
  52. Hsu MC, Schutt AD, Holly M, Slice LW, Sherman MI, Richman DD, Potash MJ, Volsky DJ. 1991. Inhibition of HIV replication in acute and chronic infections in vitro by a Tat antagonist. *Science* 254:1799–1802. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1763331>.
  53. Green M, Ishino M, Loewenstein PM. 1989. Mutational analysis of HIV-1 Tat minimal domain peptides: identification of trans-dominant mutants that suppress HIV-LTR-driven gene expression. *Cell* 58:215–223. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90417-0](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(89)90417-0).
  54. Pearson L, Garcia J, Wu F, Modesti N, Nelson J, Gaynor R. 1990. A transdominant Tat mutant that inhibits tat-induced gene expression from the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5079–5083. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.87.13.5079>.
  55. Agbottah E, Zhang N, Dadgar S, Pumfery A, Wade JD, Zeng C, Kashanchi F. 2006. Inhibition of HIV-1 virus replication using small soluble Tat peptides. *Virology* 345:373–389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.062>.
  56. D'Orso I, Grunwell JR, Nakamura RL, Das C, Frankel AD. 2008. Targeting tat inhibitors in the assembly of human immunodeficiency virus type 1 transcription complexes. *J Virol* 82:9492–9504. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00763-08>.
  57. Hamy F, Felder ER, Heizmann G, Lazdins J, Aboul-ela F, Varani G, Karn J, Klimkait T. 1997. An inhibitor of the Tat/TAR RNA interaction that effectively suppresses HIV-1 replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3548–3553. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.94.8.3548>.
  58. Okamoto H, Cujec TP, Peterlin BM, Okamoto T. 2000. HIV-1 replication is inhibited by a pseudo-substrate peptide that blocks Tat transactivation. *Virology* 270:337–344. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.2000.0311>.
  59. Coburn GA, Cullen BR. 2002. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol* 76:9225–9231. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.18.9225-9231.2002>.
  60. Lee MT, Coburn GA, McClure MO, Cullen BR. 2003. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages by using Tat- or CCR5-specific small interfering RNAs expressed from a lentivirus vector. *J Virol* 77:11964–11972. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.77.22.11964-11972.2003>.
  61. Surabhi RM, Gaynor RB. 2002. RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 76:12963–12973. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.24.12963-12973.2002>.
  62. Donia M, McCubrey JA, Bendtzen K, Nicoletti F. 2010. Potential use of rapamycin in HIV infection. *Br J Clin Pharmacol* 70:784–793. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2125.2010.03735.x>.
  63. Campbell GR, Spector SA. 2012. Toll-like receptor 8 ligands activate a vitamin D mediated autophagic response that inhibits human immunodeficiency virus type 1. *PLoS Pathog* 8:e1003017. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003017>.



### C. Discussion et perspectives

Contrairement aux bactéries, qui peuvent être ciblées et dégradées par autophagie, la capture et la dégradation sélective des composants viraux par l'autophagie sont beaucoup moins documentées. La première description d'un tel exemple de virophagie a été obtenu par l'équipe de Beth Levine et concerne la dégradation sélective de la capsid du virus Sindbis grâce à son interaction avec p62 (Orvedahl et al., 2010). Comme dans notre cas, l'interaction entre p62 et la capsid de SINV ne nécessite pas l'intervention du domaine UBA de p62, et se fait donc pas un mécanisme non conventionnel qu'il sera important d'élucider. Cela permettra sans doute d'identifier d'autres substrats de la virophagie et d'autres partenaires de p62. Concernant Tat, il est possible que l'interaction ne soit pas directe mais soit rendue possible par une troisième protéine. La protéine HDAC6, une histone déacétylase, est un bon candidat puisqu'elle est déjà décrite comme interagissant avec p62 pour réguler son activité (Yan et al., 2013). En parallèle, HDAC6 peut aussi se lier à Tat pour la déacétyler et réguler son activité transactivatrice (Huo et al., 2011).

L'existence de réservoirs cellulaires latents du VIH-1 constitue un obstacle majeur à l'éradication de l'infection. En effet, ces réservoirs sont inaccessibles aux drogues utilisées dans les traitements actuels. L'établissement de cette latence virale est un phénomène multifactoriel complexe, qui est notamment caractérisé par une répression de la transcription virale se traduisant, entre autres, par une diminution d'expression de Tat (Siliciano and Greene, 2011). La dégradation sélective de Tat par autophagie pourrait alors moduler ses niveaux d'expression et contribuer à l'établissement de la latence. La présence de Tat est en effet capable d'inhiber la mise en place de la latence, mais aussi de réactiver les populations réservoirs (Donahue et al., 2012). En ciblant cette voie, il serait alors peut être possible d'inhiber la mise en place des réservoirs viraux et donc de rendre les trithérapies plus efficaces.

Le contrôle de la concentration de Tat joue aussi un rôle très important dans ses effets biologiques : c'est en effet une protéine très finement régulée, dont les actions varient en fonction de sa concentration (Johri et al., 2011). En jouant sur les niveaux d'expression de Tat, l'autophagie favorise donc l'une ou l'autre de ses fonctions biologiques et il faudrait étudier l'effet de l'induction de l'autophagie sur les cellules cibles de la Tat sécrétée, afin de voir si

cela permet d'abroger ses effets toxiques. Il est intéressant de noter que bien que Tat soit sélectivement dégradée par autophagie via p62, elle est aussi capable d'inhiber l'autophagie dans les macrophages non infectés, en inhibant la phosphorylation de STAT1 et en induisant la production d'IL-10 (Van Grol et al., 2010). Tat, en inhibant l'autophagie dans ces cellules, pourrait alors faciliter l'infection par d'autres agents pathogènes opportunistes. Des travaux récents ont aussi montré que Tat dérégule aussi l'autophagie dans les neurones en se liant à LAMP2A. Cela faciliterait la fusion des lysosomes aux autophagosomes et aboutirait aux processus de dégénérescence neuronale (Fields et al., 2015). L'effet de Tat sur les neurones est sans aucun doute potentialisé par les autres protéines virales (gp120, Nef) qui sont aussi connues pour moduler l'autophagie et participent à l'établissement des démences liées au SIDA chez ces patients.

La relation entre Tat et l'autophagie est donc complexe et dépend du type cellulaire impliqué ; il semblerait que ce soit aussi le cas d'un autre transactivateur de rétrovirus, à savoir Tax, qui est codé par HTLV-1. Cette protéine est elle aussi dégradée par autophagie puisque l'inhibition de ce processus lui permet d'être stabilisée. Tax bloque également les étapes tardives du flux autophagique puisqu'elle inhibe la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Tang et al., 2013). Néanmoins, les auteurs n'ont pas encore recherché l'implication d'un récepteur autophagique dans cette dégradation.

Pour résumer, la protéine Tat a vraiment un rôle central dans l'infection par le VIH-1 : son rôle essentiel dans l'expression du virus et son implication dans sa pathogénicité fait d'elle une cible thérapeutique privilégiée. Différentes stratégies ont été élaborées, mais aucune d'entre elles ne semble pour l'instant efficace : entre autres, des antagonistes de Tat (extra- et intracellulaires), l'utilisation d'ARN interférent ou l'élaboration de vaccins dirigés contre elle (Rusnati and Presta, 2002). On peut donc penser que l'utilisation de drogues qui moduleraient l'autophagie serait un moyen détourné d'induire la dégradation de Tat et donc de bloquer la transcription du virus et la synthèse de nouvelles particules virales. Dans ce sens, la rapamycine, connue pour induire l'autophagie, a déjà utilisée en thérapeutique et montre des propriétés antivirales, puisqu'elle permet de diminuer la réplication du VIH (Donia et al., 2010).



## II. Rôle de l'autophagie sélective dans la mort par apoptose des lymphocytes T CD4 non infectés après contact avec Env

---

### A. Introduction et contexte

Dans la deuxième partie de mon doctorat, je me suis intéressée à la relation entre l'autophagie et l'apoptose dans les lymphocytes T CD4 non infectés après contact avec Env. En effet, l'équipe a montré que l'autophagie est un processus nécessaire au déclenchement de l'apoptose dans ce modèle. De façon intéressante, l'autophagie doit être complète, et donc dégradative, pour conduire à l'apoptose. Ceci suggère qu'un facteur de survie, dont l'absence conduirait à l'apoptose, serait dégradé par autophagie. Nos résultats préliminaires montrent qu'Env induit un stress oxydatif dans les cellules cibles non infectées et que ce stress est impliqué dans leur mort par apoptose. De plus, nous avons observé que plusieurs marqueurs des peroxysomes sont dégradés dans les mêmes conditions. Les peroxysomes sont des organelles chargées de maintenir un état d'oxydation compatible avec la survie cellulaire. Notre hypothèse est donc que l'autophagie, induite par Env, conduit à la dégradation sélective des peroxysomes (pexophagie), entraînant l'accumulation d'espèces oxydées dans les cellules cibles et ainsi, leur mort par apoptose.

L'objectif du projet en cours, et présenté dans cette partie, est de démontrer l'implication de la dégradation des peroxysomes par l'autophagie induite par Env, ainsi que son rôle dans l'apoptose de ces cellules.

### B. Résultats

#### 1. Modèles cellulaires utilisés

Ces résultats ont été obtenus en utilisant des modèles basés sur l'analyse de cellules dites «cibles» exprimant les récepteurs CD4 et CXCR4 en surface, après leur coculture avec des cellules dites «effectrices» exprimant Env en surface. Nous avons plusieurs modèles à

disposition, qui nous permettent de reproduire et d'analyser les effets des contacts entre cellules :

- **Modèle 1 (Figure 25) :** Les cellules cibles sont issues des lignées dérivées de lymphoblastes exprimant les récepteurs du VIH (A201.CD4 403). Ces cellules expriment un récepteur CD4 tronqué en position 403, donc incapable de transmettre des signaux mais qui peut quand même lier la gp120. Nous utilisons aussi des cellules T CD4 primaires purifiées à partir de sang. Elles sont mises en coculture pendant 48h (temps déjà connu pour que l'autophagie induise l'apoptose dans le cas d'une infection non productive) avec des cellules HEK 293 T exprimant stablement Env (HEK.Env ou HEKgp).

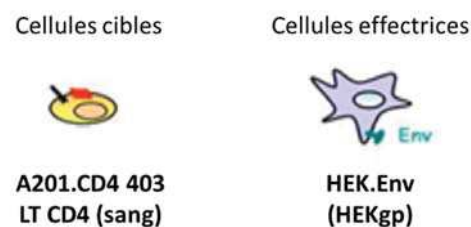


Figure 25. Modèle d'étude 1

- **Modèle 2 (Figure 26) :** Les cellules cibles sont des HEK 293T qui expriment CD4 et CXCR4. Elles sont mises en coculture pour 48h avec des cellules T dites effectrices exprimant Env : les 8.E5 qui sont des cellules T chroniquement infectées par le VIH mais qui portent une mutation sur la reverse transcriptase virale, et qui sont donc incapables de produire des virions infectieux.

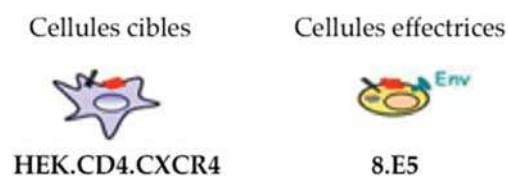


Figure 26. Modèle d'étude 2

2. L'autophagie induite par Env est nécessaire au déclenchement de l'apoptose des lymphocytes T CD4 non infectés

Les résultats obtenus dans l'équipe montrent que l'autophagie est massivement activée par Env exprimée à la surface des cellules infectées ou transfectées et que cette autophagie est nécessaire au déclenchement de l'apoptose des CD4 non infectés. En effet, l'utilisation de drogues qui bloquent la dégradation par voie autophagique inhibe l'apoptose et montre que ce processus doit être complet et dégradatif pour induire la mort de ces cellules T CD4 non infectées (Espert et al., 2006) (Figure 27).

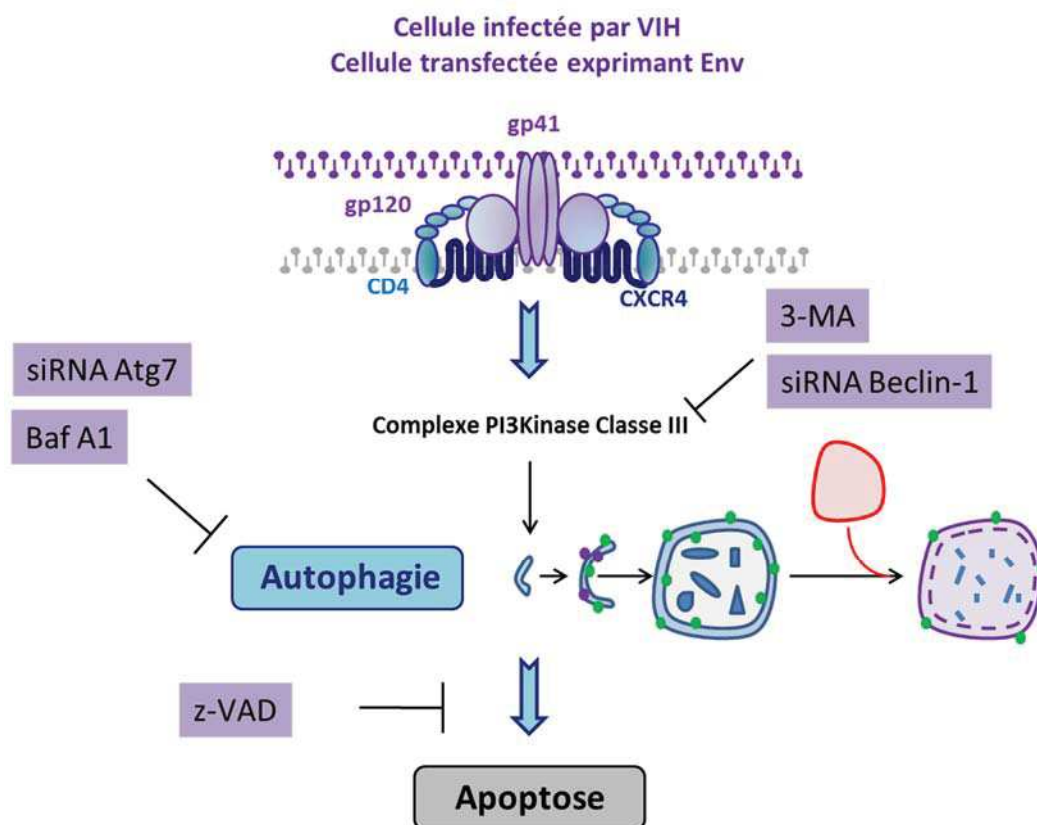
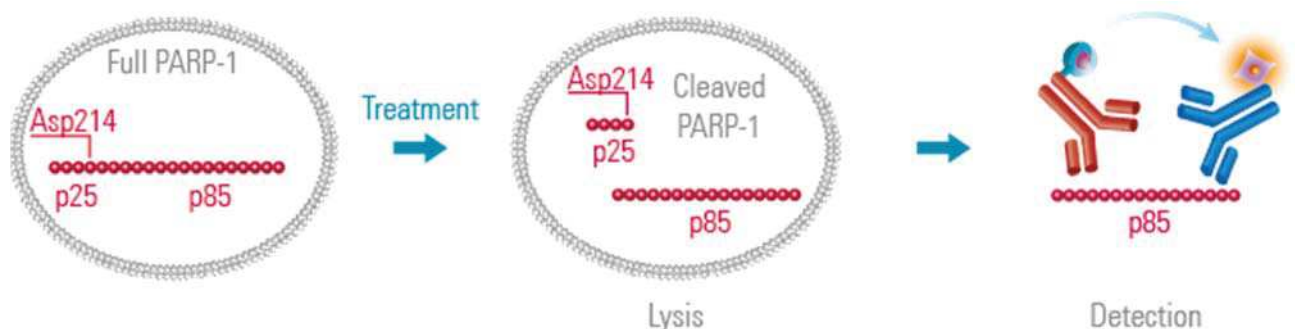


Figure 27. Modèle de la voie de signalisation déclenchée par Env.

Dans les expériences antérieures de l'équipe, l'apoptose a été analysée par le dosage de la perméabilité membranaire des cellules cibles (Iodure de Propidium), l'exposition de la phosphatidylsérine (Annexine V) en surface et le dosage de l'activité de la caspase 3 effectrice. J'ai souhaité utiliser une autre approche plus sensible et plus reproductible. J'ai ainsi utilisé la technique de HTRF (*Homogeneous Time Resolved Fluorescence*) afin de doser l'activité de la

caspase-3 en suivant le clivage d'un de ses principaux substrats, la PARP (poly(ADP-ribose) polymérase). Cette technique repose sur la technologie du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert). Le principe général est basé sur la mesure de transfert de fluorescence entre un fluorophore donneur et un accepteur, lorsqu'ils sont à proximité immédiate (Figure 28). Dans notre cas, les anticorps vont reconnaître la forme clivée de PARP1 et le signal obtenu est proportionnel au nombre de cellules qui entrent en apoptose dans notre expérience. Lorsque les voies de l'apoptose sont activées, on observe en effet un clivage de l'enzyme nucléaire PARP1 par les caspases 3 et 7. Sa forme clivée est donc un très bon marqueur de l'apoptose. Ce protocole est très répétable (les mesures sont effectuées par un lecteur de plaque équipé d'un monochromateur) et ne nécessite que peu de manipulation des échantillons. En particulier, il n'y a pas d'étapes de lavage. La mesure, très rapide, ne nécessite en outre que peu de lysat et le signal reste stable très longtemps.



**Figure 28. Principe de la détection de la PARP clivée par HTRF**

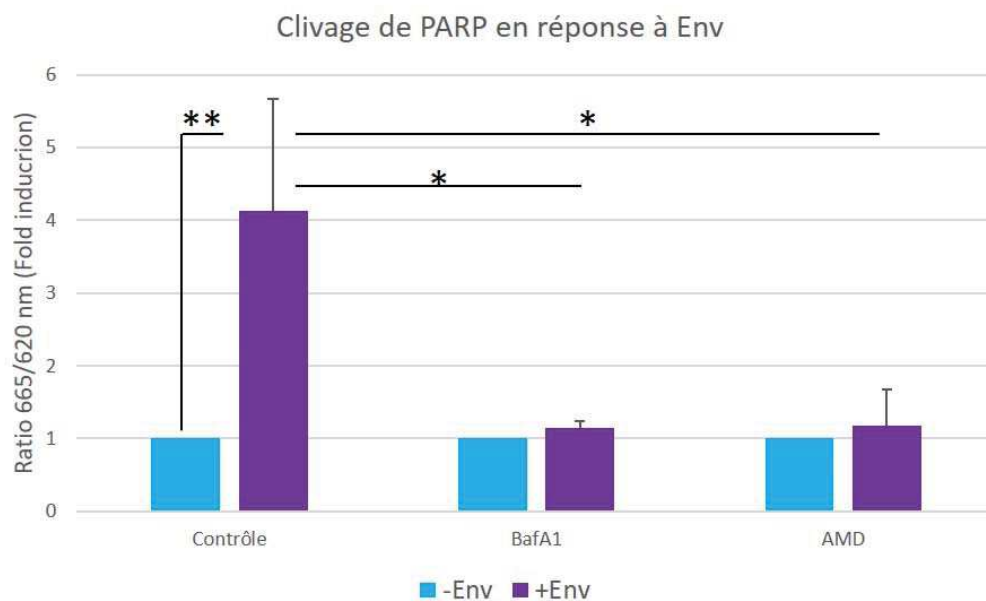
<http://www.cisbio.com/drug-discovery/cleaved-parp-asp214-cellular-assay-kit>

*Ce kit permet de mesurer rapidement la quantité de PARP1, présente sous sa forme clivée. En effet, après induction de l'apoptose, la protéine PARP est clivée par les caspases au niveau de Asp214 en 2 fragments (p25 et p85). Seul le fragment p85 est reconnu par les deux anticorps du kit. Quand ceux-ci sont à proximité l'un de l'autre (c'est-à-dire sur le même fragment de PARP), on peut exciter le donneur à l'aide d'une source lumineuse, qui va à son tour induire un signal de FRET vers l'accepteur, ce qui va se traduire par une fluorescence spécifique à 665 nm, proportionnelle à la quantité de PARP clivée.*

L'activité de la caspase 3 a été dosée après 48h de coculture (temps déjà connu pour que l'autophagie induise l'apoptose dans le cas d'une infection non productive) en présence ou en absence de différentes drogues (Modèle n°1). En effet, comme nous savons que pour induire l'apoptose dans ces cellules, l'autophagie doit être complète et dégradative, j'ai utilisé un inhibiteur d'autophagie (BafA1) et un inhibiteur de l'interaction entre la gp120 et le

corécepteur CXCR4 (AMD3100, démontrée comme inhibant l'autophagie induite par Env) afin d'empêcher la mort de ces cellules et valider notre modèle d'étude de l'apoptose.

Les résultats présentés dans la figure 29 montre que, lorsqu'on bloque l'induction de l'autophagie dans ces cellules (avec l'AMD3100), ou lorsque l'on bloque le flux autophagique lui-même (BafA1), on observe une inhibition totale du clivage de la PARP dans les cellules cibles, après contact avec Env. (Figure 29)



**Figure 29. La protéine PARP est clivée après contact avec Env**

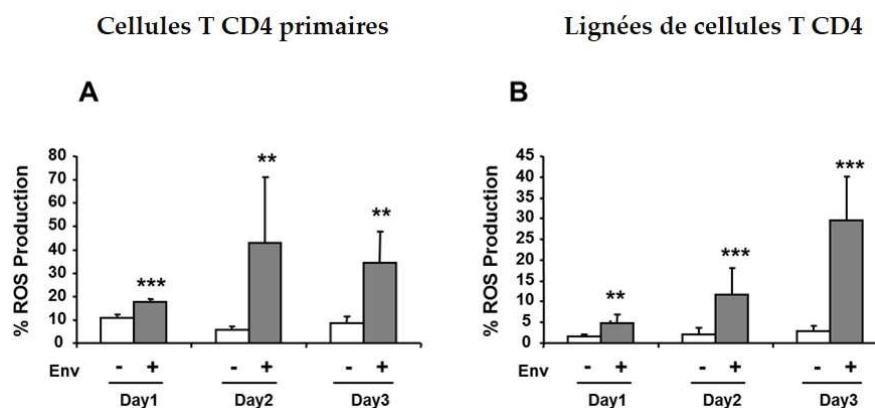
La coculture a été effectuée selon le modèle n°1 pendant 48h en présence ou en absence de BafA1 (100 nM) ou d'AMD (10 µg/mL). Les cellules cibles ont ensuite été récupérées puis lysées dans le tampon de lyse du kit. Les lysats ont ensuite été mis en présence du mélange d'anticorps et incubés 2h à température ambiante. La quantité de Parp clivée est exprimée grâce au ratio entre l'intensité d'émission à 665 nm sur l'intensité d'émission à 620 nm. Les ratios ont ensuite été normalisés à 1 par rapport au contrôle négatif.

### 3. Les ROS sont impliqués dans la mort des lymphocytes T CD4 induite par Env

#### a) Env induit la production de ROS

Des résultats obtenus par notre équipe ont montré que Env induit la modulation des niveaux d'expression de nombreuses protéines anti-oxydantes (Molina et al., 2007). L'équipe a donc analysé la production de ROS, dans des cellules T CD4 primaires issues de sang de cordon ou dans des lignées de cellules T CD4 (A2.01/CD4.403), après coculture avec des cellules

exprimant Env (modèle 1). Les cellules cibles ont été récupérées après contact avec des cellules effectrices à différents temps de coculture (1 à 3 jours). La présence de ROS a été mesurée en dosant l'oxydation de la DiHydroRhodamine 123 (DHR123) par cytométrie en flux dans les cellules cibles. On observe un fort stress oxydatif, traduit par une production élevée de ROS, dans les deux modèles de cellules T CD4 non infectées après leur interaction avec Env (Molina et al., 2007) (Figure 30).



**Figure 30. Analyse de la production de ROS intracellulaire**

*La production de ROS a été mesurée par cytométrie de flux grâce à la DHR123 :*

*- (A) dans des cellules de sang de cordon*

*- (B) dans des cellules T CD4 issues de lignées*

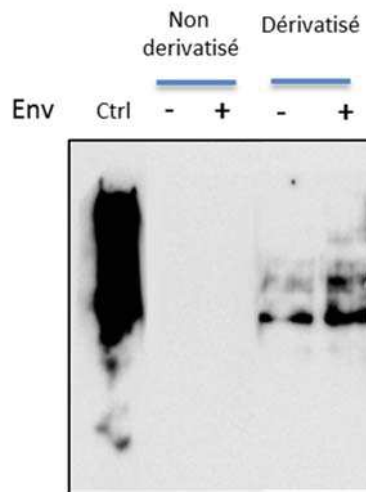
*Les cellules T ont été mises en coculture avec des cellules HEK contrôle ou exprimant Env pendant 1 – 3 jours.*

*Adapté avec la permission de John Wiley and Sons : Proteomics (Molina et al., 2007), ©2007*

b) Les protéines cellulaires totales sont oxydées en réponse à Env

Les ROS sont capables d'induire des modifications oxydatives des protéines en introduisant des groupements carbonyles au niveau des chaînes latérales des protéines. On peut donc suivre l'oxydation des protéines en quantifiant ces modifications à l'aide d'un oxyblot (kit OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit, Millipore®). Le principe de la détection des groupements carbonyles repose en effet sur leur dérivation par la 2,4 dinitrophenylhydrazine 227 (DNPH) en dinitrophenylhydrazone (DNP-hydrazone), qui est ensuite reconnue par des anticorps spécifiques. On utilise ces mêmes échantillons, mais non dérivatisés, comme un contrôle négatif : leurs groupements carbonyles ne subissent aucune transformation et ne sont pas détectables par les anticorps du kit, au contraire des échantillons traités. Afin de

mesurer l'oxydation du pool de protéines intracellulaires après contact avec Env, nous avons donc quantifié les protéines oxydées dans les cellules cibles (modèle 1) après 48h de coculture. On observe alors une augmentation de la quantité de protéines oxydées après contact avec Env (Figure 31).

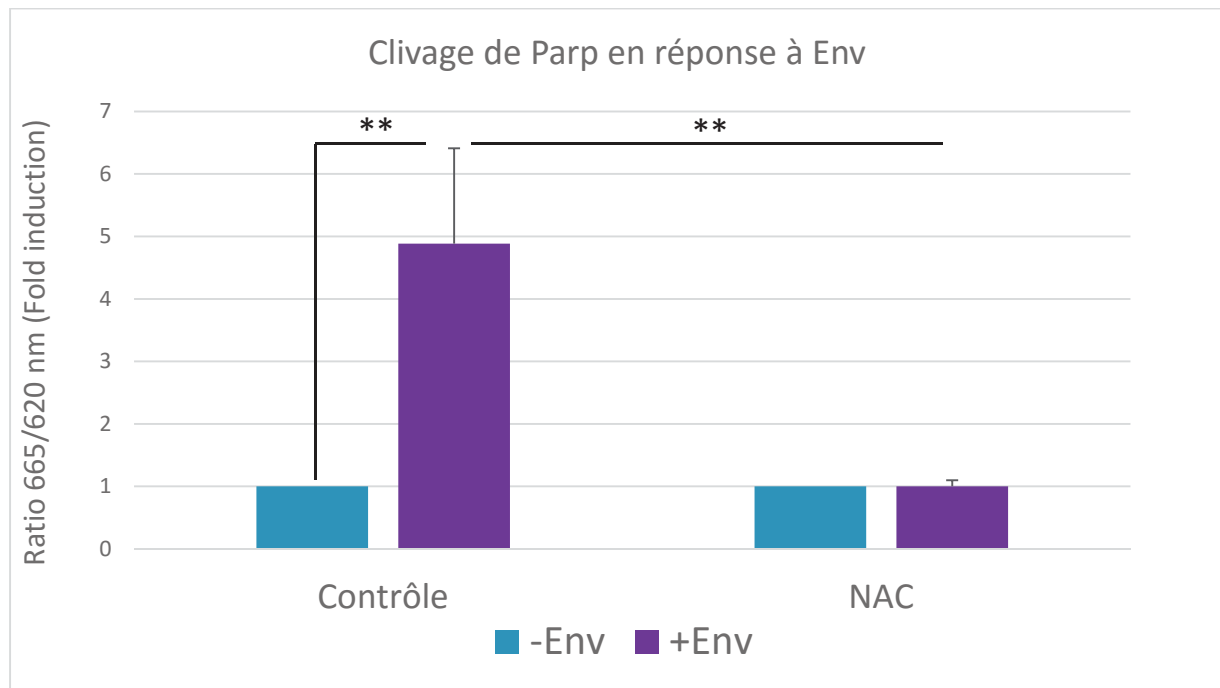


**Figure 31. Détection des protéines oxydées en réponse à Env.**

*La coculture a été effectuée selon le modèle n°1 pendant 48h. Les cellules cibles ont ensuite été récupérées puis lysées dans le tampon de lyse du kit. La quantité de protéine oxydée a été mesurée par Oxyblot, après dérivatisation ou non des lysats cellulaires (contrôle négatif).*

### c) Le blocage des ROS inhibe la mort cellulaire induite par Env

Par la suite, j'ai recherché l'implication des ROS induits dans les cellules cibles après contact avec Env dans la mort des cellules bystanders. Pour étudier le rôle des ROS dans l'induction de l'apoptose, j'ai utilisé une molécule anti-oxydante, le NAC (N-acétyl cystéine) qui a la capacité de piéger les radicaux libres de la cellule. J'ai analysé l'apoptose (clivage de la PARP) dans des cellules cibles après contact avec Env, après une coculture de 48h, en utilisant le modèle n°1. La figure 32 montre que, en présence de NAC, on observe une inhibition totale de l'apoptose induite par Env. Les ROS sont donc bien impliqués dans la mort par apoptose des cellules T CD4 non infectées en réponse à Env (Figure 32).



**Figure 32. Le NAC inhibe la mort cellulaire induite par Env**

La coculture a été effectuée selon le modèle n°1 pendant 48h en présence ou en absence de NAC (25 mM). Les cellules cibles ont ensuite été récupérées puis lysées dans le tampon de lyse du kit. Les lysats ont ensuite été mis en présence du mélange d'anticorps et incubés 2h à température ambiante. La quantité de Parp clivée est exprimée grâce au ratio entre l'intensité d'émission à 665 nm sur l'intensité d'émission à 620 nm. Les ratios ont ensuite été normalisés à 1 par rapport au contrôle négatif.

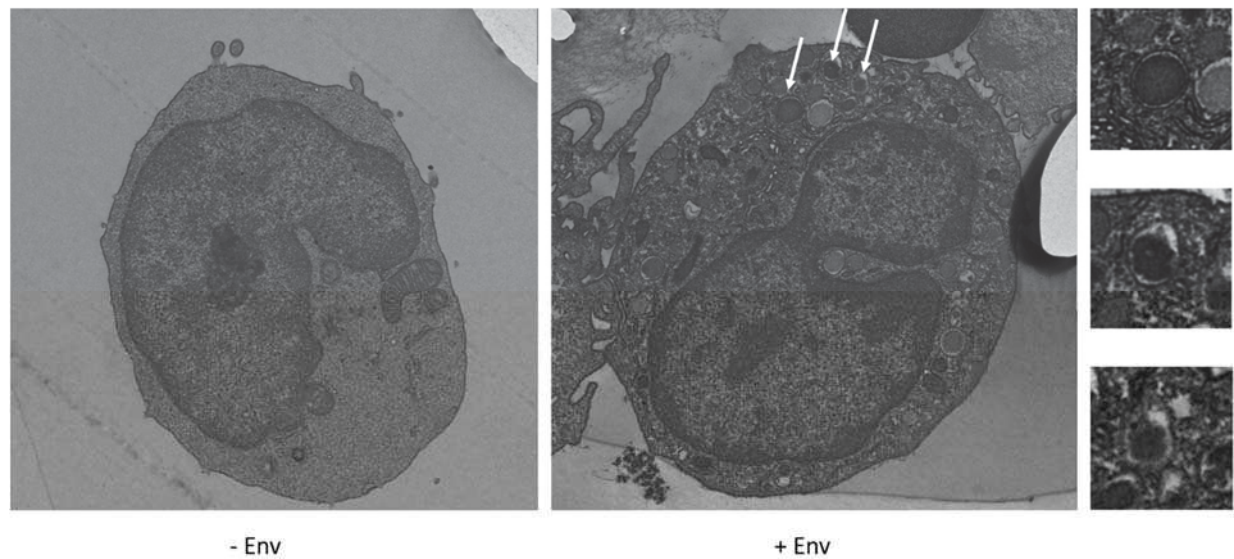
#### 4. Les peroxysomes sont adressés à l'autophagie en réponse à Env

##### a) Microscopie électronique

Nous venons de voir que les ROS sont impliqués dans la mort par apoptose des cellules T CD4 non infectées en réponse à Env. Des expériences de microscopie électronique à transmission (TEM) ont été effectuées sur des cellules T CD4 primaires, purifiées à partir de sang de cordon après coculture pendant 48h avec des cellules exprimant, ou non, Env (Modèle n°1) afin d'observer l'induction de l'autophagie induite par Env dans ces cellules cibles. Cette observation en TEM montre l'existence de structures denses aux électrons à l'intérieur de la double membrane des autophagosomes, faisant penser à des peroxysomes (Figure 33). La cellule eucaryote possède plusieurs moyens pour maintenir un état d'oxydation compatible avec la survie cellulaire. Le peroxysome est un organite qui participe entre autres à la détoxification de la cellule. L'accumulation de ROS induite par Env pourrait être due à une absence de



détoxification de la cellule. Les peroxysomes constituent alors une cible potentielle de l'autophagie.



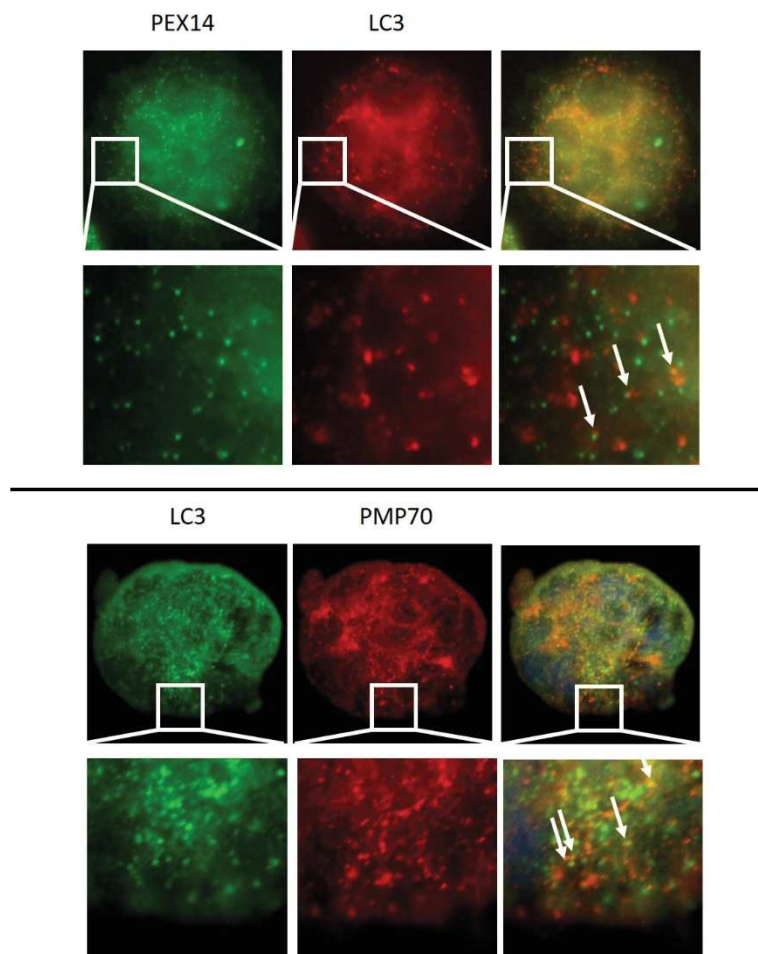
**Figure 33. Présence de certaines structures non déterminées dans les autophagosomes en TEM**

*Des cellules T CD4 ont été purifiées à partir de sang de cordon et mis en coculture avec des HEK (-Env) ou des HEK exprimant Env (+Env). Elles ont ensuite été observées en microscopie électronique à transmission.*

Pour étayer cette hypothèse, nous avons donc initié une expérience de microscopie électronique avec marquage spécifique des peroxysomes (au 3,3'-diaminobenzidine ou DAB) dans le modèle n°1.

### b) Colocalisation entre LC3 et les marqueurs des peroxysomes

Le peroxysome possède de nombreuses protéines enchâssées dans sa membrane, parmi lesquelles les peroxyns (PEX) et les protéines transmembranaires (PMP), que l'on peut donc utiliser en immunofluorescence ou en western blot pour marquer les peroxysomes. Je me suis donc aussi intéressée à la localisation des peroxysomes en microscopie à immunofluorescence afin de mettre en évidence des colocalisations potentielles entre différents marqueurs des peroxysomes et LC3 (Figure 34). Comme le montre la figure 34, on observe quelques colocalisations potentielles entre PMP70 ou PEX14 et LC3. Des analyses au microscope confocale sont actuellement en cours pour confirmer ces résultats.



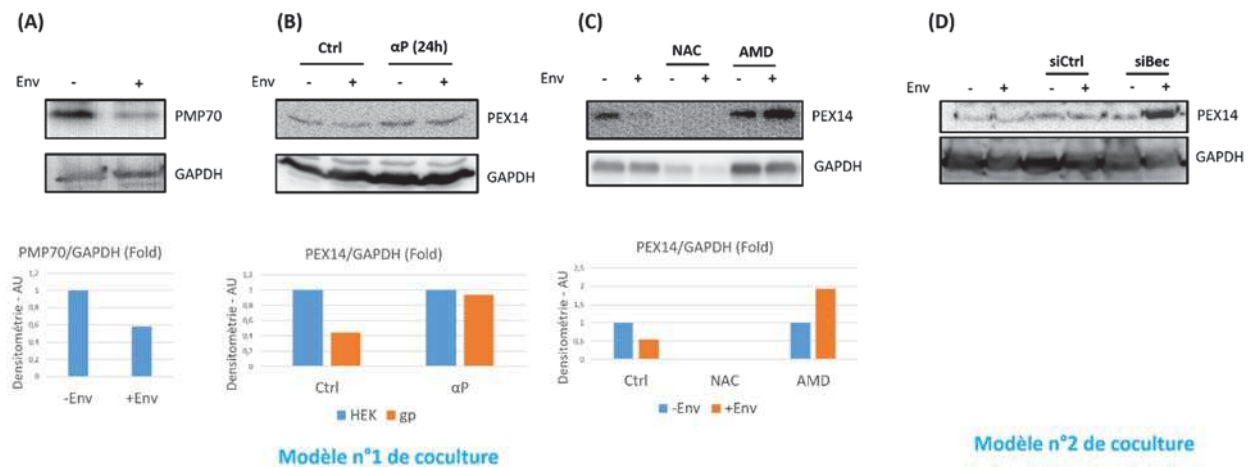
**Figure 34. Colocalisations potentielles entre PEX14/PMP70 et LC3 en immunofluorescence**

*La coculture a été effectuée selon le modèle n°1 pendant 48h. Les cellules cibles ont ensuite été récupérées puis incubées sur des lamelles de polylysine pendant 15 min à 37°C. La fixation a été effectuée en acétone/méthanol (isovolume) 5 min à -20°C. Les marquages anti LC3, anti PEX14 et anti PMP70 ont ensuite été réalisés. Toutes les cellules représentées ici ont été en contact avec Env et correspondent à des syncytia. Les flèches indiquent les colocalisations potentielles.*

c) Dégradation par autophagie des marqueurs de peroxysome en réponse à Env

Pour confirmer cette hypothèse, j'ai suivi l'expression de plusieurs marqueurs spécifiques des peroxysomes en réponse à Env dans les 2 modèles de coculture que nous possédons. J'ai ainsi pu observer une diminution des niveaux d'expression des protéines PMP70 et PEX14 dans les cellules cibles, après contact avec Env (48h de coculture), dans les deux cas. De façon intéressante, l'ajout de drogues inhibant la dégradation lysosomale ou l'utilisation d'un ARN interférent dirigé contre Beclin-1, montrent la restauration de l'expression de PEX14 (Figure 35 B et D). Le blocage de l'induction de l'autophagie par l'utilisation de l'AMD3100 semble

avoir le même effet sur les niveaux d'expression de PEX14 (Figure 35 C). Au contraire, en présence de NAC (molécule anti-oxydante), on n'observe plus de PEX14 (Figure 35 C).



**Figure 35. Quantification des niveaux d'expression de PMP70 et PEX14 après contact avec Env**

Les figures A, B et C ont été réalisées dans le modèle n°1 de coculture, et la figure D dans le modèle n°2 en présence de différentes drogues (anti-protéases, NAC, AMD3100) ou de siRNA dirigé contre Beclin-1.. Les cellules cibles ont ensuite été lysées dans du tampon Laemmli et les lysats ont été chargés sur un gel SDS-PAGE. Les niveaux d'expression de PMP70 et PEX14 ont ensuite révélés par Western Blot grâce à leurs anticorps respectifs. Les niveaux d'expression ont ensuite été quantifiés par densitométrie et normalisés par rapport au niveau d'expression de la GAPDH.

## C. Discussion

La pexophagie est un mécanisme connu d'autophagie sélective. Comme mentionné dans l'introduction, c'est une méthode de dégradation des peroxysomes qui dépend de plusieurs facteurs, à savoir : (i) une protéine du peroxysome qui permet à l'organite d'être ciblé (par exemple PEX5), (ii) l'activation de la machinerie autophagique et (iii) l'action de récepteurs de l'autophagie sélective spécifiques des peroxysomes comme NBR1 et p62

L'objectif, à terme, est donc d'identifier le ou les récepteurs de l'autophagie sélective impliqués dans cette dégradation induite par Env. En particulier, nous étudierons le rôle de NBR1 et p62 qui ont déjà été impliqués dans la dégradation des peroxysomes par autophagie (Katarzyna and Suresh, 2016). Nous réaliserons des expériences de siRNA permettant d'inhiber l'expression de p62 ou NBR1 et nous suivrons, dans ces conditions, l'expression des marqueurs des peroxysomes (PEX14, PEX5, PMP70) en réponse à une induction d'autophagie par Env. En parallèle, nous étudierons aussi la mort cellulaire afin d'établir un lien entre la

dégradation sélective des peroxysomes et l'apoptose de ces cellules T CD4 bystanders après contact avec Env.

Ensuite, nous chercherons quelle est la protéine peroxysomale qui interagit spécifiquement avec le récepteur de l'autophagie dans nos modèles de coculture. Il faut noter que PEX5 est ubiquitinée par la kinase ATM en réponse à un stress oxydatif, ce qui lui permet d'interagir avec p62 et d'induire la pexophagie. C'est donc une protéine candidate idéale et nous vérifierons son interaction avec p62/NBR1 grâce à des expériences de GST-Pull Down. Il faudra aussi vérifier si l'ubiquitination est bien impliquée, à l'aide de mutants de p62/NBR1 délétés de leurs domaines UBA et PB1. Il faudra aussi prendre en compte le fait que ces deux récepteurs sont capables de former des hétéro-dimères et donc de coopérer.

Finalement, nous étudierons l'impact de la dégradation sélective des peroxysomes après contact avec Env et la mort par apoptose des cellules T CD4. Si notre hypothèse est juste, l'inhibition de l'interaction entre le récepteur autophagique impliqué dans la pexophagie et sa protéine cible devrait diminuer voire inhiber la mort de ces cellules.

L'étude de la pexophagie dans ce modèle d'infection permettra aussi d'avancer dans la compréhension de mécanismes plus fondamentaux. En effet, bien que les peroxysomes soient des organites très importants pour l'homéostasie et la physiologie cellulaire, la pexophagie est encore très peu étudiée chez les mammifères. Malgré les travaux récents réalisés sur PEX5 et son ubiquitination sur la lysine 209 (Zhang et al., 2015), les mécanismes restent encore flous : en effet, PEX5 peut subir deux autres types d'ubiquitination qui vont, quant à elles, permettre de recycler PEX5 (Apanasets et al., 2014) ou de la cibler au protéasome (Grou et al., 2009). Si PEX5 est donc le substrat reconnu par les récepteurs de l'autophagie sélective, il faudra donc déterminer quelle ubiquitination est importante pour induire la pexophagie et savoir si d'autres signaux que les ROS sont capables de l'induire. Finalement, quelques travaux tendent à montrer que p62 et NBR1 ne seraient sans doute pas les seuls récepteurs impliqués : PEX14 pourrait être un récepteur transmembranaire comme NIX ou BNIP3 pour la mitophagie, sachant qu'il interagit directement avec LC3 (Jiang et al., 2015).

Enfin, la séquence d'événements induite par Env, conduisant à l'autophagie n'est pas encore élucidée et il serait intéressant de la déterminer avec précision. Cela permettrait de progresser

encore plus dans la compréhension des voies de signalisation conduisant à l'établissement de la phase SIDA et offrirait de nouvelles cibles thérapeutiques.

### III. Matériel et méthodes

---

#### A. Culture cellulaire

Les cellules adhérentes (HEK.293T, HEK.Env et HEK.CD4.CXCR4) ont été cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et des antibiotiques (1% de pénicilline- streptomycine et des antibiotiques de sélection), à 37°C et sous atmosphère de CO<sub>2</sub> à 5%. Les différentes lignées de cellules en suspension (A.201.CD4.403 et 8E5) sont cultivées dans les mêmes conditions en milieu RPMI.

En particulier, certaines lignées de cellules nécessitent une pression de sélection. C'est le cas des cellules HEK.Env, qui ont été cultivées avec méthotrexate (2 µM) ; des cellules HEK.CD4.CXCR4 cultivées en présence de G418 et de zéocine (respectivement 1 mg/mL et 250 µg/mL) ; et des cellules A.201.CD4.403 cultivées en présence de G418 (1 mg/mL).

Les cellules T CD4 primaires ont été isolées à partir des cellules mononuclées du sang périphérique et purifiées par une sélection négative à l'aide du kit d'isolation de CD4 (Miltenyi).

#### B. Transfection

Les cellules adhérentes ont été transfectées avec l'agent de transfection Turbofect en suivant les recommandations du fournisseur (Fermentas).

#### C. Réactifs et anticorps

L'autophagie a été induite par traitement des cellules avec de la Torine 1 (Tocris) pendant 3h (2 µM). Les anti-protéases, (E64 et pepstatine A, Sigma), ont été utilisées à une concentration de 10 µg/mL pendant 24h pour bloquer le flux autophagique. La bafilomycine A1 (BafA1) a été utilisée pendant 48h à une concentration de 100 nM. L'AMD3100 (Sigma) a été utilisé à 1µg/mL afin d'inhiber la fusion des protéines d'enveloppe à ses récepteurs. Le NAC (N-acétyl L cystéine, Sigma) est un antioxydant, que nous avons utilisé à 25 mM pendant 48h.

Les anticorps suivants ont été utilisés : l'anticorps anti-Glutathione-S-Transferase (GST) HRP (A7340, Sigma) ; l'anticorps polyclonal de lapin anti-LC3 (L7543, Sigma) ; l'anticorps monoclonal de souris anti-PMP70 (SAB4200181, Sigma) ; l'anticorps polyclonal de lapin anti-GAPDH (sc-25778, Santa Cruz) ; l'anticorps polyclonal de lapin anti-PEX14 (GTX129230, Genetex).

Les anticorps secondaires de souris ou de lapin couplés aux fluorochromes Alexa 488 et 555 ont été utilisés en immunofluorescence. Les anticorps immunoglobulines de souris et de lapin couplés HRP ont été utilisés en chimioluminescence dans les expériences de Western Blot.

### D. HTRF

La quantification de la mort cellulaire a été rendue possible grâce à la quantification de la PARP clivée par la technique HTRF (Cisbio). Les cellules cibles, après 48h de coculture avec des cellules exprimant Env, sont lysées dans le tampon de lyse du kit et incubées 30 min à température ambiante. Les lysats sont ensuite mis en présence des 2 anticorps spécifiques de la PARP clivée d'après les instructions du fournisseur. Les réactions ont été effectuées dans des plaques blanches 384 puits et le signal est mesuré à l'aide d'un appareil de lecture de la fluorescence avec monochromateur (TECAN). Les données sont ensuite exprimées sous la forme d'un ratio calculant l'intensité de fluorescence à 665 nm (émission avec transfert de fluorescence) sur celle à 620 nm (émission sans transfert), puis multipliées par un facteur 10 000 afin de manipuler plus facilement les ratios obtenus.

### E. Analyse par Western Blot

Les cellules sont récupérées après centrifugation, et le culot cellulaire est directement resuspendu dans du tampon Laemmli. Les lysats cellulaires sont alors déposés sur gel prosieve 12% ou un gel pré-coulé et transférés sur membrane PVDF (polyvinylidene). La membrane est ensuite saturée pendant 45 min, sous agitation, en présence d'un tampon de blocage (PBS-Caséine 0.5%) des sites non spécifiques. Les anticorps primaires, dilués dans la solution de blocage, sont incubés à 4°C durant toute la nuit ou 2h à température ambiante. Après trois

lavages au PBS-Tween 0,05%, on ajoute les anticorps secondaires, toujours sous agitation. Les anticorps secondaires anti-souris et anti-lapin couplés à la peroxydase sont utilisés à température ambiante pendant 1h. La membrane est ensuite rincée trois fois 10 min avec un tampon PBS-Tween 0,05%. La révélation est effectuée avec un kit ECL par chimioluminescence et à l'aide d'une caméra G-BOX (Syngene imaging system). L'intensité des bandes révélées est quantifiée par le logiciel fourni avec la caméra (Genesys de Syngene). La GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge.

### F. OxyBlot

Les protéines sont lysées puis dosées à l'aide d'un test Bradford. On utilise ensuite 50 µg à 10 µg/µL de lysats par échantillon que l'on solubilise en présence de SDS 6% et d'une solution de DNPH fournie dans le kit durant 15 min à température ambiante. La réaction est ensuite arrêtée à l'aide d'une solution de neutralisation fournie dans le kit également. Les échantillons sont ensuite dilués dans du bleu de Laemmli (mais pas chauffés) et chargés sur un gel SDS-PAGE. L'anticorps primaire (du kit) est utilisé au 1/150<sup>ème</sup> et l'anticorps secondaire au 1/300.

### G. Immunofluorescence

Lors des différentes expériences, les cellules cibles, lorsqu'elles sont adhérentes, sont cultivées sur des lamelles de verre. Au contraire, lorsqu'elles sont en suspension, les cellules cibles sont ensuite adhérentes sur des lamelles de verre recouvertes de polylysine. Après lavage au PBS, les cellules sont fixées pendant 5 min à -20°C à l'aide d'une solution d'acétone-méthanol (isovolume) puis lavées trois fois en PBS. Les anticorps primaires sont ensuite préparés en tampon de blocage (Saponine 0.1%, Sérum de veau fœtal 1%, PBS) et incubés 1h30 sur les cellules. Puis on lave les lamelles au tampon de blocage 3 fois et on incube les cellules avec les anticorps secondaires pendant 1h à l'abri de la lumière. On effectue un lavage au PBS, puis un lavage à l'eau et enfin on incube les lamelles 1 min avec une solution de DAPI pour marquer les noyaux. Après un lavage final au PBS, les lamelles sont montées sur les lames de microscope à l'aide de Prolong (Thermo).



### H. Evaluation de la production de ROS

Les cellules cibles sont récupérées et sont incubées dans du tampon HBSS en présence de 0,86 mM de Dihydrorhodamine 123 (DHR123) pendant 15 min à 37 °C. Il s'agit d'un fluorochrome lipophile sensible au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui pénètre facilement dans la cellule. Une fois dans la cellule, la DHR123 est donc oxydée par les ROS en un composé fluorescent, la rhodamine 123. La fluorescence est ensuite rapidement mesurée à 543 nm.

### I. Microscopie électronique à transmission

Après 2 jours de coculture en présence de Env, les cellules cibles (modèle 1) sont fixées dans une solution de glutaraldéhyde 2,5% en tampon phosphate 0,1M, pendant 1h à 4°C. Après lavages en tampon phosphate, les cellules subissent ensuite deux post-fixations en acide osmique 1%, puis en acide tanique 0,5%. Les échantillons sont déshydratés puis infiltrés sur un bain oxyde de propylène/epon.

### J. Statistiques

L'analyse de la variance des résultats a été effectuée après une transformation arc sinus des données lorsque les pourcentages ont été comparés. Les différences sont considérées significatives à \*P<0.05, \*\*P<0.01 et \*\*\*P<0.001.



# Discussion générale



La notion de sélectivité dans la dégradation autophagique est en plein essor, notamment dans les processus d'immunité. En effet, l'autophagie est un mécanisme de défense cellulaire à part entière, qui va cibler spécifiquement les pathogènes afin de les éliminer. L'évolution a permis aux pathogènes, viraux en particulier, de s'adapter à ce processus de défense. Les interactions entre l'autophagie et le VIH illustrent très bien cette notion et sont très complexes car elles dépendent à la fois du type cellulaire ciblé par le virus et du statut infectieux de la cellule (infection productive ou abortive). Dans les lymphocytes T CD4, qui sont la cible privilégiée du virus, l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse a montré que l'autophagie est induite par Env dans les cellules T CD4 non infectées. Lorsque l'infection devient productive, l'autophagie est alors bloquée par le virus. Par contre, les macrophages, autre population cellulaire ciblée par ce virus, ne présentent aucun signe d'autophagie en réponse à Env dans les conditions étudiées, alors qu'elle est induite dans les macrophages infectés. Le virus, dans ces cellules, utilise l'autophagie pour se répliquer et échappe à la dégradation en bloquant les étapes dégradatives du processus. Finalement, dans les cellules dendritiques, l'autophagie est rapidement inhibée par Env qui active la voie mTOR : cela va permettre au virus de limiter les réponses immunitaires activées à son encontre. De manière intéressante, on voit bien que plusieurs protéines virales sont capables de moduler l'autophagie, que ce soit pour l'induire (Env, Nef), ou l'inhiber (Env, Tat, Vif, Nef), selon le type cellulaire (Figure 36). Les relations entre l'autophagie et le VIH sont donc complexes et dépendent de chaque situation.

Les liens entre autophagie et VIH s'illustrent aussi à travers ce que l'on observe chez les patients. En effet, les patients qui parviennent à contrôler l'infection même en absence de thérapie présentent des taux élevés d'autophagie dans leurs cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) (Nardacci et al. 2014). L'autophagie pourrait donc contribuer, chez ces « contrôleurs », à limiter la réplication virale.

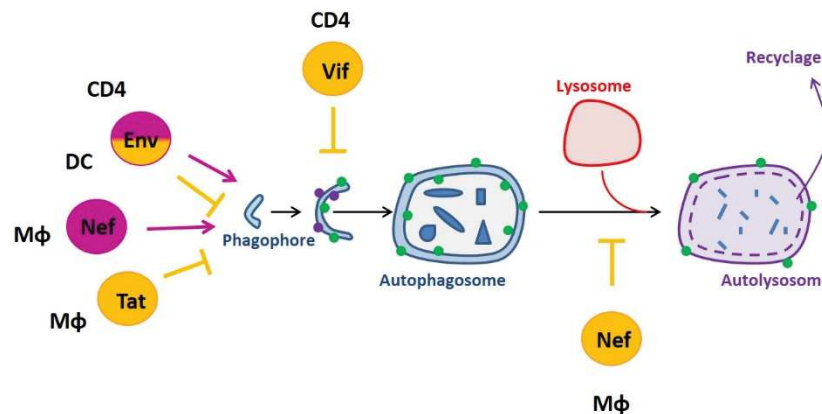


Figure 36. Effet des protéines virales sur l'autophagie

*En rose, les protéines qui induisent l'autophagie, en jaune celles qui l'inhibent.  
CD4 : lymphocytes T CD4 ; Mφ : macrophage, DC : cellule dendritique*

Lors de la première partie de ma thèse, j'ai pu montrer que la protéine virale Tat est une cible spécifique de la dégradation par autophagie via son interaction avec p62. Le VIH bloquerait donc l'autophagie dans les lymphocytes T CD4 afin d'éviter la dégradation de son unique transactivateur et d'assurer sa réplication et sa dissémination. Tat est, en effet, absolument nécessaire pour la transcription des gènes viraux et donc pour la synthèse de nouvelles particules virales. Cette dégradation de Tat est spécifique grâce à l'intervention du récepteur autophagique p62, qui est une protéine connue pour adresser spécifiquement les protéines et les organelles ubiquitinées à la dégradation par autophagie, via son interaction avec les protéines de la famille Atg8. Dans le cas du transactivateur Tat, nous avons montré que cette interaction ne dépend pas de son ubiquitination ; elle est donc médiée par un mécanisme non conventionnel. Il est important de noter que la capsid de SINV ne nécessite pas non plus d'être ubiquitinée pour être spécifiquement ciblée à la dégradation par autophagie. Il serait donc extrêmement intéressant d'élucider ce mécanisme de reconnaissance des substrats via p62, qui est indépendant de l'ubiquitine.

Les résultats préliminaires obtenus lors de la seconde partie de ma thèse montrent le rôle que l'autophagie sélective pourrait jouer sur le processus de mort cellulaire induite par Env dans les cellules T CD4 où le virus n'a pas réussi à établir une infection productive. Cet aspect est particulièrement important puisqu'on sait que la mort de ces cellules dites « non infectées » (ou bystanders), est majeure dans l'établissement de la phase SIDA. De plus, le rôle majeur de

Env dans cet effet a largement été caractérisé. Nous avons montré que Env induit également un stress oxydatif dans les cellules cibles non infectées et que ce stress est impliqué dans leur mort par apoptose. De plus, nous avons observé que plusieurs marqueurs des peroxysomes sont dégradés dans les mêmes conditions. Les peroxysomes étant des organelles chargés de détoxifier la cellule, nous avons formulé l'hypothèse que l'autophagie, induite par Env, conduit à la dégradation sélective des peroxysomes, entraînant l'accumulation d'espèces oxydées dans les cellules cibles et ainsi, leur mort par apoptose.

L'autophagie sélective aurait donc un rôle central au cours de l'infection par le VIH-1 : d'une part, dans les cellules T CD4 infectées, puisqu'elle serait capable de bloquer la réplication du virus ; d'autre part, dans les cellules non infectées, car elle participerait à la déplétion des lymphocytes T CD4 et donc à l'établissement de la phase SIDA.

Afin de progresser dans la compréhension du rôle de l'autophagie sélective au cours de l'infection par le VIH, nous avons mis au point un crible protéomique afin d'identifier les facteurs cellulaires et/ou viraux qui interagissent avec p62 et qui sont dégradés sélectivement par autophagie dans les différents contextes d'infection (résultats non montrés dans ce manuscrit car trop préliminaires). L'utilisation de différents types cellulaires pour réaliser ces cribles permettrait de connaître les profils de dégradation par autophagie dans les différentes cellules cibles du virus. Les résultats qui seront obtenus à l'issue de ces expériences permettront d'obtenir une vue d'ensemble des conséquences de l'induction d'autophagie par le VIH-1. En effet, jusqu'à présent, de nombreux travaux attestent de l'importance du processus autophagique au cours de l'infection par le VIH dans différents contextes cellulaires. Cependant, à l'exception de son rôle sur la protéine virale Tat, les cibles spécifiques de la dégradation autophagique au cours de l'infection par le VIH n'ont jamais été recherchées. Il serait intéressant, dans le contexte d'une infection productive, d'ajouter de la Torin 1 (inducteur d'autophagie), afin de restaurer l'autophagie inhibée par le virus et d'identifier les protéines qui auraient été dégradées si le virus n'avait pas bloqué ce processus antiviral. De plus, notre équipe a montré que la protéine virale Vif du VIH est un des facteurs viraux capables de bloquer l'autophagie dans les cellules T CD4, permettant ainsi la production de nouvelles particules virales. Il serait intéressant d'identifier les protéines dégradées par

autophagie au cours de l'infection par un virus délété du gène Vif. De plus, ces expériences de criblage en protéomique devraient aussi nous permettre de mettre en évidence les facteurs impliqués dans la mort par apoptose des lymphocytes T CD4 non infectés, processus majeur conduisant au SIDA. Enfin, nous savons que p62 n'est pas le seul récepteur de l'autophagie sélective. En effet, d'autres récepteurs sont eux aussi impliqués dans la virophagie (comme NDP52) et la pexophagie (comme NBR1). Il serait donc judicieux de rechercher également leurs partenaires d'interaction au cours de l'infection par le VIH.

De par son implication dans les mécanismes d'immunité innée, il ne serait pas surprenant que la modulation de l'autophagie au cours de l'infection par le VIH ait des conséquences importantes dans les processus de co-infection observés chez les patients. En France, 30 % des personnes séropositives au VIH sont co-infectés par un des virus des hépatites (HBV/HCV). Les hépatites ne sont pas les seules pathologies associées au VIH et on observe aussi beaucoup de co-infections avec différents types d'agents pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis* (bactérie), *Toxoplasma gondii* (parasite), *Candida albicans* (champignon) ou des herpesvirus (notamment CMV et HSV-1). Le blocage de l'autophagie induit par l'infection par le VIH pourrait en effet favoriser la multiplication de ces pathogènes intracellulaires.

Au-delà de leur importance dans l'infection par le VIH, l'étude des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de cette infection pourront être transposés à l'étude de l'interaction entre l'autophagie et d'autres familles de virus et permettre, à terme, de proposer de nouveaux outils thérapeutiques. L'étude de l'autophagie dans ce modèle d'infection est d'autant plus intéressante, car elle permet d'avoir plusieurs cas de figure selon le type cellulaire ciblé et le statut infectieux de la cellule. Ainsi, j'ai pu étudier le rôle de l'autophagie dans la mort cellulaire alors que ce processus est traditionnellement décrit comme cytoprotecteur. De même, l'infection par le VIH permet d'étudier plusieurs types d'autophagie sélective, parmi lesquelles la virophagie et la pexophagie, qui sont en plein essor.

Enfin, l'étude de l'autophagie sélective au cours des infections virales n'est encore que très peu caractérisée. Il serait néanmoins intéressant de rechercher les liens entre ce type d'autophagie, le stress oxydatif et l'infection par le VIH. En effet, outre la dégradation sélective de Tat via p62 (Sagnier et al., 2015), des études ont montré que Nrf2 et le stress oxydatif sont modulés par certains virus, ce qui offre un lien supplémentaire entre autophagie et infections



virales, sachant que p62 est fortement impliqué dans la voie Nrf2-Keap1 (Komatsu et al. 2010). On sait que le VIH induit un fort stress oxydatif chez les patients infectés (Pace & Leaf 1995). Plus particulièrement, il a été montré que Tat, qui est l'une des protéines capable d'induire un stress oxydatif, permettrait aussi d'augmenter l'expression et l'accumulation de Nrf2. A son tour, Nrf2 va induire la synthèse de molécules anti-oxydantes qui vont avoir un effet négatif sur la transactivation du LTR du VIH par Tat (Zhang et al. 2009). L'induction de cette réponse anti-oxydante n'est pas suffisante pour contrer le virus, néanmoins, elle offre des pistes thérapeutiques intéressantes via la modulation de ces molécules anti-oxydantes qui peuvent inhiber la transactivation du virus. p62, en séquestrant Keap1, favorise cette réponse anti-oxydante : la modulation de l'autophagie sélective permettrait donc à la fois de favoriser la dégradation de Tat et d'augmenter les réponses anti-oxydantes.

Le modèle du rôle de l'autophagie, et plus spécifiquement de l'autophagie sélective, dans l'infection par le VIH-1 est donc très important puisqu'il pourra aider à répondre à plusieurs questions concernant le rôle de l'autophagie dans des mécanismes plus fondamentaux comme la mort cellulaire, la réplication virale ou la réponse au stress oxydatif.



# Références bibliographiques



- Albini, A., Ferrini, S., Benelli, R., Sforzini, S., Giunciuglio, D., Aluigi, M.G., Proudfoot, A.E., Alouani, S., Wells, T.N., Mariani, G., Rabin, R.L., Farber, J.M., Noonan, D.M., 1998. HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13153–8.
- Alexander, A., Kim, J., Walker, C.L., 2010. ATM engages the TSC2/mTORC1 signaling node to regulate autophagy. *Autophagy* 6, 672–3. doi:10.4161/auto.6.5.12509
- Alimonti, J.B., Ball, T.B., Fowke, K.R., 2003. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J. Gen. Virol.* 84, 1649–61. doi:10.1099/vir.0.19110-0
- Amano, A., Nakagawa, I., Yoshimori, T., 2006. Autophagy in innate immunity against intracellular bacteria. *J. Biochem.* 140, 161–6. doi:10.1093/jb/mvj162
- Anderson, J.L., Hope, T.J., 2003. Recent Insights into HIV Accessory Proteins. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 5, 439–450.
- Apanasets, O., Grou, C.P., Van Veldhoven, P.P., Brees, C., Wang, B., Nordgren, M., Dodt, G., Azevedo, J.E., Fransén, M., 2014. PEX5, the shuttling import receptor for peroxisomal matrix proteins, is a redox-sensitive protein. *Traffic* 15, 94–103. doi:10.1111/tra.12129
- Arhel, N., 2010. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* 7, 96. doi:10.1186/1742-4690-7-96
- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., Ktistakis, N.T., 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 182, 685–701. doi:10.1083/jcb.200803137
- Baehrecke, E.H., 2003. Autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 10, 940–5. doi:10.1038/sj.cdd.4401280
- Bagashev, A., Sawaya, B.E., 2013. Roles and functions of HIV-1 Tat protein in the CNS: an overview. *Virol. J.* 10, 358. doi:10.1186/1743-422X-10-358
- Barboric, M., Peterlin, B.M., 2005. A new paradigm in eukaryotic biology: HIV Tat and the control of transcriptional elongation. *PLoS Biol.* 3, e76. doi:10.1371/journal.pbio.0030076
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* (80- ). 220, 868–871.
- Behrends, C., Sowa, M.E., Gygi, S.P., Harper, J.W., 2010. Network organization of the human autophagy system. *Nature* 466, 68–76. doi:10.1038/nature09204
- Bestebroer, J., V'kovski, P., Mauthe, M., Reggiori, F., 2013. Hidden behind autophagy: the unconventional roles of ATG proteins. *Traffic* 14, 1029–41. doi:10.1111/tra.12091
- Betin, V.M.S., Lane, J.D., 2009. Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J. Cell Sci.* 122, 2554–66. doi:10.1242/jcs.046250
- Biard-Piechaczyk, M., Robert-Hebmann, V., Richard, V., Roland, J., Hipskind, R.A., Devaux, C., 2000. Caspase-dependent apoptosis of cells expressing the chemokine receptor CXCR4 is induced by cell membrane-associated human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein (gp120). *Virology* 268, 329–44. doi:10.1006/viro.1999.0151
- Biard-Piechaczyk, M., Robert-Hebmann, V., Roland, J., Coudronnière, N., Devaux, C., 1999. Role of CXCR4 in HIV-1-induced apoptosis of cells with a CD4+, CXCR4+ phenotype. *Immunol. Lett.* 70, 1–3.
- Birgisdottir, Å.B., Lamark, T., Johansen, T., Birgisdottir, A.B., Lamark, T., Johansen, T., 2013. The LIR motif - crucial for selective autophagy. *J. Cell Sci.* 126, 3237–47. doi:10.1242/jcs.126128
- Björkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., Johansen, T., Björkøy, G., 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* 171, 603–614. doi:10.1083/jcb.200507002
- Blanchet, F.P., Moris, A., Nikolic, D.S., Lehmann, M., Cardinaud, S., Stalder, R., Garcia, E., Dinkins, C., Leuba, F., Wu, L., Schwartz, O., Deretic, V., Piguet, V., 2010. Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunoamphisomes in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses. *Immunity*

- 32, 654–69. doi:10.1016/j.immuni.2010.04.011
- Blanco, J., Barretina, J., Ferri, K.F., Jacotot, E., Gutiérrez, A., Armand-Ugón, M., Cabrera, C., Kroemer, G., Clotet, B., Esté, J.A., 2003. Cell-surface-expressed HIV-1 envelope induces the death of CD4 T cells during GP41-mediated hemifusion-like events. *Virology* 305, 318–29.
- Blanco, J., Barretina, J., Henson, G., Bridger, G., De Clercq, E., Clotet, B., Esté, J.A., 2000. The CXCR4 antagonist AMD3100 efficiently inhibits cell-surface-expressed human immunodeficiency virus type 1 envelope-induced apoptosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 51–6.
- Blankson, J.N., Persaud, D., Siliciano, R.F., 2002. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Med.* 53, 557–93. doi:10.1146/annurev.med.53.082901.104024
- Blumenthal, R., Durell, S., Viard, M., 2012. HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion. *J. Biol. Chem.* 287, 40841–9. doi:10.1074/jbc.R112.406272
- Borel, S., Robert-Hebmann, V., Alfaisal, J., Jain, A., Faure, M., Espert, L., Chaloin, L., Paillart, J.-C., Johansen, T., Biard-Piechaczyk, M., 2015. HIV-1 viral infectivity factor interacts with microtubule-associated protein light chain 3 and inhibits autophagy. *AIDS* 29, 275–86. doi:10.1097/QAD.0000000000000554
- Bowie, A.G., Unterholzner, L., 2008. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 911–22. doi:10.1038/nri2436
- Boya, P., Reggiori, F., Codogno, P., 2013. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol* 15, 713–720. doi:ncb2788 [pii]10.1038/ncb2788
- Brass, A.L., Dykxhoorn, D.M., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., Xavier, R.J., Lieberman, J., Elledge, S.J., 2008. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319, 921–6. doi:10.1126/science.1152725
- Briquet, S., Vaquero, C., 2002. Immunolocalization studies of an antisense protein in HIV-1-infected cells and viral particles. *Virology* 292, 177–84. doi:10.1006/viro.2001.1224
- Buckingham, E.M., Carpenter, J.E., Jackson, W., Grose, C., 2014. Autophagy and the effects of its inhibition on varicella-zoster virus glycoprotein biosynthesis and infectivity. *J. Virol.* 88, 890–902. doi:10.1128/JVI.02646-13
- Campbell, G.R., Loret, E.P., 2009. What does the structure-function relationship of the HIV-1 Tat protein teach us about developing an AIDS vaccine? *Retrovirology* 6, 50. doi:10.1186/1742-4690-6-50
- Campbell, G.R., Spector, S.A., 2012. Toll-like receptor 8 ligands activate a vitamin D mediated autophagic response that inhibits human immunodeficiency virus type 1. *PLoS Pathog.* 8, e1003017. doi:10.1371/journal.ppat.1003017
- Campbell, G.R., Spector, S.A., 2011. Hormonally active vitamin D3 (1alpha,25-dihydroxycholecalciferol) triggers autophagy in human macrophages that inhibits HIV-1 infection. *J. Biol. Chem.* 286, 18890–902. doi:10.1074/jbc.M110.206110
- Cary, D.C., Fujinaga, K., Peterlin, B.M., 2016. Molecular mechanisms of HIV latency. *J. Clin. Invest.* 1–7. doi:10.1172/JCI80565
- Cavignac, Y., Esclatine, A., 2010. Herpesviruses and autophagy: catch me if you can! *Viruses* 2, 314–33. doi:10.3390/v2010314
- Chakrabarti, A., Banerjee, S., Franchi, L., Loo, Y.-M., Gale, M., Núñez, G., Silverman, R.H., 2015. RNase L activates the NLRP3 inflammasome during viral infections. *Cell Host Microbe* 17, 466–77. doi:10.1016/j.chom.2015.02.010
- Chakrabarti, A., Ghosh, P.K., Banerjee, S., Gaughan, C., Silverman, R.H., 2012. RNase L triggers autophagy in response to viral infections. *J. Virol.* 86, 11311–21. doi:10.1128/JVI.00270-12
- Clausen, T.H., Lamark, T., Isakson, P., Finley, K., Larsen, K.B., Brech, A., Øvervatn, A., Stenmark, H., Bjørkøy, G., Simonsen, A., Johansen, T., 2010. p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy* 6, 330–44.
- Clavel, F., Guyader, M., Guétard, D., Sallé, M., Montagnier, L., Alizon, M., 1986. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* 324, 691–5. doi:10.1038/324691a0

- Clerc, I., Laverdure, S., Torresilla, C., Landry, S., Borel, S., Vargas, A., Arpin-André, C., Gay, B., Briant, L., Gross, A., Barbeau, B., Mesnard, J.-M., 2011. Polarized expression of the membrane ASP protein derived from HIV-1 antisense transcription in T cells. *Retrovirology* 8, 74. doi:10.1186/1742-4690-8-74
- Codogno, P., Mehrpour, M., Proikas-Cezanne, T., 2012. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 7–12. doi:10.1038/nrm3249
- Craigie, R., Bushman, F.D., 2012. HIV DNA integration. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006890. doi:10.1101/cshperspect.a006890
- Crawford, S.E., Hyser, J.M., Utama, B., Estes, M.K., 2012. Autophagy hijacked through viroporin-activated calcium/calmodulin-dependent kinase kinase- $\beta$  signaling is required for rotavirus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E3405–13. doi:10.1073/pnas.1216539109
- Crichton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P.R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T., Ryan, K.M., 2006. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 126, 121–34. doi:10.1016/j.cell.2006.05.034
- Cuervo, A.M., Wong, E., 2014. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* 24, 92–104. doi:10.1038/cr.2013.153
- Debaisieux, S., Rayne, F., Yezid, H., Beaumelle, B., 2012. The ins and outs of HIV-1 Tat. *Traffic* 13, 355–363. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01286.x
- Decuyper, J.-P., Parys, J.B., Bultynck, G., 2012. Regulation of the autophagic bcl-2/beclin 1 interaction. *Cells* 1, 284–312. doi:10.3390/cells1030284
- Delgado, M.A., Elmaoued, R.A., Davis, A.S., Kyei, G., Deretic, V., 2008. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J.* 27, 1110–21. doi:10.1038/emboj.2008.31
- Denizot, M., Varbanov, M., Espert, L., Robert-Hebmann, V., Sagnier, S., Garcia, E., Curriu, M., Mamoun, R., Blanco, J., Biard-Piechaczyk, M., 2008. HIV-1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells. *Autophagy* 4, 998–1008. doi:6880 [pii]
- Deosaran, E., Larsen, K.B., Hua, R., Sargent, G., Wang, Y., Kim, S., Lamark, T., Jauregui, M., Law, K., Lippincott-Schwartz, J., Brech, A., Johansen, T., Kim, P.K., 2013. NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes. *J. Cell Sci.* 126, 939–52. doi:10.1242/jcs.114819
- Deregibus, M.C., Cantaluppi, V., Doublier, S., Brizzi, M.F., Deambrosio, I., Albin, A., Camussi, G., 2002. HIV-1-Tat protein activates phosphatidylinositol 3-kinase/ AKT-dependent survival pathways in Kaposi's sarcoma cells. *J. Biol. Chem.* 277, 25195–202. doi:10.1074/jbc.M200921200
- Deretic, V., 2012. Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 21–31. doi:10.1016/j.coi.2011.10.006
- Deretic, V., 2009. Multiple regulatory and effector roles of autophagy in immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 53–62. doi:10.1016/j.coi.2009.02.002
- Deretic, V., Singh, S., Master, S., Harris, J., Roberts, E., Kyei, G., Davis, A., de Haro, S., Naylor, J., Lee, H.-H., Vergne, I., 2006. Mycobacterium tuberculosis inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cell. Microbiol.* 8, 719–27. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00705.x
- Deter, R.L., De Duve, C., 1967. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J. Cell Biol.* 33, 437–49.
- Doitsh, G., Galloway, N.L.K., Geng, X., Yang, Z., Monroe, K.M., Zepeda, O., Hunt, P.W., Hatano, H., Sowinski, S., Muñoz-Arias, I., Greene, W.C., 2014. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* 505, 509–14. doi:10.1038/nature12940
- Donahue, D.A., Kuhl, B.D., Sloan, R.D., Wainberg, M.A., 2012. The viral protein Tat can inhibit the establishment of HIV-1 latency. *J. Virol.* 86, 3253–63. doi:10.1128/JVI.06648-11
- Donia, M., McCubrey, J.A., Bendtzen, K., Nicoletti, F., 2010. Potential use of rapamycin in HIV infection. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 70, 784–93. doi:10.1111/j.1365-2125.2010.03735.x
- Eberle, J., Gürtler, L., 2012. HIV types, groups, subtypes and recombinant forms: errors in replication, selection pressure and quasispecies. *Intervirology* 55, 79–83. doi:10.1159/000331993

- Eekels, J.J., Sagnier, S., Geerts, D., Jeeninga, R.E., Biard-Piechaczyk, M., Berkhout, B., 2012. Inhibition of HIV-1 replication with stable RNAi-mediated knockdown of autophagy factors. *Virology* 9, 69. doi:10.1186/1743-422X-9-69
- Eekels, J.J.M., Geerts, D., Jeeninga, R.E., Berkhout, B., 2011. Long-term inhibition of HIV-1 replication with RNA interference against cellular co-factors. *Antiviral Res.* 89, 43–53. doi:10.1016/j.antiviral.2010.11.005
- Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., Asara, J.M., Fitzpatrick, J., Dillin, A., Viollet, B., Kundu, M., Hansen, M., Shaw, R.J., 2011. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331, 456–61. doi:10.1126/science.1196371
- English, L., Chemali, M., Duron, J., Rondeau, C., Laplante, A., Gingras, D., Alexander, D., Leib, D., Norbury, C., Lippé, R., Desjardins, M., 2009. Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat. Immunol.* 10, 480–7. doi:10.1038/ni.1720
- Espert, L., Biard-Piechaczyk, M., 2009. Autophagy in HIV-induced T cell death. *Curr Top Microbiol Immunol* 335, 307–321. doi:10.1007/978-3-642-00302-8\_15
- Espert, L., Denizot, M., Grimaldi, M., Robert-Hebmann, V., Gay, B., Varbanov, M., Codogno, P., Biard-Piechaczyk, M., 2006. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J Clin Invest* 116, 2161–2172. doi:10.1172/JCI26185
- Espert, L., Varbanov, M., Robert-Hebmann, V., Sagnier, S., Robbins, I., Sanchez, F., Lafont, V., Biard-Piechaczyk, M., 2009. Differential role of autophagy in CD4 T cells and macrophages during X4 and R5 HIV-1 infection. *PLoS One.* 4, e5787. doi:10.1371/journal.pone.0005787
- Eugenin, E.A., King, J.E., Nath, A., Calderon, T.M., Zukin, R.S., Bennett, M.V.L., Berman, J.W., 2007. HIV-tat induces formation of an LRP-PSD-95- NMDAR-nNOS complex that promotes apoptosis in neurons and astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3438–43. doi:10.1073/pnas.0611699104
- Farré, J.-C., Manjithaya, R., Mathewson, R.D., Subramani, S., 2008. PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy. *Dev. Cell* 14, 365–376. doi:10.1016/j.devcel.2007.12.011
- Fauci, A.S., 1996. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 384, 529–34. doi:10.1038/384529a0
- Faure, M., Lafont, F., 2013. Pathogen-induced autophagy signaling in innate immunity. *J. Innate Immun.* 5, 456–70. doi:10.1159/000350918
- Feng, D., Liu, L., Zhu, Y., Chen, Q., 2013. Molecular signaling toward mitophagy and its physiological significance. *Exp. Cell Res.* 319, 1697–1705. doi:10.1016/j.yexcr.2013.03.034
- Feng, Z., Zhang, H., Levine, A.J., Jin, S., 2005. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8204–9. doi:10.1073/pnas.0502857102
- Fields, J., Dumaop, W., Elueteri, S., Campos, S., Serger, E., Trejo, M., Kosberg, K., Adame, A., Spencer, B., Rockenstein, E., He, J.J., Masliah, E., Eleuteri, S., Elueteri, S., Campos, S., Serger, E., Trejo, M., Kosberg, K., Adame, A., Spencer, B., Rockenstein, E., He, J.J., Masliah, E., 2015. HIV-1 Tat Alters Neuronal Autophagy by Modulating Autophagosome Fusion to the Lysosome: Implications for HIV-Associated Neurocognitive Disorders. *J. Neurosci.* 35, 1921–38. doi:10.1523/JNEUROSCI.3207-14.2015
- Fields, J., Dumaop, W., Rockenstein, E., Mante, M., Spencer, B., Grant, I., Ellis, R., Letendre, S., Patrick, C., Adame, A., Masliah, E., 2013. Age-dependent molecular alterations in the autophagy pathway in HIVE patients and in a gp120 tg mouse model: reversal with beclin-1 gene transfer. *J. Neurovirol.* 19, 89–101. doi:10.1007/s13365-012-0145-7
- Finkel, T.H., Tudor-Williams, G., Banda, N.K., Cotton, M.F., Curiel, T., Monks, C., Baba, T.W., Ruprecht, R.M., Kupfer, A., 1995. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat. Med.* 1, 129–34.
- Frankel, A.D., Young, J.A., 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 1–25. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.1
- Gallo, R.C., 1999. Tat as one key to HIV-induced immune pathogenesis and Tat (correction of Pat) toxoid as an



- important component of a vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8324–6.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M. V, Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.-U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., Kroemer, G., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19, 107–20. doi:10.1038/cdd.2011.96
- Galonek, H.L., Hardwick, J.M., 2006. Upgrading the BCL-2 network. *Nat. Cell Biol.* 8, 1317–9. doi:10.1038/ncb1206-1317
- Gandhi, N., Saiyed, Z., Thangavel, S., Rodriguez, J., Rao, K.V.K., Nair, M.P.N., 2009. Differential effects of HIV type 1 clade B and clade C Tat protein on expression of proinflammatory and antiinflammatory cytokines by primary monocytes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 25, 691–9. doi:10.1089/aid.2008.0299
- Ganley, I.G., 2013. Autophagosome maturation and lysosomal fusion. *Essays Biochem* 55, 65–78. doi:bse0550065 [pii] 10.1042/bse0550065
- Gannagé, M., Dormann, D., Albrecht, R., Dengjel, J., Torossi, T., Rämer, P.C., Lee, M., Strowig, T., Arrey, F., Conenello, G., Pypaert, M., Andersen, J., García-Sastre, A., Münz, C., 2009. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe* 6, 367–80. doi:10.1016/j.chom.2009.09.005
- Ghezzi, S., Noonan, D.M., Aluigi, M.G., Vallanti, G., Cota, M., Benelli, R., Morini, M., Reeves, J.D., Vicenzi, E., Poli, G., Albini, A., 2000. Inhibition of CXCR4-dependent HIV-1 infection by extracellular HIV-1 Tat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 992–6. doi:10.1006/bbrc.2000.2523
- Gordy, C., He, Y.W., 2012. The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead? - PubMed - NCBI [WWW Document]. *Protein Cell*. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/pubmed/?term=The+crosstalk+between+autophagy+and+apoptosis%3A+where+does+this+lead%3F> (accessed 4.26.16).
- Gougeon, M.-L., 2005. To kill or be killed: how HIV exhausts the immune system. *Cell Death Differ.* 12 Suppl 1, 845–54. doi:10.1038/sj.cdd.4401616
- Grégoire, I.P., Richetta, C., Meyniel-Schicklin, L., Borel, S., Pradezynski, F., Diaz, O., Deloire, A., Azocar, O., Baguet, J., Le Breton, M., Mangeot, P.E., Navratil, V., Joubert, P.-E., Flacher, M., Vidalain, P.-O., André, P., Lotteau, V., Biard-Piechaczyk, M., Rabourdin-Combe, C., Faure, M., 2011. IRGM is a common target of RNA viruses that subvert the autophagy network. *PLoS Pathog.* 7, e1002422. doi:10.1371/journal.ppat.1002422
- Grou, C.P., Carvalho, A.F., Pinto, M.P., Alencastre, I.S., Rodrigues, T.A., Freitas, M.O., Francisco, T., Sá-Miranda, C., Azevedo, J.E., 2009. The peroxisomal protein import machinery—a case report of transient ubiquitination with a new flavor. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 254–62. doi:10.1007/s00018-008-8415-5
- Gutheil, W.G., Subramanyam, M., Flentke, G.R., Sanford, D.G., Munoz, E., Huber, B.T., Bachovchin, W.W., 1994. Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): a possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 6594–8.
- Hanna, R.A., Quinsay, M.N., Orogo, A.M., Giang, K., Rikka, S., Gustafsson, Å.B., 2012. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *J. Biol. Chem.* 287, 19094–104. doi:10.1074/jbc.M111.322933
- Harrich, D., Ulich, C., García-Martínez, L.F., Gaynor, R.B., 1997. Tat is required for efficient HIV-1 reverse transcription. *EMBO J.* 16, 1224–35. doi:10.1093/emboj/16.6.1224
- Harris, J., 2011. Autophagy and cytokines. *Cytokine* 56, 140–4. doi:10.1016/j.cyto.2011.08.022
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., Yamamoto, A., 2009. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.* 11, 1433–7. doi:10.1038/ncb1991
- He, C., Levine, B., 2010. The Beclin 1 interactome. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 140–9. doi:10.1016/j.ceb.2010.01.001

- Heaton, N.S., Randall, G., 2010. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe* 8, 422–32. doi:10.1016/j.chom.2010.10.006
- Honsho, M., Yamashita, S.-I., Fujiki, Y., 2015. Peroxisome homeostasis: Mechanisms of division and selective degradation of peroxisomes in mammals. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 984–91. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.09.032
- Hou, W., Han, J., Lu, C., Goldstein, L.A., Rabinowich, H., 2010. Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* 6, 891–900. doi:10.4161/auto.6.7.13038
- Huang, L., Bosch, I., Hofmann, W., Sodroski, J., Pardee, A.B., 1998. Tat protein induces human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) coreceptors and promotes infection with both macrophage-tropic and T-lymphotropic HIV-1 strains. *J. Virol.* 72, 8952–60.
- Huo, L., Li, D., Sun, X., Shi, X., Karna, P., Yang, W., Liu, M., Qiao, W., Aneja, R., Zhou, J., 2011. Regulation of Tat acetylation and transactivation activity by the microtubule-associated deacetylase HDAC6. *J Biol Chem* 286, 9280–9286. doi:M110.208884 [pii]10.1074/jbc.M110.208884
- Imam, S., Talley, S., Nelson, R.S., Dharan, A., O'Connor, C., Hope, T.J., Campbell, E.M., 2016. TRIM5 $\alpha$  Degradation via Autophagy Is Not Required for Retroviral Restriction. *J. Virol.* 90, 3400–10. doi:10.1128/JVI.03033-15
- Ito, M., Ishida, T., He, L., Tanabe, F., Rongge, Y., Miyakawa, Y., Terunuma, H., 1998. HIV type 1 Tat protein inhibits interleukin 12 production by human peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14, 845–9.
- Iwata, J., Ezaki, J., Komatsu, M., Yokota, S., Ueno, T., Tanida, I., Chiba, T., Tanaka, K., Kominami, E., 2006. Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals. *J. Biol. Chem.* 281, 4035–41. doi:10.1074/jbc.M512283200
- Jackson, W.T., Giddings, T.H., Taylor, M.P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R.R., Kirkegaard, K., 2005. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* 3, e156. doi:10.1371/journal.pbio.0030156
- Jacotot, E., Krust, B., Callebaut, C., Laurent-Crawford, A.G., Blanco, J., Hovanessian, A.G., 1997. HIV-1 envelope glycoproteins-mediated apoptosis is regulated by CD4 dependent and independent mechanisms. *Apoptosis* 2, 47–60.
- Jayappa, K.D., Ao, Z., Yao, X., 2012. The HIV-1 passage from cytoplasm to nucleus: the process involving a complex exchange between the components of HIV-1 and cellular machinery to access nucleus and successful integration. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 3, 70–85.
- Jiang, L., Hara-Kuge, S., Yamashita, S.-I., Fujiki, Y., 2015. Peroxin Pex14p is the key component for coordinated autophagic degradation of mammalian peroxisomes by direct binding to LC3-II. *Genes Cells* 20, 36–49. doi:10.1111/gtc.12198
- Jiang, S., Wells, C.D., Roach, P.J., 2011. Starch-binding domain-containing protein 1 (Stbd1) and glycogen metabolism: Identification of the Atg8 family interacting motif (AIM) in Stbd1 required for interaction with GABARAPL1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413, 420–5. doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.106
- Johansen, T., Lamark, T., 2011. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 7, 279–296.
- Johri, M.K., Mishra, R., Chhatbar, C., Unni, S.K., Singh, S.K., 2011. Tits and bits of HIV Tat protein. *Expert Opin. Biol. Ther.* 11, 269–283. doi:10.1517/14712598.2011.546339
- Joubert, P.-E., Meiffren, G., Grégoire, I.P., Pontini, G., Richetta, C., Flacher, M., Azocar, O., Vidalain, P.-O., Vidal, M., Lotteau, V., Codogno, P., Rabourdin-Combe, C., Faure, M., 2009. Autophagy induction by the pathogen receptor CD46. *Cell Host Microbe* 6, 354–66. doi:10.1016/j.chom.2009.09.006
- Joubert, P.-E., Werneke, S.W., de la Calle, C., Guivel-Benhassine, F., Giodini, A., Peduto, L., Levine, B., Schwartz, O., Lenschow, D.J., Albert, M.L., 2012. Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. *J. Exp. Med.* 209, 1029–47. doi:10.1084/jem.20110996

- Judith, D., Mostowy, S., Bourai, M., Gangneux, N., Lelek, M., Lucas-Hourani, M., Cayet, N., Jacob, Y., Prévost, M.-C., Pierre, P., Tangy, F., Zimmer, C., Vidalain, P.-O., Couderc, T., Lecuit, M., 2013. Species-specific impact of the autophagy machinery on Chikungunya virus infection. *EMBO Rep.* 14, 534–44. doi:10.1038/embor.2013.51
- Katarzyna, Z.-R., Suresh, S., 2016. Autophagic degradation of peroxisomes in mammals. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 431–40. doi:10.1042/BST20150268
- Katsuragi, Y., Ichimura, Y., Komatsu, M., 2015. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS J.* n/a–n/a. doi:10.1111/febs.13540
- Kaushik, S., Cuervo, A.M., 2012. Chaperone-mediated autophagy: A unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 22, 407–417. doi:10.1016/j.tcb.2012.05.006
- Ke, P.-Y., Chen, S.S.-L., 2011. Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J. Clin. Invest.* 121, 37–56. doi:10.1172/JCI41474
- Kemball, C.C., Alirezaei, M., Flynn, C.T., Wood, M.R., Harkins, S., Kiosses, W.B., Whitton, J.L., 2010. Coxsackievirus infection induces autophagy-like vesicles and megaphagosomes in pancreatic acinar cells in vivo. *J. Virol.* 84, 12110–24. doi:10.1128/JVI.01417-10
- Kim, P.K., Hailey, D.W., Mullen, R.T., Lippincott-Schwartz, J., 2008. Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20567–74. doi:10.1073/pnas.0810611105
- Kimura, T., Jain, A., Choi, S.W., Mandell, M.A., Schroder, K., Johansen, T., Deretic, V., 2015. TRIM-mediated precision autophagy targets cytoplasmic regulators of innate immunity. *J. Cell Biol.* doi:10.1083/jcb.201503023
- Kimura, T., Mandell, M., Deretic, V., 2016. Precision autophagy directed by receptor regulators - emerging examples within the TRIM family. *J. Cell Sci.* doi:10.1242/jcs.163758
- Kirkin, V., Lamark, T., Sou, Y.-S., Bjørkøy, G., Nunn, J.L., Bruun, J.-A., Shvets, E., McEwan, D.G., Clausen, T.H., Wild, P., Bilusic, I., Theurillat, J.-P., Øvervatn, A., Ishii, T., Elazar, Z., Komatsu, M., Dikic, I., Johansen, T., 2009. A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates. *Mol. Cell* 33, 505–516. doi:10.1016/j.molcel.2009.01.020
- Klionsky, D.J., 2007. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 931–7. doi:10.1038/nrm2245
- Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., Adhihetty, P.J., Adler, S.G., Agam, G., Agarwal, R., Aghi, M.K., Agnello, M., Agostinis, P., Aguilar, P. V., Aguirre-Ghiso, J., Airolidi, E.M., Ait-Si-Ali, S., Akematsu, T., Akporiaye, E.T., Al-Rubeai, M., Albaladejo, G.M., Albanese, C., Albani, D., Albert, M.L., Aldudo, J., Algül, H., Alirezaei, M., Alloza, I., Almasan, A., Almonte-Beceril, M., Alnemri, E.S., Alonso, C., Altan-Bonnet, N., Altieri, D.C., Alvarez, S., Alvarez-Erviti, L., Alves, S., Amadoro, G., Amano, A., Amantini, C., Ambrosio, S., Amelio, I., Amer, A.O., Amessou, M., Amon, A., An, Z., Anania, F.A., Andersen, S.U., Andley, U.P., Andreadi, C.K., Andrieu-Abadie, N., Anel, A., Ann, D.K., Anoopkumar-Dukie, S., Antoniolli, M., Aoki, H., Apostolova, N., Aquila, S., Aquilano, K., Araki, K., Arama, E., Aranda, A., Araya, J., Arcaro, A., Arias, E., Arimoto, H., Arosio, A.R., Armstrong, J.L., Arnould, T., Arsov, I., Asanuma, K., Askanas, V., Asselin, E., Atarashi, R., Atherton, S.S., Atkin, J.D., Attardi, L.D., Auberger, P., Auburger, G., Aurelian, L., Autelli, R., Avagliano, L., Avantiaggiati, M.L., Avrahami, L., Awale, S., Azad, N., Bachetti, T., Backer, J.M., Bae, D.-H., Bae, J.-S., Bae, O.-N., Bae, S.H., Baehrecke, E.H., Baek, S.-H., Baghdiguian, S., Bagniewska-Zadworna, A., Bai, H., Bai, J., Bai, X.-Y., Bailly, Y., Balaji, K.N., Balduini, W., Ballabio, A., Balzan, R., Banerjee, R., Bánhegyi, G., Bao, H., Barbeau, B., Barrachina, M.D., Barreiro, E., Bartel, B., Bartolomé, A., Bassham, D.C., Bassi, M.T., Bast, R.C., Basu, A., Batista, M.T., Batoko, H., Battino, M., Bauckman, K., Baumgarner, B.L., Bayer, K.U., Beale, R., Beaulieu, J.-F., Beck, G.R., Becker, C., Beckham, J.D., Bédard, P.-A., Bednarski, P.J., Begley, T.J., Behl, C., Behrends, C., Behrens, G.M., Behrns, K.E., Bejarano, E., Belaid, A., Belleudi, F., Bénard, G., Berchem, G., Bergamaschi, D., Bergami, M., Berkhout, B., Berliocchi, L., Bernard, A., Bernard, M., Bernassola, F., Bertolotti, A., Bess, A.S., Besteiro, S., Bettuzzi, S., Bhalla, S., Bhattacharyya, S., Bhutia, S.K., Biagosch, C., Bianchi, M.W., Biard-Piechaczyk, M., Billes, V., Bincoletto, C., Bingol, B., Bird, S.W., Bitoun, M., Bjedov, I., Blackstone, C., Blanc, L., Blanco, G.A., Blomhoff, H.K., Boada-Romero, E., Böckler, S., Boes, M., Boesze-

- Battaglia, K., Boise, L.H., Bolino, A., Boman, A., Bonaldo, P., Bordini, M., Bosch, J., Botana, L.M., Botti, J., Bou, G., Bouché, M., Bouchecareilh, M., Boucher, M.-J., Boulton, M.E., Bouret, S.G., Boya, P., Boyer-Guittaut, M., Bozhkov, P. V., Brady, N., Braga, V.M., Brancolini, C., Braus, G.H., Bravo-San Pedro, J.M., Brennan, L.A., Bresnick, E.H., Brest, P., Bridges, D., Bringer, M.-A., Brini, M., Brito, G.C., Brodin, B., Brookes, P.S., Brown, E.J., Brown, K., Broxmeyer, H.E., Bruhat, A., Brum, P.C., Brumell, J.H., Brunetti-Pierri, N., Bryson-Richardson, R.J., Buch, S., Buchan, A.M., Budak, H., Bulavin, D. V., Bultman, S.J., Bultynck, G., Bumbasirevic, V., Burelle, Y., Burke, R.E., Burmeister, M., Bütikofer, P., Caberlotto, L., Cadwell, K., Cahova, M., Cai, D., Cai, J., Cai, Q., Calatayud, S., Camougrand, N., Campanella, M., Campbell, G.R., Campbell, M., Campello, S., Candau, R., Caniggia, I., Cantoni, L., Cao, L., Caplan, A.B., Caraglia, M., Cardinali, C., Cardoso, S.M., Carew, J.S., Carleton, L.A., Carlin, C.R., Carloni, S., Carlsson, S.R., Carmona-Gutierrez, D., Carneiro, L.A., Carnevali, O., Carra, S., Carrier, A., Carroll, B., Casas, C., Casas, J., Cassinelli, G., Castets, P., Castro-Obregon, S., Cavallini, G., Ceccherini, I., Cecconi, F., Cederbaum, A.I., Ceña, V., Cenci, S., Cerella, C., Cervia, D., Cetrullo, S., Chaachouay, H., Chae, H.-J., Chagin, A.S., Chai, C.-Y., Chakrabarti, G., Chamilos, G., Chan, E.Y., Chan, M.T., Chandra, D., Chandra, P., Chang, C.-P., Chang, R.C.-C., Chang, T.Y., Chatham, J.C., Chatterjee, S., Chauhan, S., Che, Y., Cheetham, M.E., Cheluvappa, R., Chen, C.-J., Chen, G., Chen, G.-C., Chen, G., Chen, H., Chen, J.W., Chen, J.-K., Chen, M., Chen, M., Chen, P., Chen, Q., Chen, Q., Chen, S.-D., Chen, S., Chen, S.S.-L., Chen, W., Chen, W.-J., Chen, W.Q., Chen, W., Chen, X., Chen, Y.-H., Chen, Y.-G., Chen, Y., Chen, Y., Chen, Y., Chen, Y.-J., Chen, Y.-Q., Chen, Y., Chen, Z., Chen, Z., Cheng, A., Cheng, C.H., Cheng, H., Cheong, H., Cherry, S., Chesney, J., Cheung, C.H.A., Chevet, E., Chi, H.C., Chi, S.-G., Chiacchiera, F., Chiang, H.-L., Chiarelli, R., Chiariello, M., Chieppa, M., Chin, L.-S., Chiong, M., Chiu, G.N., Cho, D.-H., Cho, S.-G., Cho, W.C., Cho, Y.-Y., Cho, Y.-S., Choi, A.M., Choi, E.-J., Choi, E.-K., Choi, J., Choi, M.E., Choi, S.-I., Chou, T.-F., Chouaib, S., Choubey, D., Choubey, V., Chow, K.-C., Chowdhury, K., Chu, C.T., Chuang, T.-H., Chun, T., Chung, H., Chung, T., Chung, Y.-L., Chwae, Y.-J., Cianfanelli, V., Ciarcia, R., Ciechomska, I.A., Ciriolo, M.R., Cirone, M., Claerhout, S., Clague, M.J., Clària, J., Clarke, P.G., Clarke, R., Clementi, E., Cleyrat, C., Cnop, M., Coccia, E.M., Cocco, T., Codogno, P., Coers, J., Cohen, E.E., Colecchia, D., Coletto, L., Coll, N.S., Colucci-Guyon, E., Comincini, S., Condello, M., Cook, K.L., Coombs, G.H., Cooper, C.D., Cooper, J.M., Coppens, I., Corasaniti, M.T., Corazzari, M., Corbalan, R., Corcelle-Termeau, E., Cordero, M.D., Corral-Ramos, C., Corti, O., Cossarizza, A., Costelli, P., Costes, S., Cotman, S.L., Coto-Montes, A., Cottet, S., Couve, E., Covey, L.R., Cowart, L.A., Cox, J.S., Coxon, F.P., Coyne, C.B., Cragg, M.S., Craven, R.J., Crepaldi, T., Crespo, J.L., Criollo, A., Crippa, V., Cruz, M.T., Cuervo, A.M., Cuezva, J.M., Cui, T., Cutillas, P.R., Czaja, M.J., Czyzyk-Krzeska, M.F., Dagda, R.K., Dahmen, U., Dai, C., Dai, W., Dai, Y., Dalby, K.N., Dalla Valle, L., Dalmasso, G., D'Amelio, M., Damme, M., Darfeuille-Michaud, A., Dargemont, C., Darley-Usmar, V.M., Dasarthy, S., Dasgupta, B., Dash, S., Dass, C.R., Davey, H.M., Davids, L.M., Dávila, D., Davis, R.J., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Daza, P., de Belleruche, J., de Figueiredo, P., de Figueiredo, R.C.B.Q., de la Fuente, J., De Martino, L., De Matteis, A., De Meyer, G.R., De Milito, A., De Santi, M., de Souza, W., De Tata, V., De Zio, D., Debnath, J., Dechant, R., Decuypere, J.-P., Deegan, S., Dehay, B., Del Bello, B., Del Re, D.P., Delage-Mourroux, R., Delbridge, L.M., Deldicque, L., Delorme-Axford, E., Deng, Y., Dengjel, J., Denizot, M., Dent, P., Der, C.J., Deretic, V., Derrien, B., Deutsch, E., Devarenne, T.P., Devenish, R.J., Di Bartolomeo, S., Di Daniele, N., Di Domenico, F., Di Nardo, A., Di Paola, S., Di Pietro, A., Di Renzo, L., DiAntonio, A., Díaz-Araya, G., Díaz-Laviada, I., Díaz-Meco, M.T., Díaz-Nido, J., Dickey, C.A., Dickson, R.C., Diederich, M., Digard, P., Dikic, I., Dinesh-Kumar, S.P., Ding, C., Ding, W.-X., Ding, Z., Dini, L., Distler, J.H., Diwan, A., Djavaheri-Mergny, M., Dmytruk, K., Dobson, R.C., Doetsch, V., Dokladny, K., Dokudovskaya, S., Donadelli, M., Dong, X.C., Dong, X., Dong, Z., Donohue, T.M., Doran, K.S., D'Orazi, G., Dorn, G.W., Dosenko, V., Dridi, S., Drucker, L., Du, J., Du, L.-L., Du, L., du Toit, A., Dua, P., Duan, L., Duann, P., Dubey, V.K., Duchon, M.R., Duchosal, M.A., Duez, H., Dugail, I., Dumit, V.I., Duncan, M.C., Dunlop, E.A., Dunn, W.A., Dupont, N., Dupuis, L., Durán, R. V., Durcan, T.M., Duvezin-Caubet, S., Duvvuri, U., Eapen, V., Ebrahimi-Fakhari, D., Echard, A., Eckhart, L., Edelstein, C.L., Edinger, A.L., Eichinger, L., Eisenberg, T., Eisenberg-Lerner, A., Eissa, N.T., El-Deiry, W.S., El-Khoury, V., Elazar, Z., Eldar-Finkelman, H., Elliott, C.J., Emanuele, E., Emmenegger, U., Engedal, N., Engelbrecht, A.-M., Engeler, S., Enserink, J.M., Erdmann, R., Erenpreisa, J., Eri, R., Eriksen, J.L., Erman, A., Escalante, R., Eskelinen, E.-L., Espert, L., Esteban-Martínez, L., Evans, T.J., Fabri, M., Fabrias, G., Fabrizi, C., Facchiano, A., Færgeman, N.J., Faggioni, A., Fairlie, W.D., Fan, C., Fan, D., Fan, J., Fang, S., Fanto, M., Fanzani, A., Farkas, T., Faure, M., Favier, F.B., Fearnhead, H., Federici, M., Fei, E., Felizardo, T.C., Feng, H., Feng, Y., Feng, Y., Ferguson, T.A., Fernández, Á.F., Fernandez-Barrena, M.G., Fernandez-Checa, J.C., Fernández-López, A., Fernandez-Zapico, M.E., Feron, O., Ferraro, E., Ferreira-Halder, C.V., Fesus, L., Feuer, R., Fiesel, F.C., Filippi-Chiela, E.C., Filomeni, G., Fimia, G.M., Fingert, J.H., Finkbeiner, S., Finkel, T., Fiorito, F., Fisher, P.B., Flajolet, M., Flamigni, F., Florey, O., Florio, S., Floto, R.A., Folini, M., Folio, C., Fon, E.A., Fornai, F., Fortunato, F., Fraldi, A., Franco, R., Francois, A., François, A.,

- Frankel, L.B., Fraser, I.D., Frey, N., Freyssenet, D.G., Frezza, C., Friedman, S.L., Frigo, D.E., Fu, D., Fuentes, J.M., Fueyo, J., Fujitani, Y., Fujiwara, Y., Fujiya, M., Fukuda, M., Fulda, S., Fusco, C., Gabryel, B., Gaestel, M., Gailly, P., Gajewska, M., Galadari, S., Galili, G., Galindo, I., Galindo, M.F., Galliciotti, G., Galluzzi, L., Galluzzi, L., Galy, V., Gammoh, N., Gandy, S., Ganesan, A.K., Ganesan, S., Ganley, I.G., Gannagé, M., Gao, F.-B., Gao, F., Gao, J.-X., García Nannig, L., García Vescovi, E., Garcia-Macía, M., Garcia-Ruiz, C., Garg, A.D., Garg, P.K., Gargini, R., Gassen, N.C., Gatica, D., Gatti, E., Gavard, J., Gavathiotis, E., Ge, L., Ge, P., Ge, S., Gean, P.-W., Gelmetti, V., Genazzani, A.A., Geng, J., Genschik, P., Gerner, L., Gestwicki, J.E., Gewirtz, D.A., Ghavami, S., Ghigo, E., Ghosh, D., Giammarioli, A.M., Giampieri, F., Giampietri, C., Giatromanolaki, A., Gibbings, D.J., Gibellini, L., Gibson, S.B., Ginot, V., Giordano, A., Giorgini, F., Giovannetti, E., Girardin, S.E., Gispert, S., Giuliano, S., Gladson, C.L., Glavic, A., Gleave, M., Godefroy, N., Gogal, R.M., Gokulan, K., Goldman, G.H., Goletti, D., Goligorsky, M.S., Gomes, A. V., Gomes, L.C., Gomez, H., Gomez-Manzano, C., Gómez-Sánchez, R., Gonçalves, D.A., Goncu, E., Gong, Q., Gongora, C., Gonzalez, C.B., Gonzalez-Alegre, P., Gonzalez-Cabo, P., González-Polo, R.A., Goping, I.S., Gorbea, C., Gorbunov, N. V., Goring, D.R., Gorman, A.M., Gorski, S.M., Goruppi, S., Goto-Yamada, S., Gotor, C., Gottlieb, R.A., Gozes, I., Gozuacik, D., Graba, Y., Graef, M., Granato, G.E., Grant, G.D., Grant, S., Gravina, G.L., Green, D.R., Greenhough, A., Greenwood, M.T., Grimaldi, B., Gros, F., Grose, C., Groulx, J.-F., Gruber, F., Grumati, P., Grune, T., Guan, J.-L., Guan, K.-L., Guerra, B., Guillen, C., Gulshan, K., Gunst, J., Guo, C., Guo, L., Guo, M., Guo, W., Guo, X.-G., Gust, A.A., Gustafsson, Å.B., Gutierrez, E., Gutierrez, M.G., Gwak, H.-S., Haas, A., Haber, J.E., Hadano, S., Hagedorn, M., Hahn, D.R., Halayko, A.J., Hamacher-Brady, A., Hamada, K., Hamai, A., Hamann, A., Hamasaki, M., Hamer, I., Hamid, Q., Hammond, E.M., Han, F., Han, W., Handa, J.T., Hanover, J.A., Hansen, M., Harada, M., Harhaji-Trajkovic, L., Harper, J.W., Harrath, A.H., Harris, A.L., Harris, J., Hasler, U., Hasselblatt, P., Hasui, K., Hawley, R.G., Hawley, T.S., He, C., He, C.Y., He, F., He, G., He, R.-R., He, X.-H., He, Y.-W., He, Y.-Y., Heath, J.K., Hébert, M.-J., Heinzen, R.A., Helgason, G.V., Hensel, M., Henske, E.P., Her, C., Herman, P.K., Hernández, A., Hernandez, C., Hernández-Tiedra, S., Hetz, C., Hiesinger, P.R., Higaki, K., Hilfiker, S., Hill, B.G., Hill, J.A., Hill, W.D., Hino, K., Hofius, D., Hofman, P., Höglinger, G.U., Höhfeld, J., Holz, M.K., Hong, Y., Hood, D.A., Hoozemans, J.J., Hoppe, T., Hsu, C., Hsu, C.-Y., Hsu, L.-C., Hu, D., Hu, G., Hu, H.-M., Hu, H., Hu, M.C., Hu, Y.-C., Hu, Z.-W., Hua, F., Hua, Y., Huang, C., Huang, H.-L., Huang, K.-H., Huang, K.-Y., Huang, S., Huang, S., Huang, W.-P., Huang, Y.-R., Huang, Y., Huang, Y., Huber, T.B., Huebbe, P., Huh, W.-K., Hulmi, J.J., Hur, G.M., Hurley, J.H., Husak, Z., Hussain, S.N., Hussain, S., Hwang, J.J., Hwang, S., Hwang, T.I., Ichihara, A., Imai, Y., Imbriano, C., Inomata, M., Into, T., Iovane, V., Iovanna, J.L., Iozzo, R. V., Ip, N.Y., Irazoqui, J.E., Iribarren, P., Isaka, Y., Isakovic, A.J., Ischiropoulos, H., Isenberg, J.S., Ishaq, M., Ishida, H., Ishii, I., Ishmael, J.E., Isidoro, C., Isobe, K.-I., Isono, E., Issazadeh-Navikas, S., Itahana, K., Itakura, E., Ivanov, A.I., Iyer, A.K. V., Izquierdo, J.M., Izumi, Y., Izzo, V., Jäättelä, M., Jaber, N., Jackson, D.J., Jackson, W.T., Jacob, T.G., Jacques, T.S., Jagannath, C., Jain, A., Jana, N.R., Jang, B.K., Jani, A., Janji, B., Jannig, P.R., Jansson, P.J., Jean, S., Jendrach, M., Jeon, J.-H., Jessen, N., Jeung, E.-B., Jia, K., Jia, L., Jiang, H., Jiang, H., Jiang, L., Jiang, T., Jiang, X., Jiang, X., Jiang, Y., Jiang, Y., Jiménez, A., Jin, C., Jin, H., Jin, L., Jin, M., Jin, S., Jinwal, U.K., Jo, E.-K., Johansen, T., Johnson, D.E., Johnson, G.V., Johnson, J.D., Jonasch, E., Jones, C., Joosten, L.A., Jordan, J., Joseph, A.-M., Joseph, B., Joubert, A.M., Ju, D., Ju, J., Juan, H.-F., Juenemann, K., Juhász, G., Jung, H.S., Jung, J.U., Jung, Y.-K., Jungbluth, H., Justice, M.J., Jutten, B., Kaakoush, N.O., Kaarniranta, K., Kaasik, A., Kabuta, T., Kaeffer, B., Kågedal, K., Kahana, A., Kajimura, S., Kakhlon, O., Kalia, M., Kalvakolanu, D. V., Kamada, Y., Kambas, K., Kaminsky, V.O., Kampinga, H.H., Kandouz, M., Kang, C., Kang, R., Kang, T.-C., Kanki, T., Kanneganti, T.-D., Kanno, H., Kanthasamy, A.G., Kantorow, M., Kaparakis-Liaskos, M., Kapuy, O., Karantza, V., Karim, M.R., Karmakar, P., Kaser, A., Kaushik, S., Kawula, T., Kaynar, A.M., Ke, P.-Y., Ke, Z.-J., Kehrl, J.H., Keller, K.E., Kemper, J.K., Kenworthy, A.K., Kepp, O., Kern, A., Kesari, S., Kessel, D., Ketteler, R., Kettelhut, I. do C., Khambu, B., Khan, M.M., Khandelwal, V.K., Khare, S., Kiang, J.G., Kiger, A.A., Kihara, A., Kim, A.L., Kim, C.H., Kim, D.R., Kim, D.-H., Kim, E.K., Kim, H.Y., Kim, H.-R., Kim, J.-S., Kim, J.H., Kim, J.C., Kim, J.H., Kim, K.W., Kim, M.D., Kim, M.-M., Kim, P.K., Kim, S.W., Kim, S.-Y., Kim, Y.-S., Kim, Y., Kimchi, A., Kimmelman, A.C., Kimura, T., King, J.S., Kirkegaard, K., Kirkin, V., Kirshenbaum, L.A., Kishi, S., Kitajima, Y., Kitamoto, K., Kitaoka, Y., Kitazato, K., Kley, R.A., Klimecki, W.T., Klinkenberg, M., Klucken, J., Knævelsrud, H., Knecht, E., Knuppertz, L., Ko, J.-L., Kobayashi, S., Koch, J.C., Koehlin-Ramonatxo, C., Koenig, U., Koh, Y.H., Köhler, K., Kohlwein, S.D., Koike, M., Komatsu, M., Kominami, E., Kong, D., Kong, H.J., Konstantakou, E.G., Kopp, B.T., Korcsmaros, T., Korhonen, L., Korolchuk, V.I., Koshkina, N. V., Kou, Y., Koukourakis, M.I., Koumenis, C., Kovács, A.L., Kovács, T., Kovacs, W.J., Koya, D., Kraft, C., Krainc, D., Kramer, H., Kravic-Steovic, T., Krek, W., Kretz-Remy, C., Krick, R., Krishnamurthy, M., Kriston-Vizi, J., Kroemer, G., Kruer, M.C., Kruger, R., Ktistakis, N.T., Kuchitsu, K., Kuhn, C., Kumar, A.P., Kumar, A., Kumar, A., Kumar, D., Kumar, D., Kumar, R., Kumar, S., Kundu, M., Kung, H.-J., Kuno, A., Kuo, S.-H., Kuret, J., Kurz, T., Kwok, T., Kwon, T.K., Kwon, Y.T., Kyrnizi, I., La Spada, A.R., Lafont, F., Lahm, T.,



- Lakkaraju, A., Lam, T., Lamark, T., Lancel, S., Landowski, T.H., Lane, D.J., Lane, J.D., Lanzi, C., Lapaquette, P., Lapierre, L.R., Laporte, J., Laukkanen, J., Laurie, G.W., Lavandero, S., Lavie, L., LaVoie, M.J., Law, B.Y.K., Law, H.K.-W., Law, K.B., Layfield, R., Lazo, P.A., Le Cam, L., Le Roch, K.G., Le Stunff, H., Leardkamolkarn, V., Lecuit, M., Lee, B.-H., Lee, C.-H., Lee, E.F., Lee, G.M., Lee, H.-J., Lee, H., Lee, J.K., Lee, J., Lee, J.-H., Lee, J.H., Lee, M., Lee, M.-S., Lee, P.J., Lee, S.W., Lee, S.-J., Lee, S.-J., Lee, S.Y., Lee, S.H., Lee, S.S., Lee, S.-J., Lee, S., Lee, Y.-R., Lee, Y.J., Lee, Y.H., Leeuwenburgh, C., Lefort, S., Legouis, R., Lei, J., Lei, Q.-Y., Leib, D.A., Leibowitz, G., Lekli, I., Lemaire, S.D., Lemasters, J.J., Lemberg, M.K., Lemoine, A., Leng, S., Lenz, G., Lenzi, P., Lerman, L.O., Lettieri Barbato, D., Leu, J.I.-J., Leung, H.Y., Levine, B., Lewis, P.A., Lezoualc'h, F., Li, C., Li, F., Li, F.-J., Li, J., Li, K., Li, L., Li, M., Li, Q., Li, R., Li, S., Li, W., Li, X., Li, Y., Lian, J., Liang, C., Liang, Q., Liao, Y., Liberal, J., Liberski, P.P., Lie, P., Lieberman, A.P., Lim, H.J., Lim, K.-L., Lim, K., Lima, R.T., Lin, C.-S., Lin, C.-F., Lin, F., Lin, F., Lin, F.-C., Lin, K., Lin, K.-H., Lin, P.-H., Lin, T., Lin, W.-W., Lin, Y.-S., Lin, Y., Linden, R., Lindholm, D., Lindqvist, L.M., Lingor, P., Linkermann, A., Liotta, L.A., Lipinski, M.M., Lira, V.A., Lisanti, M.P., Liton, P.B., Liu, B., Liu, C., Liu, C.-F., Liu, F., Liu, H.-J., Liu, J., Liu, J.-J., Liu, J.-L., Liu, K., Liu, L., Liu, L., Liu, Q., Liu, R.-Y., Liu, S., Liu, S., Liu, W., Liu, X.-D., Liu, X., Liu, X.-H., Liu, X., Liu, X., Liu, X., Liu, Y., Liu, Y., Liu, Z., Liu, Z., Liuzzi, J.P., Lizard, G., Ljubic, M., Lodhi, I.J., Logue, S.E., Lokeshwar, B.L., Long, Y.C., Lonial, S., Loos, B., López-Otín, C., López-Vicario, C., Lorente, M., Lorenzi, P.L., Lőrincz, P., Los, M., Lotze, M.T., Lovat, P.E., Lu, B., Lu, B., Lu, J., Lu, Q., Lu, S.-M., Lu, S., Lu, Y., Luciano, F., Luckhart, S., Lucocq, J.M., Ludovico, P., Lugea, A., Lukacs, N.W., Lum, J.J., Lund, A.H., Luo, H., Luo, J., Luo, S., Luparello, C., Lyons, T., Ma, J., Ma, Y., Ma, Y., Ma, Z., Machado, J., Machado-Santelli, G.M., Macian, F., MacIntosh, G.C., MacKeigan, J.P., Macleod, K.F., MacMicking, J.D., MacMillan-Crow, L.A., Madeo, F., Madesh, M., Madrigal-Matute, J., Maeda, A., Maeda, T., Maegawa, G., Maellaro, E., Maes, H., Magariños, M., Maiese, K., Maiti, T.K., Maiuri, L., Maiuri, M.C., Maki, C.G., Malli, R., Malorni, W., Maloyan, A., Mami-Chouaib, F., Man, N., Mancias, J.D., Mandelkow, E.-M., Mandell, M.A., Manfredi, A.A., Manié, S.N., Manzoni, C., Mao, K., Mao, Z., Mao, Z.-W., Marambaud, P., Marconi, A.M., Marelja, Z., Marfe, G., Margeta, M., Margittai, E., Mari, M., Mariani, F. V., Marin, C., Marinelli, S., Mariño, G., Markovic, I., Marquez, R., Martelli, A.M., Martens, S., Martin, K.R., Martin, S.J., Martin, S., Martin-Acebes, M.A., Martín-Sanz, P., Martinand-Mari, C., Martinet, W., Martinez, J., Martinez-Lopez, N., Martinez-Outschoorn, U., Martínez-Velázquez, M., Martinez-Vicente, M., Martins, W.K., Mashima, H., Mastrianni, J.A., Matarese, G., Matarrese, P., Mateo, R., Matoba, S., Matsumoto, N., Matsushita, T., Matsuura, A., Matsuzawa, T., Mattson, M.P., Matus, S., Maugeri, N., Mauvezin, C., Mayer, A., Maysinger, D., Mazzolini, G.D., McBrayer, M.K., McCall, K., McCormick, C., McInerney, G.M., McIver, S.C., McKenna, S., McMahon, J.J., McNeish, I.A., Mechta-Grigoriou, F., Medema, J.P., Medina, D.L., Megyeri, K., Mehrpour, M., Mehta, J.L., Mei, Y., Meier, U.-C., Meijer, A.J., Meléndez, A., Melino, G., Melino, S., de Melo, E.J.T., Mena, M.A., Meneghini, M.D., Menendez, J.A., Menezes, R., Meng, L., Meng, L.-H., Meng, S., Menghini, R., Menko, A.S., Menna-Barreto, R.F., Menon, M.B., Meraz-Ríos, M.A., Merla, G., Merlini, L., Merlot, A.M., Meryk, A., Meschini, S., Meyer, J.N., Mi, M.-T., Miao, C.-Y., Micale, L., Michaeli, S., Michiels, C., Migliaccio, A.R., Mihailidou, A.S., Mijaljica, D., Mikoshiba, K., Milan, E., Miller-Fleming, L., Mills, G.B., Mills, I.G., Minakaki, G., Minassian, B.A., Ming, X.-F., Minibayeva, F., Minina, E.A., Minter, J.D., Minucci, S., Miranda-Vizueté, A., Mitchell, C.H., Miyamoto, S., Miyazawa, K., Mizushima, N., Mnich, K., Mograbi, B., Mohseni, S., Moita, L.F., Molinari, M., Molinari, M., Møller, A.B., Mollereau, B., Mollinedo, F., Mongillo, M., Monick, M.M., Montagnaro, S., Montell, C., Moore, D.J., Moore, M.N., Mora-Rodriguez, R., Moreira, P.I., Morel, E., Morelli, M.B., Moreno, S., Morgan, M.J., Moris, A., Moriyasu, Y., Morrison, J.L., Morrison, L.A., Morselli, E., Moscat, J., Moseley, P.L., Mostowy, S., Motori, E., Mottet, D., Mottram, J.C., Moussa, C.E.-H., Mpakou, V.E., Mukhtar, H., Mulcahy Levy, J.M., Muller, S., Muñoz-Moreno, R., Muñoz-Pinedo, C., Münz, C., Murphy, M.E., Murray, J.T., Murthy, A., Mysorekar, I.U., Nabi, I.R., Nabissi, M., Nader, G.A., Nagahara, Y., Nagai, Y., Nagata, K., Nagelkerke, A., Nagy, P., Naidu, S.R., Nair, S., Nakano, H., Nakatogawa, H., Nanjundan, M., Napolitano, G., Naqvi, N.I., Nardacci, R., Narendra, D.P., Narita, M., Nascimbeni, A.C., Natarajan, R., Navegantes, L.C., Nawrocki, S.T., Nazarko, T.Y., Nazarko, V.Y., Neill, T., Neri, L.M., Netea, M.G., Netea-Maier, R.T., Neves, B.M., Ney, P.A., Nezis, I.P., Nguyen, H.T., Nguyen, H.P., Nicot, A.-S., Nilsen, H., Nilsson, P., Nishimura, M., Nishino, I., Niso-Santano, M., Niu, H., Nixon, R.A., Njar, V.C., Noda, T., Noegel, A.A., Nolte, E.M., Norberg, E., Norga, K.K., Noureini, S.K., Notomi, S., Notterpek, L., Nowikovsky, K., Nukina, N., Nürnberger, T., O'Donnell, V.B., O'Donovan, T., O'Dwyer, P.J., Oehme, I., Oeste, C.L., Ogawa, M., Ogretmen, B., Ogura, Y., Oh, Y.J., Ohmuraya, M., Ohshima, T., Ojha, R., Okamoto, K., Okazaki, T., Oliver, F.J., Ollinger, K., Olsson, S., Orban, D.P., Ordóñez, P., Orhon, I., Orosz, L., O'Rourke, E.J., Orozco, H., Ortega, A.L., Ortona, E., Osellame, L.D., Oshima, J., Oshima, S., Osiewacz, H.D., Otomo, T., Otsu, K., Ou, J.-H.J., Outeiro, T.F., Ouyang, D.-Y., Ouyang, H., Overholtzer, M., Ozburn, M.A., Ozdinler, P.H., Ozpolat, B., Pacelli, C., Paganetti, P., Page, G., Pages, G., Pagnini, U., Pajak, B., Pak, S.C., Pakos-Zebrucka, K., Pakpour,

- N., Palková, Z., Palladino, F., Pallauf, K., Pallet, N., Palmieri, M., Paludan, S.R., Palumbo, C., Palumbo, S., Pampliega, O., Pan, H., Pan, W., Panaretakis, T., Pandey, A., Pantazopoulou, A., Papackova, Z., Papademetrio, D.L., Papassideri, I., Papini, A., Parajuli, N., Pardo, J., Parekh, V. V., Parenti, G., Park, J.-I., Park, J., Park, O.K., Parker, R., Parlato, R., Parys, J.B., Parzych, K.R., Pasquet, J.-M., Pasquier, B., Pasumarthi, K.B., Patschan, D., Patterson, C., Pattingre, S., Pattison, S., Pause, A., Pavenstädt, H., Pavone, F., Pedrozo, Z., Peña, F.J., Peñalva, M.A., Pende, M., Peng, J., Penna, F., Penninger, J.M., Pensalfini, A., Pepe, S., Pereira, G.J., Pereira, P.C., Pérez-de la Cruz, V., Pérez-Pérez, M.E., Pérez-Rodríguez, D., Pérez-Sala, D., Perier, C., Perl, A., Perlmutter, D.H., Perrotta, I., Pervaiz, S., Pesonen, M., Pessin, J.E., Peters, G.J., Petersen, M., Petrache, I., Petrof, B.J., Petrovski, G., Phang, J.M., Piacentini, M., Pierdominici, M., Pierre, P., Pierrefite-Carle, V., Pietrocola, F., Pimentel-Muiños, F.X., Pinar, M., Pineda, B., Pinkas-Kramarski, R., Pinti, M., Pinton, P., Piperdi, B., Piret, J.M., Platanias, L.C., Platta, H.W., Plowey, E.D., Pöggeler, S., Poirot, M., Polčic, P., Poletti, A., Poon, A.H., Popelka, H., Popova, B., Poprawa, I., Poulouse, S.M., Poulton, J., Powers, S.K., Powers, T., Pozuelo-Rubio, M., Prak, K., Prange, R., Prescott, M., Priault, M., Prince, S., Proia, R.L., Proikas-Cezanne, T., Prokisch, H., Promponas, V.J., Przyklenk, K., Puertollano, R., Pugazhenth, S., Puglielli, L., Pujol, A., Puyal, J., Pyeon, D., Qi, X., Qian, W.-B., Qin, Z.-H., Qiu, Y., Qu, Z., Quadrilatero, J., Quinn, F., Raben, N., Rabinowich, H., Radogna, F., Ragusa, M.J., Rahmani, M., Raina, K., Ramanadham, S., Ramesh, R., Rami, A., Randall-Demllo, S., Randow, F., Rao, H., Rao, V.A., Rasmussen, B.B., Rasse, T.M., Ratovitski, E.A., Rautou, P.-E., Ray, S.K., Razani, B., Reed, B.H., Reggiori, F., Rehm, M., Reichert, A.S., Rein, T., Reiner, D.J., Reits, E., Ren, J., Ren, X., Renna, M., Reusch, J.E., Revuelta, J.L., Reyes, L., Rezaie, A.R., Richards, R.I., Richardson, D.R., Richetta, C., Riehle, M.A., Rihn, B.H., Rikihisa, Y., Riley, B.E., Rimbach, G., Rippo, M.R., Ritis, K., Rizzi, F., Rizzo, E., Roach, P.J., Robbins, J., Roberge, M., Roca, G., Roccheri, M.C., Rocha, S., Rodrigues, C.M., Rodríguez, C.I., de Cordoba, S.R., Rodriguez-Muela, N., Roelofs, J., Rogov, V. V., Rohn, T.T., Rohrer, B., Romanelli, D., Romani, L., Romano, P.S., Roncero, M.I.G., Rosa, J.L., Rosello, A., Rosen, K. V., Rosenstiel, P., Rost-Roszkowska, M., Roth, K.A., Roué, G., Rouis, M., Rouschop, K.M., Ruan, D.T., Ruano, D., Rubinsztein, D.C., Rucker, E.B., Rudich, A., Rudolf, E., Rudolf, R., Ruegg, M.A., Ruiz-Roldan, C., Ruparelia, A.A., Rusmini, P., Russ, D.W., Russo, G.L., Russo, G., Russo, R., Rusten, T.E., Ryabovol, V., Ryan, K.M., Ryter, S.W., Sabatini, D.M., Sacher, M., Sachse, C., Sack, M.N., Sadoshima, J., Saftig, P., Sagi-Eisenberg, R., Sahni, S., Saikumar, P., Saito, T., Saitoh, T., Sakakura, K., Sakoh-Nakatogawa, M., Sakuraba, Y., Salazar-Roa, M., Salomoni, P., Saluja, A.K., Salvaterra, P.M., Salvioli, R., Samali, A., Sanchez, A.M., Sánchez-Alcázar, J.A., Sanchez-Prieto, R., Sandri, M., Sanjuan, M.A., Santaguida, S., Santambrogio, L., Santoni, G., Dos Santos, C.N., Saran, S., Sardiello, M., Sargent, G., Sarkar, P., Sarkar, S., Sarrias, M.R., Sarwal, M.M., Sasakawa, C., Sasaki, M., Sass, M., Sato, K., Sato, M., Satriano, J., Savaraj, N., Saveljeva, S., Schaefer, L., Schaible, U.E., Scharl, M., Schatzl, H.M., Schekman, R., Scheper, W., Schiavi, A., Schipper, H.M., Schmeisser, H., Schmidt, J., Schmitz, I., Schneider, B.E., Schneider, E.M., Schneider, J.L., Schon, E.A., Schönenberger, M.J., Schönthal, A.H., Schorderet, D.F., Schröder, B., Schuck, S., Schulze, R.J., Schwarten, M., Schwarz, T.L., Sciarretta, S., Scotto, K., Scovassi, A.I., Screatton, R.A., Screen, M., Seca, H., Sedej, S., Segatori, L., Segev, N., Seglen, P.O., Seguí-Simarro, J.M., Segura-Aguilar, J., Seki, E., Sell, C., Selliez, I., Semenkovich, C.F., Semenza, G.L., Sen, U., Serra, A.L., Serrano-Puebla, A., Sesaki, H., Setoguchi, T., Settembre, C., Shacka, J.J., Shajahan-Haq, A.N., Shapiro, I.M., Sharma, S., She, H., Shen, C.-K.J., Shen, C.-C., Shen, H.-M., Shen, S., Shen, W., Sheng, R., Sheng, X., Sheng, Z.-H., Shepherd, T.G., Shi, J., Shi, Q., Shi, Q., Shi, Y., Shibutani, S., Shibuya, K., Shidoji, Y., Shieh, J.-J., Shih, C.-M., Shimada, Y., Shimizu, S., Shin, D.W., Shinohara, M.L., Shintani, M., Shintani, T., Shioi, T., Shirabe, K., Shiri-Sverdlov, R., Shirihai, O., Shore, G.C., Shu, C.-W., Shukla, D., Sibirny, A.A., Sica, V., Sigurdson, C.J., Sigurdsson, E.M., Sijwali, P.S., Sikorska, B., Silveira, W.A., Silvente-Poirot, S., Silverman, G.A., Simak, J., Simmet, T., Simon, A.K., Simon, H.-U., Simone, C., Simons, M., Simonsen, A., Singh, R., Singh, S. V., Singh, S.K., Sinha, D., Sinha, S., Sinicrope, F.A., Sirko, A., Sirohi, K., Sishi, B.J., Sittler, A., Siu, P.M., Sivridis, E., Skwarska, A., Slack, R., Slaninová, I., Slavov, N., Smaili, S.S., Smalley, K.S., Smith, D.R., Soenen, S.J., Soleimanpour, S.A., Solhaug, A., Somasundaram, K., Son, J.H., Sonawane, A., Song, C., Song, F., Song, H.K., Song, J.-X., Song, W., Soo, K.Y., Sood, A.K., Soong, T.W., Soontornniyomkij, V., Soric, M., Sotgia, F., Soto-Pantoja, D.R., Sotthibundhu, A., Sousa, M.J., Spaink, H.P., Span, P.N., Spang, A., Sparks, J.D., Speck, P.G., Spector, S.A., Spies, C.D., Springer, W., Clair, D.S., Stacchiotti, A., Staels, B., Stang, M.T., Starczynowski, D.T., Starokadomskyy, P., Steegborn, C., Steele, J.W., Stefanis, L., Steffan, J., Stellrecht, C.M., Stenmark, H., Stepkowski, T.M., Stern, S.T., Stevens, C., Stockwell, B.R., Stoka, V., Storchova, Z., Stork, B., Stratoulis, V., Stravopodis, D.J., Strnad, P., Strohecker, A.M., Ström, A.-L., Stromhaug, P., Stulik, J., Su, Y.-X., Su, Z., Subauste, C.S., Subramaniam, S., Sue, C.M., Suh, S.W., Sui, X., Sukserree, S., Sulzer, D., Sun, F.-L., Sun, J., Sun, J., Sun, S.-Y., Sun, Y., Sun, Y., Sun, Y., Sundaramoorthy, V., Sung, J., Suzuki, H., Suzuki, K., Suzuki, N., Suzuki, T., Suzuki, Y.J., Swanson, M.S., Swanton, C., Swärd, K., Swarup, G., Sweeney, S.T., Sylvester, P.W.,

- Szatmari, Z., Szegezdi, E., Szlosarek, P.W., Taegtmeyer, H., Tafani, M., Taillebourg, E., Tait, S.W., Takacs-Vellai, K., Takahashi, Y., Takáts, S., Takemura, G., Takigawa, N., Talbot, N.J., Tamagno, E., Tamburini, J., Tan, C.-P., Tan, L., Tan, M.L., Tan, M., Tan, Y.-J., Tanaka, K., Tanaka, M., Tang, D., Tang, D., Tang, G., Tanida, I., Tanji, K., Tannous, B.A., Tapia, J.A., Tasset-Cuevas, I., Tatar, M., Tavassoly, I., Tavernarakis, N., Taylor, A., Taylor, G.S., Taylor, G.A., Taylor, J.P., Taylor, M.J., Tchétina, E. V, Tee, A.R., Teixeira-Clerc, F., Telang, S., Tencomnao, T., Teng, B.-B., Teng, R.-J., Terro, F., Tettamanti, G., Theiss, A.L., Theron, A.E., Thomas, K.J., Thomé, M.P., Thomes, P.G., Thorburn, A., Thorner, J., Thum, T., Thumm, M., Thurston, T.L., Tian, L., Till, A., Ting, J.P.-Y., Titorenko, V.I., Toker, L., Toldo, S., Tooze, S.A., Topisirovic, I., Torgersen, M.L., Torosantucci, L., Torriglia, A., Torrisi, M.R., Tournier, C., Towns, R., Trajkovic, V., Travassos, L.H., Triola, G., Tripathi, D.N., Trisciuglio, D., Troncoso, R., Trougakos, I.P., Truttmann, A.C., Tsai, K.-J., Tschan, M.P., Tseng, Y.-H., Tsukuba, T., Tsung, A., Tsvetkov, A.S., Tu, S., Tuan, H.-Y., Tucci, M., Tumbarello, D.A., Turk, B., Turk, V., Turner, R.F., Tveita, A.A., Tyagi, S.C., Ubukata, M., Uchiyama, Y., Udelnow, A., Ueno, T., Umekawa, M., Umemiya-Shirafuji, R., Underwood, B.R., Ungermann, C., Ureshino, R.P., Ushioda, R., Uversky, V.N., Uzcátegui, N.L., Vaccari, T., Vaccaro, M.I., Váchová, L., Vakifahmetoglu-Norberg, H., Valdor, R., Valente, E.M., Vallette, F., Valverde, A.M., Van den Berghe, G., Van Den Bosch, L., van den Brink, G.R., van der Goot, F.G., van der Klei, I.J., van der Laan, L.J., van Doorn, W.G., van Egmond, M., van Golen, K.L., Van Kaer, L., van Lookeren Campagne, M., Vandenabeele, P., Vandenbergh, W., Vanhorebeek, I., Varela-Nieto, I., Vasconcelos, M.H., Vasko, R., Vavvas, D.G., Vega-Naredo, I., Velasco, G., Velentzas, A.D., Velentzas, P.D., Vellai, T., Vellenga, E., Vendelbo, M.H., Venkatachalam, K., Ventura, N., Ventura, S., Veras, P.S., Verdier, M., Vertessy, B.G., Viale, A., Vidal, M., Vieira, H. LA, Vierstra, R.D., Vigneswaran, N., Vij, N., Vila, M., Villar, M., Villar, V.H., Villarroja, J., Vindis, C., Viola, G., Viscomi, M.T., Vitale, G., Vogl, D.T., Voitsekhovskaja, O. V, von Haefen, C., von Schwarzenberg, K., Voth, D.E., Vouret-Craviari, V., Vuori, K., Vyas, J.M., Waeber, C., Walker, C.L., Walker, M.J., Walter, J., Wan, L., Wan, X., Wang, B., Wang, C., Wang, C.-Y., Wang, C., Wang, C., Wang, C., Wang, D., Wang, F., Wang, F., Wang, G., Wang, H.-J., Wang, H., Wang, H.-G., Wang, H., Wang, H.-D., Wang, J., Wang, J., Wang, M., Wang, M.-Q., Wang, P.-Y., Wang, P., Wang, R.C., Wang, S., Wang, T.-F., Wang, X., Wang, X.-J., Wang, X.-W., Wang, X., Wang, X., Wang, Y., Wang, Y., Wang, Y., Wang, Y.-J., Wang, Y., Wang, Y., Wang, Y.T., Wang, Y., Wang, Z.-N., Wappner, P., Ward, C., Ward, D.M., Warnes, G., Watada, H., Watanabe, Y., Watase, K., Weaver, T.E., Weekes, C.D., Wei, J., Weide, T., Weihi, C.C., Weindl, G., Weis, S.N., Wen, L., Wen, X., Wen, Y., Westermann, B., Weyand, C.M., White, A.R., White, E., Whitton, J.L., Whitworth, A.J., Wiels, J., Wild, F., Wildenberg, M.E., Wileman, T., Wilkinson, D.S., Wilkinson, S., Willbold, D., Williams, C., Williams, K., Williamson, P.R., Winkhofer, K.F., Witkin, S.S., Wohlgemuth, S.E., Wollert, T., Wolvetang, E.J., Wong, E., Wong, G.W., Wong, R.W., Wong, V.K.W., Woodcock, E.A., Wright, K.L., Wu, C., Wu, D., Wu, G.S., Wu, J., Wu, J., Wu, M., Wu, M., Wu, S., Wu, W.K., Wu, Y., Wu, Z., Xavier, C.P., Xavier, R.J., Xia, G.-X., Xia, T., Xia, W., Xia, Y., Xiao, H., Xiao, J., Xiao, S., Xiao, W., Xie, C.-M., Xie, Z., Xie, Z., Xilouri, M., Xiong, Y., Xu, C., Xu, C., Xu, F., Xu, H., Xu, H., Xu, J., Xu, J., Xu, J., Xu, L., Xu, X., Xu, Y., Xu, Y., Xu, Z.-X., Xu, Z., Xue, Y., Yamada, T., Yamamoto, A., Yamanaka, K., Yamashina, S., Yamashiro, S., Yan, B., Yan, B., Yan, X., Yan, Z., Yanagi, Y., Yang, D.-S., Yang, J.-M., Yang, L., Yang, M., Yang, P.-M., Yang, P., Yang, Q., Yang, W., Yang, W.Y., Yang, X., Yang, Y., Yang, Y., Yang, Z., Yang, Z., Yao, M.-C., Yao, P.J., Yao, X., Yao, Z., Yao, Z., Yasui, L.S., Ye, M., Yedvobnick, B., Yeganeh, B., Yeh, E.S., Yeyati, P.L., Yi, F., Yi, L., Yin, X.-M., Yip, C.K., Yoo, Y.-M., Yoo, Y.H., Yoon, S.-Y., Yoshida, K.-I., Yoshimori, T., Young, K.H., Yu, H., Yu, J.J., Yu, J.-T., Yu, J., Yu, L., Yu, W.H., Yu, X.-F., Yu, Z., Yuan, J., Yuan, Z.-M., Yue, B.Y., Yue, J., Yue, Z., Zacks, D.N., Zacksenhaus, E., Zaffaroni, N., Zaglia, T., Zakeri, Z., Zecchini, V., Zeng, J., Zeng, M., Zeng, Q., Zervos, A.S., Zhang, D.D., Zhang, F., Zhang, G., Zhang, G.-C., Zhang, H., Zhang, H., Zhang, H., Zhang, J., Zhang, J., Zhang, J., Zhang, J.-P., Zhang, L., Zhang, L., Zhang, L., Zhang, M.-Y., Zhang, X., Zhang, X.D., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhao, M., Zhao, W.-L., Zhao, X., Zhao, Y.G., Zhao, Y., Zhao, Y., Zhao, Y.-X., Zhao, Z., Zhao, Z.J., Zheng, D., Zheng, X.-L., Zheng, X., Zhivotovsky, B., Zhong, Q., Zhou, G.-Z., Zhou, G., Zhou, H., Zhou, S.-F., Zhou, X.-J., Zhu, H., Zhu, H., Zhu, W.-G., Zhu, W., Zhu, X.-F., Zhu, Y., Zhuang, S.-M., Zhuang, X., Ziparo, E., Zois, C.E., Zoladek, T., Zong, W.-X., Zorzano, A., Zughaier, S.M., 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12, 1–222. doi:10.1080/15548627.2015.1100356
- Klionsky, D.J., Codogno, P., 2013. The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J. Innate Immun.* 5, 427–33. doi:10.1159/000351979
- Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., Yamamoto, M., 2010. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.* 12, 213–23. doi:10.1038/ncb2021



- Korac, J., Schaeffer, V., Kovacevic, I., Clement, A.M., Jungblut, B., Behl, C., Terzic, J., Dikic, I., 2013. Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates. *J. Cell Sci.* 126, 580–592. doi:10.1242/jcs.114926
- Korolchuk, V.I., Mansilla, A., Menzies, F.M., Rubinsztein, D.C., 2009. Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol. Cell* 33, 517–27. doi:10.1016/j.molcel.2009.01.021
- Kraft, C., Kijanska, M., Kalie, E., Siergiejuk, E., Lee, S.S., Semplicio, G., Stoffel, I., Brezovich, A., Verma, M., Hansmann, I., Ammerer, G., Hofmann, K., Tooze, S., Peter, M., 2012. Binding of the Atg1/ULK1 kinase to the ubiquitin-like protein Atg8 regulates autophagy. *EMBO J.* 31, 3691–3703. doi:10.1038/emboj.2012.225
- Kraft, C., Peter, M., Hofmann, K., 2010. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat. Cell Biol.* 12, 836–41. doi:10.1038/ncb0910-836
- Ku, B., Woo, J.-S., Liang, C., Lee, K.-H., Hong, H.-S., E, X., Kim, K.-S., Jung, J.U., Oh, B.-H., 2008. Structural and biochemical bases for the inhibition of autophagy and apoptosis by viral BCL-2 of murine gamma-herpesvirus 68. *PLoS Pathog.* 4, e25. doi:10.1371/journal.ppat.0040025
- Kuballa, P., Nolte, W.M., Castoreno, A.B., Xavier, R.J., 2012. Autophagy and the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 611–46. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074948
- Kyei, G.B., Dinkins, C., Davis, A.S., Roberts, E., Singh, S.B., Dong, C., Wu, L., Kominami, E., Ueno, T., Yamamoto, A., Federico, M., Panganiban, A., Vergne, I., Deretic, V., 2009. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J. Cell Biol.* 186, 255–268. doi:10.1083/jcb.200903070
- Lafeuillade, A., 2012. Eliminating the HIV reservoir. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 9, 121–31. doi:10.1007/s11904-012-0115-y
- Landi, A., Iannucci, V., Nuffel, A. Van, Meuwissen, P., Verhasselt, B., 2011. One protein to rule them all: modulation of cell surface receptors and molecules by HIV Nef. *Curr. HIV Res.* 9, 496–504.
- Laplanche, M., Sabatini, D.M., 2012. MTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274–293. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017
- Laverdure, S., Gross, A., Arpin-André, C., Clerc, I., Beaumelle, B., Barbeau, B., Mesnard, J.-M., 2012. HIV-1 antisense transcription is preferentially activated in primary monocyte-derived cells. *J. Virol.* 86, 13785–9. doi:10.1128/JVI.01723-12
- Lazarou, M., Sliter, D.A., Kane, L.A., Sarraf, S.A., Wang, C., Burman, J.L., Sideris, D.P., Fogel, A.I., Youle, R.J., 2015. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 524, 309–14. doi:10.1038/nature14893
- Le Grice, S.F.J., 2012. Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase: 25 Years of Research, Drug Discovery, and Promise. *J. Biol. Chem.* 287, 40850–7. doi:10.1074/jbc.R112.389056
- Lee, H.K., Lund, J.M., Ramanathan, B., Mizushima, N., Iwasaki, A., 2007. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* 315, 1398–401. doi:10.1126/science.1136880
- Lee, H.K., Mattei, L.M., Steinberg, B.E., Alberts, P., Lee, Y.H., Chervonsky, A., Mizushima, N., Grinstein, S., Iwasaki, A., 2010. In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. *Immunity* 32, 227–39. doi:10.1016/j.immuni.2009.12.006
- Lee, J.-S., Li, Q., Lee, J.-Y., Lee, S.-H., Jeong, J.H., Lee, H.-R., Chang, H., Zhou, F.-C., Gao, S.-J., Liang, C., Jung, J.U., 2009. FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat. Cell Biol.* 11, 1355–62. doi:10.1038/ncb1980
- Legakis, J.E., Koepke, J.I., Jedeszko, C., Barlaszkar, F., Terlecky, L.J., Edwards, H.J., Walton, P.A., Terlecky, S.R., 2002. Peroxisome senescence in human fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* 13, 4243–55. doi:10.1091/mbc.E02-06-0322
- Li, C.J., Friedman, D.J., Wang, C., Meteleev, V., Pardee, A.B., 1995. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 268, 429–31.

- Li, W., Li, J., Bao, J., 2012. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 1125–36. doi:10.1007/s00018-011-0865-5
- Li, Y., Wang, L.-X., Yang, G., Hao, F., Urban, W.J., Hu, H.-M., 2008. Efficient cross-presentation depends on autophagy in tumor cells. *Cancer Res.* 68, 6889–95. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0161
- Liang, C., E, X., Jung, J.U., 2008. Downregulation of autophagy by herpesvirus Bcl-2 homologs. *Autophagy* 4, 268–72.
- Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B.-H., Jung, J.U., 2006. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell Biol.* 8, 688–99. doi:10.1038/ncb1426
- Lilienbaum, A., 2013. Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 4, 1–26.
- Lin, M.G., Hurley, J.H., 2016. Structure and function of the ULK1 complex in autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 39, 61–68. doi:10.1016/j.ceb.2016.02.010
- Liu, B., Fang, M., Hu, Y., Huang, B., Li, N., Chang, C., Huang, R., Xu, X., Yang, Z., Chen, Z., Liu, W., 2014. Hepatitis B virus X protein inhibits autophagic degradation by impairing lysosomal maturation. *Autophagy* 10, 416–30. doi:10.4161/auto.27286
- Liu, L., Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, Q., Song, P., Ma, Q., Zhu, C., Wang, R., Qi, W., Huang, L., Xue, P., Li, B., Wang, X., Jin, H., Wang, J., Yang, F., Liu, P., Zhu, Y., Sui, S., Chen, Q., 2012. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 14, 177–85. doi:10.1038/ncb2422
- Liu, Y., Jones, M., Hingtgen, C.M., Bu, G., Larabee, N., Tanzi, R.E., Moir, R.D., Nath, A., He, J.J., 2000. Uptake of HIV-1 tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands. *Nat. Med.* 6, 1380–7. doi:10.1038/82199
- Lussignol, M., Queval, C., Bernet-Camard, M.-F., Cotte-Laffitte, J., Beau, I., Codogno, P., Esclatine, A., 2013. The herpes simplex virus 1 Us11 protein inhibits autophagy through its interaction with the protein kinase PKR. *J. Virol.* 87, 859–71. doi:10.1128/JVI.01158-12
- Maejima, I., Takahashi, A., Omori, H., Kimura, T., Takabatake, Y., Saitoh, T., Yamamoto, A., Hamasaki, M., Noda, T., Isaka, Y., Yoshimori, T., 2013. Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J.* 32, 2336–2347. doi:10.1038/emboj.2013.171
- Malim, M.H., Emerman, M., 2008. HIV-1 accessory proteins—ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe* 3, 388–98. doi:10.1016/j.chom.2008.04.008
- Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.Y., Maizel, J. V., Cullen, B.R., 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338, 254–7. doi:10.1038/338254a0
- Mandell, M.A., Jain, A., Arko-Mensah, J., Chauhan, S., Kimura, T., Dinkins, C., Silvestri, G., Münch, J., Kirchhoff, F., Simonsen, A., Wei, Y., Levine, B., Johansen, T., Deretic, V., 2014a. TRIM proteins regulate autophagy and can target autophagic substrates by direct recognition. *Dev. Cell* 30, 394–409. doi:10.1016/j.devcel.2014.06.013
- Mandell, M.A., Kimura, T., Jain, A., Johansen, T., Deretic, V., 2014b. TRIM proteins regulate autophagy: TRIM5 is a selective autophagy receptor mediating HIV-1 restriction. *Autophagy* 10, 2387–8. doi:10.4161/15548627.2014.984278
- Manjithaya, R., Nazarko, T.Y., Farré, J.-C., Subramani, S., 2010. Molecular mechanism and physiological role of pexophagy. *FEBS Lett.* 584, 1367–73. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.019
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., Kroemer, G., 2014. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 81–94. doi:10.1038/nrm3735
- Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.-Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., Dipaola, R.S., Karantza-Wadsworth, V., White, E., 2009. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 137, 1062–75. doi:10.1016/j.cell.2009.03.048
- Matsui, M., Warburton, R.J., Cogswell, P.C., Baldwin, A.S., Frelinger, J.A., 1996. Effects of HIV-1 Tat on

- expression of HLA class I molecules. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 11, 233–40.
- Metz, P., Chiramel, A., Chatel-Chaix, L., Alvisi, G., Bankhead, P., Mora-Rodriguez, R., Long, G., Hamacher-Brady, A., Brady, N.R., Bartenschlager, R., 2015. Dengue Virus Inhibition of Autophagic Flux and Dependency of Viral Replication on Proteasomal Degradation of the Autophagy Receptor p62. *J. Virol.* 89, 8026–41. doi:10.1128/JVI.00787-15
- Mijaljica, D., Prescott, M., Devenish, R.J., 2011. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7, 673–682. doi:10.4161/auto.7.7.14733
- Mitchell, R.S., Katsura, C., Skasko, M.A., Fitzpatrick, K., Lau, D., Ruiz, A., Stephens, E.B., Margottin-Goguet, F., Benarous, R., Guatelli, J.C., 2009. Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endo-lysosomal trafficking. *PLoS Pathog.* 5, e1000450. doi:10.1371/journal.ppat.1000450
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., Yoshimori, T., 2003. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J. Cell Sci.* 116, 1679–88.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., Ohsumi, Y., 1998. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395, 395–8. doi:10.1038/26506
- Mohammadi, P., Desfarges, S., Bartha, I., Joos, B., Zangger, N., Muñoz, M., Günthard, H.F., Beerenwinkel, N., Telenti, A., Ciuffi, A., 2013. 24 hours in the life of HIV-1 in a T cell line. *PLoS Pathog.* 9, e1003161. doi:10.1371/journal.ppat.1003161
- Molina, L., Grimaldi, M., Robert-Hebmann, V., Espert, L., Varbanov, M., Devaux, C., Granier, C., Biard-Piechaczyk, M., 2007. Proteomic analysis of the cellular responses induced in uninfected immune cells by cell-expressed X4 HIV-1 envelope. *Proteomics* 7, 3116–3130. doi:10.1002/pmic.200700306
- Moscat, J., Diaz-Meco, M.T., Wooten, M.W., Diazmeco, M., Wooten, M.W., 2007. Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. *Trends Biochem. Sci.* 32, 95–100. doi:10.1016/j.tibs.2006.12.002
- Mostowy, S., Cossart, P., 2012. Bacterial autophagy: restriction or promotion of bacterial replication? *Trends Cell Biol.* 22, 283–291. doi:10.1016/j.tcb.2012.03.006
- Motley, A.M., Nuttall, J.M., Hettema, E.H., 2012a. Pex3-anchored Atg36 tags peroxisomes for degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 31, 2852–68. doi:10.1038/emboj.2012.151
- Motley, A.M., Nuttall, J.M., Hettema, E.H., 2012b. Atg36: the *Saccharomyces cerevisiae* receptor for pexophagy. *Autophagy* 8, 1680–1. doi:10.4161/auto.21485
- Nardacci, R., Amendola, A., Ciccocanti, F., Corazzari, M., Esposito, V., Vlassi, C., Taibi, C., Fimia, G.M., Del Nonno, F., Ippolito, G., D’Offizi, G., Piacentini, M., 2014. Autophagy plays an important role in the containment of HIV-1 in nonprogressor-infected patients. *Autophagy* 10, 1167–78. doi:10.4161/auto.28678
- Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., Mizushima, N., Klein, L., 2008. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* 455, 396–400. doi:10.1038/nature07208
- New, D.R., Ma, M., Epstein, L.G., Nath, A., Gelbard, H.A., 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein induces death by apoptosis in primary human neuron cultures. *J. Neurovirol.* 3, 168–73.
- Nezis, I.P., Shravage, B. V., Sagona, A.P., Johansen, T., Baehrecke, E.H., Stenmark, H., 2010a. Autophagy as a trigger for cell death: autophagic degradation of inhibitor of apoptosis dBruce controls DNA fragmentation during late oogenesis in *Drosophila*. *Autophagy* 6, 1214–5.
- Nezis, I.P., Shravage, B. V., Sagona, A.P., Lamark, T., Bjørkøy, G., Johansen, T., Rusten, T.E., Brech, A., Baehrecke, E.H., Stenmark, H., 2010b. Autophagic degradation of dBruce controls DNA fragmentation in nurse cells during late *Drosophila melanogaster* oogenesis. *J. Cell Biol.* 190, 523–31. doi:10.1083/jcb.201002035
- Nickel, W., Rabouille, C., 2009. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 148–55. doi:10.1038/nrm2617
- Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Behrends, U., Jaffee, E.M., Pardoll, D.M., Bornkamm, G.W., Mautner, J., 2003. Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur.*

- J. Immunol. 33, 1250–9. doi:10.1002/eji.200323730
- Noda, N.N., Kumeta, H., Nakatogawa, H., Satoo, K., Adachi, W., Ishii, J., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., Inagaki, F., 2008. Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes Cells* 13, 1211–8. doi:10.1111/j.1365-2443.2008.01238.x
- Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D.G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., Rogov, V., Löhr, F., Popovic, D., Occhipinti, A., Reichert, A.S., Terzic, J., Dötsch, V., Ney, P.A., Dikic, I., 2010. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep.* 11, 45–51. doi:10.1038/embor.2009.256
- O'Connor, C., Pertel, T., Gray, S., Robia, S.L., Bakowska, J.C., Luban, J., Campbell, E.M., 2010. p62/sequestosome-1 associates with and sustains the expression of retroviral restriction factor TRIM5alpha. *J. Virol.* 84, 5997–6006. doi:10.1128/JVI.02412-09
- Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., Ohsumi, Y., 2009. Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. *Dev. Cell* 17, 87–97. doi:10.1016/j.devcel.2009.06.013
- Orvedahl, A., Alexander, D., Tallóczy, Z., Sun, Q., Wei, Y., Zhang, W., Burns, D., Leib, D.A., Levine, B., 2007. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* 1, 23–35. doi:10.1016/j.chom.2006.12.001
- Orvedahl, A., MacPherson, S., Sumpter, R., Tallóczy, Z., Zou, Z., Levine, B., Sumpter Jr., R., Talloczy, Z., Zou, Z., Levine, B., Sumpter, R., Tallóczy, Z., Zou, Z., Levine, B., Sumpter Jr., R., Talloczy, Z., Zou, Z., Levine, B., 2010. Autophagy Protects against Sindbis Virus Infection of the Central Nervous System. *Cell Host Microbe* 7, 115–127. doi:10.1016/j.chom.2010.01.007
- Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T., Münz, C., 2005. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 307, 593–6. doi:10.1126/science.1104904
- Pan, T., Wu, S., He, X., Luo, H., Zhang, Y., Fan, M., Geng, G., Ruiz, V.C., Zhang, J., Mills, L., Bai, C., Zhang, H., 2014. Necroptosis takes place in human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1)-infected CD4+ T lymphocytes. *PLoS One* 9, e93944. doi:10.1371/journal.pone.0093944
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., Johansen, T., 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 24131–45. doi:10.1074/jbc.M702824200
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., Levine, B., 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927–39. doi:10.1016/j.cell.2005.07.002
- Peeters, M., D'Arc, M., Delaporte, E., 1996. Origin and diversity of human retroviruses. *AIDS Rev.* 16, 23–34.
- Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, J.M., Ho, D.D., 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271, 1582–6.
- Peters, P.J., Bhattacharya, J., Hibbitts, S., Dittmar, M.T., Simmons, G., Bell, J., Simmonds, P., Clapham, P.R., 2004. Biological analysis of human immunodeficiency virus type 1 R5 envelopes amplified from brain and lymph node tissues of AIDS patients with neuropathology reveals two distinct tropism phenotypes and identifies envelopes in the brain that confer an enhanced . *J. Virol.* 78, 6915–26. doi:10.1128/JVI.78.13.6915-6926.2004
- Peters, P.J., Sullivan, W.M., Duenas-Decamp, M.J., Bhattacharya, J., Ankghuambom, C., Brown, R., Luzuriaga, K., Bell, J., Simmonds, P., Ball, J., Clapham, P.R., 2006. Non-macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 R5 envelopes predominate in blood, lymph nodes, and semen: implications for transmission and pathogenesis. *J. Virol.* 80, 6324–32. doi:10.1128/JVI.02328-05
- Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D.L., Simon, F., 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* 15, 871–2. doi:10.1038/nm.2016
- Platta, H.W., Erdmann, R., 2007. Peroxisomal dynamics. *Trends Cell Biol.* 17, 474–84. doi:10.1016/j.tcb.2007.06.009

- Polson, H.E.J., de Lartigue, J., Rigden, D.J., Reedijk, M., Urbé, S., Clague, M.J., Tooze, S.A., 2010. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* 6, 506–22. doi:10.4161/auto.6.4.11863
- Ravikumar, B., Moreau, K., Rubinsztein, D.C., 2010. Plasma membrane helps autophagosomes grow. *Autophagy* 6, 1184–6. doi:10.4161/auto.6.8.13428
- Rayne, F., Debaisieux, S., Yezid, H., Lin, Y.-L., Mettling, C., Konate, K., Chazal, N., Arold, S.T., Pugnère, M., Sanchez, F., Bonhoure, A., Briant, L., Loret, E., Roy, C., Beaumelle, B., 2010. Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate enables efficient secretion of HIV-1 Tat by infected T-cells. *EMBO J.* 29, 1348–62. doi:10.1038/emboj.2010.32
- Reggiori, F., 2006. 1. Membrane origin for autophagy. *Curr. Top. Dev. Biol.* 74, 1–30. doi:10.1016/S0070-2153(06)74001-7
- Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., Guffanti, A., Minucci, S., Pelicci, P.G., Ballabio, A., 2001. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* 20, 2140–51. doi:10.1093/emboj/20.9.2140
- Richetta, C., Grégoire, I.P., Verlhac, P., Azocar, O., Baguet, J., Flacher, M., Tangy, F., Rabourdin-Combe, C., Faure, M., 2013. Sustained autophagy contributes to measles virus infectivity. *PLoS Pathog.* 9, e1003599. doi:10.1371/journal.ppat.1003599
- Romani, B., Engelbrecht, S., 2009. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr: functions and molecular interactions. *J. Gen. Virol.* 90, 1795–805. doi:10.1099/vir.0.011726-0
- Rose, K.M., Marin, M., Kozak, S.L., Kabat, D., 2004. The viral infectivity factor (Vif) of HIV-1 unveiled. *Trends Mol. Med.* 10, 291–7. doi:10.1016/j.molmed.2004.04.008
- Rosenberg, E.S., Altfeld, M., Poon, S.H., Phillips, M.N., Wilkes, B.M., Eldridge, R.L., Robbins, G.K., D'Aquila, R.T., Goulder, P.J.R., Walker, B.D., Clustalx, D.G.T., Rosenberg, E.S., Altfeld, M., Poon, S.H., Phillips, M.N., Wilkes, B.M., Eldridge, R.L., Robbins, G.K., Aquila, R.T.D., Goulder, P.J.R., Walker, B.D., 2000. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* 407, 523–526. doi:10.1038/35035103
- Rowland-Jones, S.L., Whittle, H.C., 2007. Out of Africa: what can we learn from HIV-2 about protective immunity to HIV-1? *Nat. Immunol.* 8, 329–31. doi:10.1038/ni0407-329
- Rubinstein, A.D., Kimchi, A., 2012. Life in the balance - a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *J Cell Sci* 125, 5259–5268. doi:10.1242/jcs.115865
- Rusnati, M., Presta, M., 2002. HIV-1 Tat protein: A target for the development of anti-AIDS therapies. *Drugs Future* 27, 481–493. doi:10.1358/dof.2002.027.05.680587
- Russell, R.C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H.W., Chang, Y.-Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T.P., Dillin, A., Guan, K.-L., 2013. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* 15, 741–50. doi:10.1038/ncb2757
- Rusten, T.E., Simonsen, A., 2008. ESCRT functions in autophagy and associated disease. *Cell Cycle* 7, 1166–72.
- Sagnier, S., Daussy, C.F., Borel, S., Robert-Hebmann, V., Faure, M., Blanchet, F.P., Beaumelle, B., Biard-Piechaczyk, M., Espert, L., 2015. Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* doi:10.1128/JVI.02174-14
- Scala, G., Ruocco, M.R., Ambrosino, C., Mallardo, M., Giordano, V., Baldassarre, F., Dragonetti, E., Quinto, I., Venuta, S., 1994. The expression of the interleukin 6 gene is induced by the human immunodeficiency virus 1 TAT protein. *J. Exp. Med.* 179, 961–71.
- Schiralli Lester, G.M., Henderson, A.J., 2012. Mechanisms of HIV Transcriptional Regulation and Their Contribution to Latency. *Mol. Biol. Int.* 2012, 614120. doi:10.1155/2012/614120
- Shaid, S., Brandts, C.H., Serve, H., Dikic, I., 2013. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ.* 20, 21–30. doi:10.1038/cdd.2012.72
- Shen, H.M., Codogno, P., 2011. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy* 7, 457–465. doi:10.4161/auto.7.5.14226
- Shen, W.-C., Li, H.-Y., Chen, G.-C., Chern, Y., Tu, P.-H., 2015. Mutations in the ubiquitin-binding domain of



- OPTN/optineurin interfere with autophagy-mediated degradation of misfolded proteins by a dominant-negative mechanism. *Autophagy* 11, 685–700. doi:10.4161/auto.36098
- Shi, C.-S., Kehrl, J.H., 2008. MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *J. Biol. Chem.* 283, 33175–82. doi:10.1074/jbc.M804478200
- Shi, C.-S., Shenderov, K., Huang, N.-N., Kabat, J., Abu-Asab, M., Fitzgerald, K.A., Sher, A., Kehrl, J.H., 2012. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat. Immunol.* 13, 255–63. doi:10.1038/ni.2215
- Shi, J., Fung, G., Piesik, P., Zhang, J., Luo, H., 2014. Dominant-negative function of the C-terminal fragments of NBR1 and SQSTM1 generated during enteroviral infection. *Cell Death Differ.* 21, 1432–41. doi:10.1038/cdd.2014.58
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C.B., Tsujimoto, Y., 2004. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.* 6, 1221–8. doi:10.1038/ncb1192
- Shojania, S., O'Neil, J.D., 2010. Intrinsic disorder and function of the HIV-1 Tat protein. *Protein Pept. Lett.* 17, 999–1011.
- Siliciano, R.F., Greene, W.C., 2011. HIV latency. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1, a007096. doi:10.1101/cshperspect.a007096
- Simon, F., Maucière, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Müller-Trutwin, M.C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M.C., Barré-Sinoussi, F., Brun-Vézinet, F., 1998. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med.* 4, 1032–7. doi:10.1038/2017
- Simon, V., Bloch, N., Landau, N.R., 2015. Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. *Nat. Immunol.* 16, 546–53. doi:10.1038/ni.3156
- Simonsen, A., Tooze, S.A., 2009. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J. Cell Biol.* 186, 773–82. doi:10.1083/jcb.200907014
- Sir, D., Kuo, C., Tian, Y., Liu, H.M., Huang, E.J., Jung, J.U., Machida, K., Ou, J.J., 2012. Replication of hepatitis C virus RNA on autophagosomal membranes. *J. Biol. Chem.* 287, 18036–43. doi:10.1074/jbc.M111.320085
- Smith, J.J., Aitchison, J.D., 2013. Peroxisomes take shape. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 803–17. doi:10.1038/nrm3700
- Sodroski, J., Rosen, C., Wong-Staal, F., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Arya, S., Gallo, R.C., Haseltine, W.A., 1985. Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. *Science* 227, 171–173.
- Sol-Foulon, N., Moris, A., Nobile, C., Boccaccio, C., Engering, A., Abastado, J.-P., Heard, J.-M., van Kooyk, Y., Schwartz, O., 2002. HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread. *Immunity* 16, 145–55.
- Strebel, K., 2013. HIV accessory proteins versus host restriction factors. *Curr. Opin. Virol.* 3, 692–9. doi:10.1016/j.coviro.2013.08.004
- Strebel, K., 2003. Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *AIDS* 17 Suppl 4, S25–34.
- Stremlau, M., Owens, C.M., Perron, M.J., Kiessling, M., Autissier, P., Sodroski, J., 2004. The cytoplasmic body component TRIM5 $\alpha$  restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427, 848–853. doi:10.1038/nature02343
- Stroupe, C., 2011. Autophagy: cells SNARE selves. *Curr. Biol.* 21, R697–9. doi:10.1016/j.cub.2011.08.017
- Sundquist, W.I., Kräusslich, H.-G., 2012. HIV-1 assembly, budding, and maturation. [WWW Document]. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* doi:10.1101/cshperspect.a006924
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., Ohsumi, Y., 2001. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.* 20, 5971–81. doi:10.1093/emboj/20.21.5971
- Suzuki, K., Noda, T., Ohsumi, Y., 2004. Interrelationships among Atg proteins during autophagy in

- Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21, 1057–65. doi:10.1002/yea.1152
- Tahirov, T.H., Babayeva, N.D., Varzavand, K., Cooper, J.J., Sedore, S.C., Price, D.H., 2010. Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. *Nature* 465, 747–51. doi:10.1038/nature09131
- Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cuaing, H.D., Sun, M., Sato, Y., Liang, C., Jung, J.U., Cheng, J.Q., Mulé, J.J., Pledger, W.J., Wang, H.-G., 2007. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* 9, 1142–51. doi:10.1038/ncb1634
- Tang, S.-W., Chen, C.-Y., Klase, Z., Zane, L., Jeang, K.-T., 2013. The cellular autophagy pathway modulates human T-cell leukemia virus type 1 replication. *J. Virol.* 87, 1699–707. doi:10.1128/JVI.02147-12
- Tanida, I., 2011. Autophagy basics. *Microbiol. Immunol.* 55, 1–11. doi:10.1111/j.1348-0421.2010.00271.x
- Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., 2004. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2503–18. doi:10.1016/j.biocel.2004.05.009
- Tasdemir, E., Chiara Maiuri, M., Morselli, E., Criollo, A., D’Amelio, M., Djavaheri-Mergny, M., Cecconi, F., Tavernarakis, N., Kroemer, G., 2008. A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy* 4, 810–4.
- Thurston, T.L.M., Ryzhakov, G., Bloor, S., von Muhlinen, N., Randow, F., 2009. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat. Immunol.* 10, 1215–21. doi:10.1038/ni.1800
- Thurston, T.L.M., Wandel, M.P., von Muhlinen, N., Foeglein, A., Randow, F., Foeglein, Á., Randow, F., 2012. Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* 482, 414–418. doi:10.1038/nature10744
- Torresilla, C., Larocque, É., Landry, S., Halin, M., Coulombe, Y., Masson, J.-Y., Mesnard, J.-M., Barbeau, B., 2013. Detection of the HIV-1 minus-strand-encoded antisense protein and its association with autophagy. *J. Virol.* 87, 5089–105. doi:10.1128/JVI.00225-13
- Tumbarello, D.A., Manna, P.T., Allen, M., Bycroft, M., Arden, S.D., Kendrick-Jones, J., Buss, F., 2015. The Autophagy Receptor TAX1BP1 and the Molecular Motor Myosin VI Are Required for Clearance of *Salmonella Typhimurium* by Autophagy. *PLoS Pathog.* 11, e1005174. doi:10.1371/journal.ppat.1005174
- Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M., Giacca, M., 2001. Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 276, 3254–61. doi:10.1074/jbc.M006701200
- Van Grol, J., Subauste, C., Andrade, R.M., Fujinaga, K., Nelson, J., Subauste, C.S., 2010. HIV-1 inhibits autophagy in bystander macrophage/monocytic cells through Src-Akt and STAT3. *PLoS One* 5, e11733. doi:10.1371/journal.pone.0011733
- Varbanov, M., Espert, L., Biard-Piechaczyk, M., 2006. Mechanisms of CD4 T-cell depletion triggered by HIV-1 viral proteins. *AIDS Rev.* 8, 221–36.
- Vendeville, A., Rayne, F., Bonhoure, A., Bettache, N., Montcourrier, P., Beaumelle, B., 2004. HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses. *Mol. Biol. Cell* 15, 2347–60. doi:10.1091/mbc.E03-12-0921
- Verlhac, P., Grégoire, I.P., Azocar, O., Petkova, D.S., Baguet, J.J., Viret, C., Faure, M., Grégoire, I.P., Azocar, O., Petkova, D.S., Baguet, J.J., Viret, C., Faure, M., 2015. Autophagy receptor NDP52 regulates pathogen-containing autophagosome maturation. *Cell Host Microbe* 17, 515–525. doi:10.1016/j.chom.2015.02.008
- Vives, E., Charneau, P., van Rietschoten, J., Rochat, H., Bahraoui, E., 1994. Effects of the Tat basic domain on human immunodeficiency virus type 1 transactivation, using chemically synthesized Tat protein and Tat peptides. *J. Virol.* 68, 3343–3353.
- von Muhlinen, N., Akutsu, M., Ravenhill, B.J., Foeglein, Á., Bloor, S., Rutherford, T.J., Freund, S.M. V, Komander, D., Randow, F., 2012. LC3C, Bound Selectively by a Noncanonical LIR Motif in NDP52, Is Required for Antibacterial Autophagy. *Mol. Cell* 48, 329–342. doi:10.1016/j.molcel.2012.08.024
- Wei, Y., Sinha, S., Levine, B., 2008. Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy* 4, 949–51.
- Westendorp, M.O., Li-Weber, M., Frank, R.W., Krammer, P.H., 1994. Human immunodeficiency virus type 1 Tat upregulates interleukin-2 secretion in activated T cells. *J. Virol.* 68, 4177–85.

- Wild, P., Farhan, H., McEwan, D.G., Wagner, S., Rogov, V. V, Brady, N.R., Richter, B., Korac, J., Waidmann, O., Choudhary, C., Dötsch, V., Bumann, D., Dikic, I., 2011. Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. - PubMed - NCBI [WWW Document]. Science. doi:10.1126/science.1205405
- Wileman, T., 2013. Autophagy as a defence against intracellular pathogens. *Essays Biochem* 55, 153–163. doi:bse0550153 [pii]10.1042/bse0550153
- Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J., Declercq, W., Agostinis, P., Vanden Berghe, T., Lippens, S., Vandenabeele, P., 2010. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis.* 1, e18. doi:10.1038/cddis.2009.16
- Xu, Y., Liu, X.-D., Gong, X., Eissa, N.T., 2008. Signaling pathway of autophagy associated with innate immunity. *Autophagy* 4, 110–2.
- Yamamoto, A., Simonsen, A., 2011. Alfy-dependent elimination of aggregated proteins by macroautophagy: can there be too much of a good thing? *Autophagy* 7, 346–50.
- Yamashita, S., Abe, K., Tatemichi, Y., Fujiki, Y., 2014. The membrane peroxin PEX3 induces peroxisome-ubiquitination-linked pexophagy. *Autophagy* 10, 1549–64. doi:10.4161/auto.29329
- Yan, J., Seibenhener, M.L., Calderilla-Barbosa, L., Diaz-Meco, M.-T., Moscat, J., Jiang, J., Wooten, M.W., Wooten, M.C., 2013. SQSTM1/p62 interacts with HDAC6 and regulates deacetylase activity. *PLoS One* 8, e76016. doi:10.1371/journal.pone.0076016
- Yang, Z., Huang, J., Geng, J., Nair, U., Klionsky, D.J., 2006. Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol. Biol. Cell* 17, 5094–104. doi:10.1091/mbc.E06-06-0479
- Yang, Z., Klionsky, D.J., 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* 12, 814–822. doi:10.1038/ncb0910-814
- Yezid, H., Konate, K., Debaisieux, S., Bonhoure, A., Beaumelle, B., 2009. Mechanism for HIV-1 Tat insertion into the endosome membrane. *J. Biol. Chem.* 284, 22736–46. doi:10.1074/jbc.M109.023705
- Youle, R.J., Narendra, D.P., 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 9–14. doi:10.1038/nrm3028
- Younas, M., Psomas, C., Reynes, J., Corbeau, P., 2016. Immune activation in the course of HIV-1 infection: Causes, phenotypes and persistence under therapy. *HIV Med.* 17, 89–105. doi:10.1111/hiv.12310
- Young, M.M., Takahashi, Y., Khan, O., Park, S., Hori, T., Yun, J., Sharma, A.K., Amin, S., Hu, C.-D., Zhang, J., Kester, M., Wang, H.-G., 2012. Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 287, 12455–68. doi:10.1074/jbc.M111.309104
- Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T., Simon, H.-U., 2006. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 8, 1124–32. doi:10.1038/ncb1482
- Yu, L., Wan, F., Dutta, S., Welsh, S., Liu, Z., Freundt, E., Baehrecke, E.H., Lenardo, M., 2006. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4952–7. doi:10.1073/pnas.0511288103
- Zalckvar, E., Berissi, H., Eisenstein, M., Kimchi, A., 2009. Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL. *Autophagy* 5, 720–2.
- Zauli, G., Davis, B.R., Re, M.C., Visani, G., Furlini, G., La Placa, M., 1992. tat protein stimulates production of transforming growth factor-beta 1 by marrow macrophages: a potential mechanism for human immunodeficiency virus-1-induced hematopoietic suppression. *Blood* 80, 3036–43.
- Zhang, J., Tripathi, D.N., Jing, J., Alexander, A., Kim, J., Powell, R.T., Dere, R., Tait-Mulder, J., Lee, J.-H., Paull, T.T., Pandita, R.K., Charaka, V.K., Pandita, T.K., Kastan, M.B., Walker, C.L., 2015. ATM functions at the peroxisome to induce pexophagy in response to ROS. *Nat. Cell Biol.* 17, 1259–69. doi:10.1038/ncb3230



- Zheng, Y.T., Shahnazari, S., Brech, A., Lamark, T., Johansen, T., Brumell, J.H., 2009. The Adaptor Protein p62/SQSTM1 Targets Invading Bacteria to the Autophagy Pathway. *J. Immunol.* 183, 5909–5916. doi:10.4049/jimmunol.0900441
- Zhirnov, O.P., Klenk, H.D., 2013. Influenza A virus proteins NS1 and hemagglutinin along with M2 are involved in stimulation of autophagy in infected cells. *J. Virol.* 87, 13107–14. doi:10.1128/JVI.02148-13
- Zhou, A., Paranjape, J., Brown, T.L., Nie, H., Naik, S., Dong, B., Chang, A., Trapp, B., Fairchild, R., Colmenares, C., Silverman, R.H., 1997. Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *EMBO J.* 16, 6355–63. doi:10.1093/emboj/16.21.6355
- Zhou, D., Masliah, E., Spector, S.A., 2011. Autophagy is increased in postmortem brains of persons with HIV-1-associated encephalitis. *J. Infect. Dis.* 203, 1647–57. doi:10.1093/infdis/jir163
- Zhou, D., Spector, S.A., 2008. Human immunodeficiency virus type-1 infection inhibits autophagy. *AIDS* 22, 695–9. doi:10.1097/QAD.0b013e3282f4a836



# Annexes



## Annexe I

Revue dans Currents topics in virology:

### To eat or not to eat: the intricate relationship between autophagy and HIV-1

Jamal Alfaisal\*, Coralie F. Daussy\* (co-premiers auteurs),  
Fabien P. Blanchet, Lucile Espert, Sara Salinas et Martine  
Biard-Piechaczyk

*Reprinted by permission from Research Trends:  
Current topics in virology, © 2014*



# To eat or not to eat: the intricate relationship between autophagy and HIV-1

Jamal Alfaisal<sup>1,†</sup>, Coralie F. Daussy<sup>1,†</sup>, Fabien P. Blanchet<sup>1</sup>, Lucile Espert<sup>1</sup>, Sara Salinas<sup>2</sup> and Martine Biard-Piechaczyk<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS), CNRS-UMR 5236;

<sup>2</sup>Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM), CNRS-UMR 5235, Montpellier, France

## ABSTRACT

A consensus is now growing on the fact that autophagy can behave as an antiviral mechanism against incoming pathogens. Therefore, some pathogens have evolved to counteract or benefit from the cellular autophagy machinery. The Human Immunodeficiency Virus (HIV), like many viruses, manipulates autophagy to favor its replication. In particular, HIV-1 envelope (Env) plays an important role in modulating autophagy in CD4<sup>+</sup> T cells and phagocytic cells. Env-mediated autophagy is a cell-type dependent mechanism activated in bystander CD4<sup>+</sup> T cells but totally inhibited during their productive infection. In both infected myeloid dendritic cells and macrophages, the autophagy flux is progressively shut-down. The modulation of autophagy by HIV in these cell types could be responsible for the onset of HIV-mediated immunopathogenesis and contribute to viral spread. The former effect is responsible for apoptosis of bystander CD4<sup>+</sup> T cells and the latter correlates with a viral escape strategy favoring viral replication and transmission by counteracting

autophagy-mediated antiviral immunity. Furthermore, HIV-1 can infect different cell types of the central nervous system such as the microglia and, in a restrictive manner, the astrocytes and the neural precursors for which infection has also been correlated with modulation of autophagy. The aim of this review is to provide an overview on the intricate and conflicting relationships that intimately link HIV-1 and autophagy in these different cell types.

**KEYWORDS:** HIV-1, autophagy, infection

## 1. INTRODUCTION

Despite more than 30 years of intense basic and clinical studies on HIV infection, the scientific challenge remains, since 35 million people are still living with HIV worldwide (data from UNAIDS, 2013). Although tremendous success has been achieved to date in the treatment (HAART, highly active antiretroviral therapy), no cure has yet been found, mainly due to viral resistance and persistence of viral cell reservoirs. It has progressively become clear that HIV infection is highly complex, explaining the failure to cure this disease. HIV infection induces the early establishment of a chronic immune activation that plays a crucial role in HIV pathogenesis by triggering progressively the exhaustion and collapse of the whole immune system ([1] for review). Moreover, this infection triggers the progressive depletion of CD4<sup>+</sup> T cells,

---

\*Corresponding author: Martine Biard-Piechaczyk, Team autophagy and infections, Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS), CNRS-UMR 5236, 1919, Route de Mende, F-34293 Montpellier Cedex 5, France. martine.biard@cpbs.cnrs.fr

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

leading to increased susceptibility to opportunistic infections [2-4]. A residual chronic immune activation persists even in HIV-infected patients in whom viral replication is successfully inhibited by HAART, and the extent of this residual immune activation is associated with CD4<sup>+</sup> T cell loss [5]. However, a causal link between chronic immune activation and CD4<sup>+</sup> T cell loss has not yet been formally demonstrated.

During sexual transmission, viruses cross epithelia and encounter their target cells, mainly CD4<sup>+</sup> T cells, dendritic cell (DC) subsets and macrophages. CD4<sup>+</sup> T cells, macrophages and only a small proportion of DC are productively infected. Most of the DC capture the virus via cell surface C-type lectin receptors, such as DC-SIGN, and migrate toward lymph nodes or other secondary lymphoid organs, where they can transmit HIV-1 to CD4<sup>+</sup> T cells [6]. HIV also crosses the blood-brain barrier (BBB) and enters the central nervous system (CNS) early after the initial systemic infection, leading to cognitive deficits known as HAND (HIV-associated neurocognitive disorders) that appear in up to 50% of HIV patients in the later stages of infection [7].

In most instances, to enter and productively infect a target cell, HIV must bind to CD4 and specific co-receptors, like CCR5 or CXCR4, belonging to the chemokine receptor family and related to viral tropism (For a recent review see [8]). Co-receptor usage is correlated, at least in part, with the different phases of the disease. R5-tropic viruses, which utilize CCR5, are predominantly represented during the early stages of HIV-1 infection. In infected patients, the emergence of X4-tropic variants, which use CXCR4, is almost invariably associated with faster decline of circulating CD4<sup>+</sup> T cells, accelerated disease progression and poor prognosis for survival [9, 10]. However, the presence of X4 viruses is not an obligatory prerequisite for disease progression and a significant proportion of individuals who progress to AIDS exclusively harbors R5 variants. The selective and dominant transmission of R5-tropic viruses is not fully understood, but it may depend on the superimposition of multiple imperfect gatekeepers that restrict HIV-1 X4 transmission at different steps of the infection process [11].

In this review, we detail the past and recent research aimed at investigating the complex interplay between the cellular autophagy pathway and HIV infection.

### 1.1. CD4<sup>+</sup> T cells

CD4<sup>+</sup> T lymphocytes represent the main target cell population for HIV-1 infection [12, 13] and their progressive destruction is the hallmark of its associated disease [14]. CD4<sup>+</sup> T cell activation is thought to be a major factor in facilitating HIV-1 infection of these cells [15, 16].

CD4<sup>+</sup> T lymphocytes constitute a highly heterogeneous population divided by functional and phenotypic differences, and their activation, immune status and localization directly influence their susceptibility to HIV-1 infection and the consequent viral-mediated immunopathogenesis. They can be broadly divided into naive and memory subsets, and both subsets are composed of many subpopulations. Upon microbial infection, naive CD4<sup>+</sup> T cells are activated after their interaction with DC carrying and presenting specific pathogen-derived antigens. Depending on the cytokine environment and the source of antigens, the antigen-specific CD4<sup>+</sup> T lymphocytes can then rapidly proliferate and differentiate into several cell subsets with highly specialized immunologic functions, such as Th1, Th2, Th17 and regulatory T cells [17]. Quiescent naive and resting CD4<sup>+</sup> T cells were reported to be relatively resistant to HIV-1 infection [16, 18] possibly due to the low metabolic rate and antiviral mechanisms present in these cells [19, 20]. On the other hand, non-quiescent memory CD4<sup>+</sup> T cells were shown to support active HIV-1 replication with differences in their half-life, mainly depending on their maturation level [21, 22]. Although the majority of these cells die rapidly, a small proportion can undergo a transition toward a resting state [23]. Nevertheless, rapidly after acute infection, viral dissemination to lymphoid tissues and exponential HIV-1 replication throughout the lymphatic system lead to the depletion of most mucosal CD4<sup>+</sup> memory T cells [24-28] and to the subsequent establishment of reservoir cells in mucosa-associated lymphoid tissues (MALT) [29-31]. Importantly, this major effect was observed in non-human primate models [32-34] as well as



in humanized mice models of HIV infection [35, 36]. Therefore, resting memory CD4<sup>+</sup> T cells could represent a significant viral reservoir seemingly responsible for the failure to eradicate HIV infection upon antiviral therapies [24, 37-40].

Interestingly, an immature memory T cell population with stem cell-like properties called CD4<sup>+</sup> T memory stem cells (T<sub>SCM</sub> cells), the most long-lasting central memory CD4<sup>+</sup> T cells, were reported to harbor high levels of HIV-1 DNA, thus potentially providing a viral reservoir over time [41].

HIV-1 entry in CD4<sup>+</sup> T cells relies mainly on a receptor-dependent process, leading to the fusion of the target cell membrane with the viral or the HIV-infected cell membrane [42]. More precisely, the HIV-1 envelope (Env), expressed at the surface of free virions or infected cells and composed of the glycoproteins gp120 and gp41, binds to CD4. This interaction triggers structural changes leading to increased exposure of gp120 regions (including the V3 loop) that can bind to the co-receptors, mainly CCR5 or CXCR4 [43]. Finally, interaction of gp120 with the co-receptor induces a structural rearrangement of the trans-membrane Env-subunit gp41 and insertion of the fusion domain at the N-terminus of gp41 into the target cell membrane. At this stage, gp41 adopts a trimeric extended pre-hairpin intermediate conformation before the formation of a stable six-helix bundle structure, thus facilitating virus/cell-to-cell fusion. Although occurring with cell-free viruses, the efficiency of HIV-1 infection is higher when the virus is delivered through cell-to-cell contacts upon formation of the so-called virological synapses (VS) [44-49]. Indeed, DCs and macrophages, the first cells encountering HIV-1, efficiently transmit HIV-1 to CD4<sup>+</sup> T cells through these synaptic structures in which viral proteins and cellular receptors were shown to be polarized. This way of spread also occurs between HIV-1-infected and uninfected CD4<sup>+</sup> T cells [44, 50]. Notably, cell-to-cell fusion can lead to the formation of giant, multinucleated cells [3] called syncytia, which could precede apoptotic events *in vitro* [51]. *In vivo*, syncytia could generate long membrane tethers, thus facilitating viral dissemination [52].

During HIV-1 infection, many different mechanisms seem responsible for the death of infected and uninfected CD4<sup>+</sup> T cells. However, during the prolonged, asymptomatic phase of the disease, the death of uninfected bystander CD4<sup>+</sup> T cells is thought to be the main cause of CD4<sup>+</sup> T cell depletion. It is now well admitted that the gp41-mediated fusion process triggers activation of the intrinsic pathway of apoptosis, with activation of the caspases 9 and 3 [53-56]. Recently, abortive HIV-1 infection occurring in the vast majority of bystander quiescent CD4<sup>+</sup> T cells, was shown to be responsible for an inflammatory form of cell death called pyroptosis, with activation of caspase 1 and release of inflammatory cytokines [57, 58] upon viral DNA sensing by the interferon- $\gamma$ -inducible protein 16 (IFI16) [59, 60].

## 1.2. Macrophages

Macrophages are terminally differentiated, non-dividing cells, derived from circulating monocytes. They are present in most tissues with different denominations, e.g. microglia in the brain, alveolar macrophages in the lung, or Kupffer cells in the liver. Although circulating monocytes are relatively resistant to HIV-1 infection, macrophages can be productively infected and play important roles in the different phases of HIV-1 infection. In addition, they have been reported to be resistant to HIV-1-induced cytopathic effects, thus representing a significant viral reservoir population which can survive for a long time [61].

First, they act as antigen presenting cells (APC), leading to the presentation of HIV-1-derived peptides via major histocompatibility complex class II (MHC-II) and MHC class I (MHC-I) molecules to CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, respectively (for review see [62]). HIV-1-infected macrophages can also attract CD4<sup>+</sup> T cells through secretion of cytokines, thus favoring HIV-1 transfer upon cell-to-cell contacts or directly influencing viral spread by migrating and infiltrating other organs, including the brain.

Like CD4<sup>+</sup> T cells, macrophages express the main HIV receptors and co-receptors and can thus be infected by X4-tropic or R5-tropic viruses. However, they are more frequently and efficiently infected by HIV-1 R5 strains, which exploit low levels of

CD4 and/or CCR5 to enter macrophages [63, 64]. While macrophages express HIV-1 receptors, allowing viral entry via gp41-mediated plasma membrane fusion, the low level of CD4 seems to favor virus uptake through endocytosis, presumably due to the barrier formed by the actin cortex and the presence of intrinsic antiviral factors [65]. The favored model for productive HIV-1 entry in these cells would rely on endocytosis via lipid microdomains of the plasma membrane containing CD4 and CCR5, and the efficient gp41-dependent fusion after endocytosis, therefore allowing viruses to escape degradation [66-68]. This complex and yet unclear pathway was called “pathway of HIV endocytic entry in macrophages” (PHEEM) [66, 67]. Alternatively, productive infection of macrophages may occur after endocytosis of HIV-1 through a CD4-independent mechanism, although the inherent mechanisms are not yet fully elucidated and most of the incoming virions are mainly degraded by this way [69].

Additional cellular membrane receptors were described to support HIV-1 entry in macrophages, including syndecan, a heparin sulfate proteoglycan [70, 71]; gp340, a cysteine-rich scavenger receptor [72]; the macrophage mannose receptor [73-75]; elastase [76]; and  $\alpha$ -v-integrin [77] supposedly by facilitating viral attachment, binding, entry and/or fusion. Another potential membrane ligand of HIV-1 is annexin II, which is expressed on the membrane of macrophages, but not of T cells. Annexin II, which binds to phosphatidylserine (PS), an anionic phospholipid captured during HIV-1 budding, contributes to the early events of macrophage HIV-1 infection [78]. Other candidate host cell surface proteins that are incorporated in HIV-1 membranes and are potentially needed for HIV-1 entry might include CD28, CD44, and CD62L [79].

In infected macrophages, striking observations were reported on infectious viruses accumulating in cytoplasmic virus-containing compartments (VCCs), the nature of which is still debated. Although first described as internal compartments that possess the characteristics of late endosomes/multivesicular bodies (LEs/MVBs), these VCC are not acidified with a fraction of them connected to the plasma membrane [80-82]. Are these

compartments required to maintain a viral reservoir or do they represent a potential source for a rapid transfer of viral infection? The answer to this will require further investigation but an interesting recent report demonstrated that targeting these VCCs with antibodies directed against CD36 could block HIV-1 release and viral transfer toward CD4<sup>+</sup> T cells [83].

### 1.3. Dendritic cells

The two main DC subsets in the blood can be identified based on specific receptor expression. The most represented subset, although constituting only 0.5% of the whole peripheral blood mononuclear cells, belongs to the conventional or myeloid DC (cDC or myDC) and is usually characterized by the specific expression of CD1c (BDCA1) or CD141 (BDCA3) in parallel to myeloid markers like CD11c, CD13 and CD33. These cells migrate rapidly to inflamed tissues and secrete high levels of cytokines (like IL-6, IL-12, IL-15) and chemokines (CCL17, CCL22 for example) in response to microbial stimuli. Plasmacytoid DC (pDC) represent a rarer subset of cells (0.1-0.2% of the whole PBMC) mainly characterized by a plasma cell morphology and the specific expression of CD303 (BDCA2), CD304 (BDCA4/Neuropilin-1) and CD123 (IL-3 Receptor alpha-chain). Although pDC share some common markers, they are thought to be from lymphoid origin and were previously coined as interferon (IFN)-producing cells (IPC) due to their unique ability to rapidly secrete massive amounts of type 1 IFN following viral stimulation (for review see [84]), thus placing these cells at the forefront of innate immune response initiation.

Environmentally exposed surfaces of the body are privileged sites for other unique DC subsets. The human epidermal and mucosa upper layers are homogeneously populated with Langerhans cells (LC) mainly characterized by the specific expression of the C-type lectin receptor (CLR) CD207 (Langerin) whereas the subjacent layers present various dermal DC subsets (dDC), some of them expressing CD209 (DC-SIGN).

Although all these subsets could differ in phenotype and functions, one of their hallmarks is their propensity to regulate innate and adaptive immunity. Indeed, most of these subsets express a

plethora of pathogen recognition receptors (PRR) facilitating their antigen sampling activity and contributing to their quickness in efficiently igniting adapted immune responses.

There is now increased evidence that mucosal DC subtypes, macrophages and CD4<sup>+</sup> T cells are involved in the early events of HIV transmission [85, 86]. Indeed, in non-human primate models of simian immunodeficiency virus (SIV) infection, while CD4<sup>+</sup> T cells would represent the majority of infected cells, mucosal DC could be carriers of infection and amplify viral transmission rates [87-90]. Some reports also evidenced the involvement of other DC subsets early after acute infection and seemingly contributing to viral spread. In fact, pDC and myDC were shown to be recruited to infected tissues via the secretion of specific chemoattractants like CCL20 or thymic stromal lymphopoietin (TSLP), respectively [91, 92]. Activation of these DC subsets on site would lead to secretion of other chemokines (CCL3, CCL4 etc.), thus fueling the infected tissues with CD4<sup>+</sup> viral target cells and also contributing to the onset of immunopathogenesis linked to chronic immune activation. Indeed, recent reports clearly evidenced a systemic redistribution of pDC to mucosal tissues of chronically infected macaques [93, 94] which could account for the chronic immune activation. Accumulation of pDC and myDC was also observed in lymphoid tissues of chronically HIV-infected patients [95].

Although most myeloid DC subsets appeared to be refractory to productive HIV infection, these cells can readily capture and internalize virions via different receptors expressed at the surface. All DC subsets express the main HIV receptor CD4 and the co-receptors CCR5 and CXCR4, although the levels of expression vary depending on the subsets [96-99]. It is now becoming clear that productive HIV-1 infection of most DC subsets is profoundly impeded at a post-entry level due to the expression [100, 101] and phosphorylation status [102, 103] of the deoxy-nucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1, an important regulator of the intracellular dNTP pool [104-106]. DC subsets also possess other important antiviral activities affecting different steps of the viral replication cycle [107-110]. Although not supposed to lead to

an efficient productive infection, there are other portals for viral entry via binding to other receptors, some of them being specifically expressed in DC subsets. Indeed, carbohydrate-binding receptors are widely expressed on all DC subsets and were reported to represent the dominant HIV-envelope receptors in myeloid DC [111, 112]. Some of these receptors, like CD209 (DC-SIGN), CD206 (Mannose receptor), CD207 (Langerin) or CLEC4A (DCIR) belong to the C-type lectin receptor (CLR) family and were demonstrated to internalize HIV and regulate DC-mediated viral transmission toward CD4<sup>+</sup> T cells [112-115]. Interestingly, most of these CLR were also reported to contribute to immune responses upon pathogen capture and internalization [116-120]. Outstandingly, targeting antigens to DC via these CLR was reproducibly showing enhanced humoral and cellular immune responses thus rendering this approach attractive for innovative prophylactic strategies [118, 121, 122]. However, some of these CLR can be used by HIV to escape immune recognition and to favor viral spread. For instance, upon internalization into DC, some virions can escape lysosomal-mediated degradation and remain over time in a tetraspanin-rich compartment [123], suggested to be a source for viral transfer toward CD4<sup>+</sup> target T cells. The complexity of HIV entry into DC and the inherent intracellular viral trafficking require further investigation in order to find potential treatments able to tackle the early events of HIV infection and transmission.

#### **1.4. Neuronal cells**

The BBB isolates the CNS from the blood stream and thus may favor viral escape from immune surveillance and persistence for pathogens that have the ability to cross this cellular structure. HIV can access the CNS soon after the initial infection by using cells of the immune system such as T cells and macrophages, a process coined “trojan horse” [124, 125]. Once in the brain, HIV infects and replicates in macrophages and microglial cells as well as, in a restrictive manner, in astrocytes and neural precursors (NPCs). Following this neuronal invasion, and in correlation with the viral load, cognitive deficits known as HIV associated neurocognitive disorder (HAND) will appear in up to 50% of HIV patients [126].

Due to the lack of CD4 expression, neurons are not direct targets for HIV infection. Nonetheless, neurotoxicity is found in HAND patients and is associated with lower quality of life and decreased lifespan. In the most severe cases, patients develop HIV-associated dementia (HAD), which is one of the most important complication associated with AIDS. In this light, HAD closely resembles pathologies such as Alzheimer's and Parkinson's diseases [127-129].

It is commonly accepted that HAND results from two intertwined effects due to viral and host factors. By infecting cells of the circulating and local immune systems, HIV triggers neuro-inflammation associated with selective neuronal apoptosis, mostly through chemokine and cytokine release [130, 131]. Moreover, some viral proteins such as gp120 and Tat can induce specific signals that are associated with neurotoxicity [132-135]. Notably, these proteins can directly interact with neurons, be internalized and activate signaling cascades.

As delivery of HAART in the CNS can be poorly efficient, infected brain cells are often referred to as reservoirs for HIV and thus represent particularly important therapeutic targets.

Microglial cells are considered as the equivalent of resident macrophages in the brain and represent 10-15% of glia cells [136]. They are distributed in a widespread manner in the brain and spinal cord but occupy a defined territory. After activation, they can change their morphology, migrate, proliferate and phagocytose. They are the main brain target for HIV as they represent the main source of active HIV infection in the CNS [130, 137]. Like macrophages, they can be directly activated by HIV infection, or by the interaction of viral proteins or host factors released by surrounding infected cells. In turn, activated microglia cells will secrete host factors such as chemokines, cytokines and excitatory amino acids that will have key roles in HIV-associated neurotoxicity [130, 137, 138].

Astrocytes are the most abundant cell type in the brain and can be infected by HIV but harbor non-productive infection. Only a small population of astrocytes seems to be infected and the exact relevance in HAND mechanisms is still poorly

described. Evidence suggests that the BBB integrity will be impaired by infected astrocytes [139].

NPCs have the ability to generate neurons and glial cells both during development and adulthood. Indeed, adult neurogenesis allows, in defined regions of the CNS, the generation and integration of new neurons, which can modulate existing neuronal networks and complex cognitive tasks such as learning and memory. Contrary to fully differentiated neurons, HIV has been shown to infect developing and adult NPCs. These cells are also believed to act as a major reservoir for HIV [140]. Moreover, infected NPCs have been shown to be able to differentiate into astrocytes, which still contain viral genomes and therefore allow (restrictive) viral replication [141, 142]. Here also, viral proteins may have a direct effect on NPCs: gp120 is shown to trigger mental retardation in rodent models [143] and induces quiescence in NPCs [144] and cell cycle arrest in adult NPCs [145], whereas Tat is reported to affect NPC proliferation and differentiation [146, 147].

To fight invading microorganisms, such as HIV-1, the cells have a combination of essential defense mechanisms. One of the most ancient and powerful mechanisms is autophagy, a dynamic and tightly regulated pathway that degrades intracellular components upon fusion with lysosomes.

## 2. Autophagy

Autophagy is a fundamental and highly regulated lysosomal degradation mechanism which is dependent on specialized autophagy-related proteins (Atgs) [148]. This mechanism plays essential physiological roles in survival, homeostasis and development. It is also involved in the defense against invading intracellular pathogens and acts in both innate and adaptive immunity. Autophagy can be classified into at least three different types: macroautophagy, microautophagy and chaperone-mediated autophagy (CMA) [149]. Macroautophagy is the major lysosomal route for the turnover of cytoplasmic constituents, and will be hereafter referred to as autophagy. It is characterized by a highly dynamic flux initiated with the formation of intracellular isolation membranes, called phagophores. The origin of the membranes is still

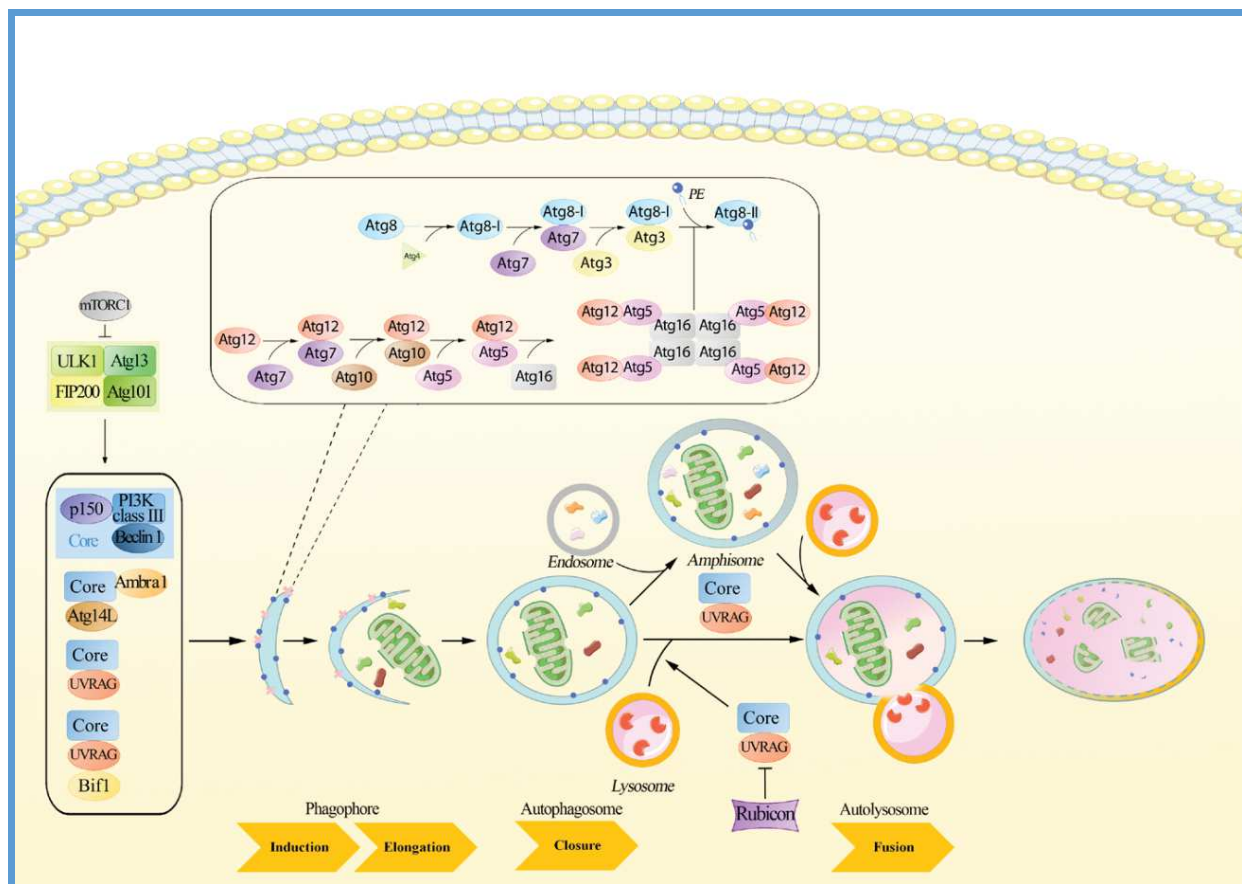


highly debated and may involve different sources such as endoplasmic reticulum (ER), mitochondria, Golgi, plasma membrane and recycling endosomes [149]. Phagophores engulf cytoplasmic material through membrane elongation and the formation of autophagic vacuoles, called autophagosomes [148, 150, 151]. Then, autophagosomes fuse with lysosomes to form autolysosomes. Before this step, autophagosomes can also fuse with endosomes to form amphisomes, making a direct connection between the endo-lysosomal and autophagic pathways. Upon degradation of the sequestered material by lysosomal hydrolases, constituents are recycled through lysosomal transporters toward the cytosol [152, 153]. It is important to note that several autophagy-related proteins might have autophagy-independent functions, including cell division, cell death, regulation of the inflammatory immune response and resistance to pathogens [154-156].

Several specific protein complexes are successively involved in this process (Figure 1) (for reviews, [157-159]). The first complex involved in the initiation step of autophagy is the ULK1/2 complex, composed of ULK1/2, Atg13, Atg101 and FIP200 ([160, 161] for review). It is under the control of the mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1 (MTORC1) [162], which represses autophagy under nutrient rich conditions whereas, in most instances, AMP-activated protein kinase (AMPK) activation can inversely promote autophagy initiation ([161] for review). Of note, The ULK1/2 complex controls the trafficking of Atg9 from the plasma membrane to phagophores [163].

The second complex is composed of class III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3KC3), Beclin 1, p150 and Atg14L, which produces an autophagy-specific pool of phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) [164, 165]. Several additional proteins interacting with Beclin 1 ensure a timely and spatial regulation of PI3P formation during the autophagy process. These proteins can act as autophagy repressors, such as Bcl-2 present in the ER, or as autophagy stimulators, such as Ambra 1 [166], WIPI2 [167] and DFCP1 (double FYVE domain containing protein 1) [168] and are the major effectors of the PI3P produced.

Two unique ubiquitin (Ub)-like conjugation systems drive the elongation and closure of the phagophore. In the first conjugation system, Atg12 is conjugated to Atg5, in a reaction mediated by the E1-like enzyme Atg7 and the E2-like enzyme Atg10 [169]. However, in contrast to the conventional ubiquitin conjugation system, no specific and exclusive E3-like enzyme has been discovered so far. Another autophagy-related protein Atg16L1, was demonstrated to interact with the Atg12-Atg5 conjugate in order to regulate the localization of the protein complex to isolation membranes while also specifying the site of LC3 lipidation. The second conjugation system is quite unusual by the fact that proteins of the Atg8 family could be directly conjugated to the lipid phosphatidylethanolamine (PE) through a mechanism controlled by Atg7 and Atg3, another E2-like enzyme [170, 171]. In humans, the Atg8 family comprises three microtubule-associated protein, 1 light chain 3 (LC3A, B and C), one gamma-aminobutyrate receptor-associated protein (GABARAP) and three GABARAP-like proteins (GABARAPL1-3) that can be linked to PE [172]. However, only LC3B has been extensively studied, and will be hereafter referred to as LC3. Interestingly, the Atg12-Atg5 conjugate acts as an E3 for the conjugation of LC3 to PE [173]. LC3 is synthesized as pro-LC3 and is very rapidly processed by the protease Atg4 to expose its C-terminal glycine [174, 175]. During autophagosome formation, this cytosolic, soluble form of LC3 called LC3-I, can be conjugated to PE to generate the lipid-conjugated form of LC3, or LC3-II, which becomes tightly associated with the autophagosomal membrane while the Atg5-Atg12 conjugate is removed from the vesicle. Importantly, LC3-II can also return to an unlipidated state via the proteolytic activity of Atg4, suggesting that this process could be reversible. Other autophagy-related proteins, like UV radiation resistance associated (UVRAG) and ATG9 were described to participate in autophagosome formation via their contribution in recruiting the PI3KC3-Beclin1 complex to the autophagic precursor structures [176]. Of note, Atg14L and UVRAG bind to Beclin 1 in a mutually exclusive manner and ATG14L was shown to be critically required for autophagy induction [177, 178]. The UVRAG-Beclin 1-PI3KC3 complex seems to modulate the



**Figure 1. Overview of the autophagic pathway.**

The autophagic process begins by the formation, in the cytoplasm, of a double membrane called the phagophore. This structure elongates and sequesters cellular constituents such as organelles, proteins and pathogens. After the phagophore closure, the vacuole called autophagosome can fuse with a lysosome in order to digest and recycle the sequestered material. Autophagy is connected to endocytosis because autophagosomes can fuse with endosomes, to form amphisomes, which then fuse with lysosomes.

Three signaling complexes are involved in the induction, the elongation and the closure steps of autophagy, leading to the formation of autophagosomes:

- The ULK complex, composed of ULK1/2-Atg13-FIP200-Atg101, responsible for autophagy initiation, is regulated by the mTOR kinase.
- The class III PI3Kinase, associated with p150 and Beclin 1 (core complex), is responsible for the formation of the phagophore. Ambra1 and Bif-1 are essential for induction of autophagy, through direct interaction with Beclin 1 and UVRAG, respectively, whereas Bcl-2 binds to Beclin 1 and disrupts the Beclin 1-associated PI3K class III complex, thereby inhibiting autophagy.
- Two ubiquitination-related conjugation systems leading to the formation of the Atg12-Atg5-Atg16L complex and the LC3-II-PE complex, are required for the elongation and closure of the autophagosome. Atg12 is conjugated to Atg5 by the action of the E1 enzyme Atg7 and the E2 enzyme Atg10. The resulting conjugate forms a complex with Atg16L. Likewise, Atg8, which is first processed by Atg4 is conjugated to a lipid, the phosphatidylethanolamine (PE), by the action of Atg7 and the E2 enzyme Atg3. The Atg12-Atg5-Atg16L complex acts as an E3 ligase facilitating the conjugation reaction of Atg8 to PE.

The core complex containing UVRAG, is also involved at the level of fusion between autophagosomes and lysosomes. Rubicon inhibits this step by acting on UVRAG.

expansion and curvature of autophagosomal membranes, with the transient association of Bif-1 to UVRAG [179]. Another UVRAG-Beclin 1-PI3KC3 complex plays a major role in the maturation step of autophagy [176, 180, 181] which could be negatively controlled by the RUN domain-containing protein Rubicon [178].

Autophagy has long been considered to be a nonselective bulk degradation pathway. However, there is growing evidence that it can act as a selective pathway leading to the degradation of specific organelles, such as mitochondria and peroxisomes, misfolded proteins and protein aggregates as well as pathogens. By definition, the selectivity should rely on a specific recognition of potential substrates. Indeed, this function is supported by cargo receptors that bind to both “eat-me” signals and Atg8 family members present on the autophagosomal membrane. The “eat-me” signals are generally molecules of ubiquitin, with the exception of galectin-8 present on bacteria [182]. Binding to Atg8 family engages a specific motif called a LC3-interacting region (LIR), with the general sequence W/F/YxxI/L/V preceded by acidic residues [183-188]. The first selective autophagy receptor to be identified was p62 (SQSTM1) [187, 189, 190], and then the related neighbor of BRCA1 gene 1 (NBR1) [191], nuclear dot protein 52 kDa (NDP52) [192] and optineurin [193]. A noncanonical LIR motif termed CLIR, which preferentially binds to LC3C was identified in the NDP52 sequence [194]. Several autophagy receptors specific for the degradation of mitochondria, termed mitophagy, have also been discovered ([195] for review).

### **2.1. Autophagy during viral infections**

Autophagy is usually activated rapidly after a viral infection by different mechanisms depending on both viruses and host cells. The interaction between the virus and its receptors can directly trigger autophagy. This is the case for the attenuated strains of the measles viruses for which engagement of its cellular receptor triggers autophagy [196]. Furthermore, viral entry relying on a fusogenic envelope protein can also induce autophagy, as it is the case for HIV-1 and as described in section 3, subsection 3.1.1. Also, many viral infections trigger a cellular stress, such as ER stress, due to accumulation of unfolded

proteins, cell damage, production of reactive oxygen species (ROS), and/or mitochondrial depolarization, leading to autophagy induction. It was also recently shown that activation of RNase L during viral infections induces autophagy [197]. Autophagy could as well be induced upon engagement and stimulation of various pattern recognition receptors (PRR), including several Toll-like receptors (TLR) and the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) [198, 199]. Viral proteins can also induce autophagy. For example, the non-structural measles virus protein C was shown to participate in autophagy induction upon viral replication [200] and the hepatitis C virus (HCV) nonstructural proteins 4B (NS4B), 5A (NS5A) and 5B (NS5B) were shown to co-localize with autophagosomal membranes or autophagy-related proteins and positively regulate autophagy initiation [201, 202]. Recently, a study from the group of F. Randow demonstrated that the influenza viral protein M2 can redirect LC3 toward the plasma membrane supposedly to facilitate virion budding and stability [203]. Interestingly, viral replication concomitantly with the synthesis of viral proteins can increase energy requirements, thus triggering autophagy [204]. Finally, autophagy is indirectly triggered by IFN- $\gamma$  which supports its role in innate immunity, hence contributing to inflammation by facilitating an IFN- $\gamma$  response and signal transduction [205].

Since autophagy is a fundamental and general process involved in fighting viral infections, the viruses have evolved strategies to counteract or to exploit autophagy for their own benefit ([204, 206-209] for reviews). In this review, we intend to describe several mechanisms by which viruses can manipulate autophagy. However, the relationship between a virus and the autophagy response is often more complex. Indeed, autophagy can be differentially subverted by viruses depending on target cells and viral strains. Pathogens can also sequentially block or control autophagy during their life cycle or take advantage of the formation of autophagy membrane while blocking the later step of lysosomal-mediated degradation. Ultimately, viruses can also interfere with several autophagy-related proteins without acting on the canonical, autophagy process. Because autophagy is involved in a complex cross-talk between cellular homeostasis

and apoptosis, usurping or modulating autophagy could therefore benefit viruses in controlling the survival of infected cells.

## 2.2. Autophagy as an antiviral mechanism

Autophagy is an essential pathway of host defense against viral infection that can degrade entire viruses or specific viral proteins by a process termed xenophagy [210].

There are growing reports on autophagy-dependent lysosomal-mediated degradation of viruses or viral components. Indeed, the autophagy pathway was reported to restrict infection *in vivo* by herpes simplex virus 1 (HSV-1) [211], sindbis virus (SIN) [212] and rift valley fever virus (RVFV) [213], although these observations were not fully recapitulated when investigating viral replication *in vitro*. This apparent discrepancy could be explained by the cellular-dependent context as well as by potential antiviral countermeasures developed by those viruses. Indeed, the importance of autophagy in antiviral immunity is strongly supported by the countermeasures and adaptations that viruses have evolved to dysregulate or limit specific steps of autophagy. For example, the viral protein ICP34.5 from HSV-1 and some viral proteins encoded by the  $\gamma$ -herpesviruses (HV68 M11, KSHV vBcl-2) were reported to inhibit autophagy through a physical interaction with Beclin 1, thereby impeding autophagy initiation (reviewed in [214]). The conjugation of LC3 to PE was also shown to be impaired upon binding of the FLICE-like inhibitory protein (FLIP), encoded by the kaposi sarcoma-associated virus (KSHV), to Atg3 [215]. Later stages of autophagy, and particularly fusion with lysosomal compartments, could also be targeted by viruses as evidenced by the action of the HIV viral protein Nef [216], the influenza virus matrix protein 2 (MP2) [217] or the hepatitis B virus X protein (HBX) [218]. Additionally, human cytomegalovirus (HCMV) infection of human fibroblasts was reported to inhibit autophagosome formation [219, 220] and vaccinia virus (VV)-mediated aberrant conjugation system and LC3 lipidation were suggested to be the cause of autophagy inhibition [221]. Also, recent reports on human papillomavirus-16 (HPV-16) infection revealed that viral envelope-mediated signaling

events leading to activation of the mTOR pathway correlated with inhibition of autophagy [222]. This would, however, need confirmation because in the same time another study reported a HPV-16-mediated induction of antiviral autophagy upon infection of primary human keratinocytes [223].

Furthermore, specific degradation of viral components by autophagy has been described for only three viruses, the sindbis virus (SIN), the chikungunya virus (CHIKV) and the herpes simplex virus 1 (HSV-1). The sindbis capsid protein was shown to be targeted for autophagy degradation via the interaction with p62 and with the participation of the HECT domain-containing E3 ligase, Smad-ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1), also important for the mitophagy process [224]. Smurf1 also appeared to be required for the degradation of HSV-1, but seemingly dispensable for general autophagy. Interestingly, the Ub E3 ligase domain of Smurf1 is dispensable for its function in selective autophagy. In the same way, it has been shown that p62 binds to ubiquitinated capsid of CHIKV and targets it to autophagic degradation [225].

Besides the direct role of autophagy in degrading viruses or viral components, autophagy can also stimulate the production of antiviral cytokines through production of type-I IFN. Indeed, in a cell-dependent context, virus-induced autophagy was shown to be important for the delivery of viral nucleic acids to endosomal and cytosolic PRR, thus contributing to the global innate immune response against invading pathogens. Interestingly, while autophagy was shown to be required for type I IFN secretion in response to DNA-immune complexes [226], a recent study reported that autophagy-related proteins could also be involved in the negative feedback regulation of innate immune responses due to the direct interaction between the cytosolic DNA sensor cyclic GMP-AMP (cGAMP) synthetase (cGAS) and Beclin-1 [227]. At a glance, the underlined mechanisms reveal a high level of complexity but the coincidental relationship between autophagy, inflammation and antiviral innate immunity warrants, undoubtedly, further investigation to appreciate all the parameters and cellular factors linked to autophagy involved in such processes.



While autophagy can be an important component of innate antimicrobial immunity, it is becoming clear that this pathway and associated autophagy-related proteins are readily involved in the regulation of antigen processing and adaptive immune responses. It is already known that MHC-II-mediated presentation of endogenous antigens was dependent on cytoplasmic proteases, including the proteasome and calpain as well as non-proteasomal proteases [228, 229]. Interestingly, previous studies reported that autophagy was regulating the trafficking of the invariant chain Ii, a specialized MHC II chaperone, towards endolysosomal compartments [230] and an inhibitor of autophagy could prevent MHC-II-mediated presentation of the biosynthesized endogenous fifth component of mouse complement C5 [231]. This suggests that autophagy flux modulation was regulating the intracellular antigen flux toward lysosomal compartments before reaching MHC-II molecules. Thereafter, major publications reported that autophagy flux modulation was indeed influencing MHC-II cross-presentation of endogenous antigens [232-235], reinforcing the hypothesis of a non-proteasomal proteolytic machinery involved in cytosolic or nuclear antigens presentation by MHC-II molecules. Further consolidating evidence came from data showing that the viral protein MP1 from influenza fused to LC3 led to an increased MHC class II-mediated antigen presentation to influenza-specific CD4<sup>+</sup> T cell clones [236]. These observations were supported by other models of viral infection [235, 237-239], bacterial infection [234, 240, 241] and even in the context of thymocytes selection driven by intracellular self-antigens loaded on thymic epithelial cell MHC-II molecules ([242-244] and see Figure 2). Of note, another autophagy-related process, CMA, was also reported to facilitate MHC-II-mediated presentation of cytoplasmic antigens in B cells via the lysosomal Lamp2A/Hsc70 complex [245].

Autophagy-related organelles and proteins were also known to intersect with internalized pathogens and endocytic trafficking [246-248], possibly also involving this pathway in extracellular antigen presentation. Indeed, it seems clear now that autophagy can also regulate conventional MHC-II-mediated antigen presentation [249-254], MHC-I-mediated presentation of endogenous

antigens [238, 255, 256] and also MHC-I cross-presentation of antigens derived from dying or tumor cells [257, 258]. All these data therefore support a more selective process regulating autophagy-mediated antigen presentation, although the mechanisms brought into play in such a process require further investigation.

Interestingly, some recent reports shine some light on the possible involvement of cell surface PRR in driving specificity toward autophagy-mediated lysosomal degradation which could thus regulate antimicrobial immunity [249, 259].

### **2.3. Autophagy as a pro-viral mechanism**

Several data converge toward the fact that viruses, mainly RNA ones, can use autophagy-related organelles as replication platforms, thereby promoting viral replication. Interestingly, some of them, including coxsackievirus B3 [260, 261] and rotavirus [262] are able to induce autophagy while blocking the fusion between autophagosomes and lysosomes to avoid their degradation. Some viruses, including dengue virus, poliovirus and CHKV seem to require the whole autophagy process in defined cell types, *i.e.*, the acidic maturation step (for review [263]), while others might require only components of cellular autophagy, like for the murine hepatitis virus (MHV) [264] although this was not confirmed by others [265].

Induction of programmed cell death is also an important host defense mechanism against intracellular pathogens. Indeed, for a multicellular organism, it is advantageous to let infected cells die to thwart viral replication and dissemination. Considering the numerous interconnections between autophagy and apoptosis [266], and the fact that autophagy was already shown to contribute to cell survival after different stresses, including infections [209], virus-induced autophagy may thus counteract the antiviral effect of apoptosis by keeping infected cells alive until the viral replication cycle has been completed. This phenomenon was shown for several viruses, such as the human parvovirus B9, the influenza A virus, CHIKV, and SIN, as they can downregulate apoptosis through activation of autophagy [212, 267-269].

Autophagy is also a recycling pathway that provides free amino acids or fatty acids from

degradation of proteins or lipids, respectively. These new metabolites are then reused either as sources of energy or building blocks for the synthesis of new macromolecules. The dengue virus is the only one described until now that exploits the recycling function of autophagy. Its infection induces lipophagy (selective degradation of lipids droplets by autophagy) and thus release of free fatty acids, which undergo  $\beta$ -oxidation in mitochondria to generate adenosine triphosphate (ATP) [270].

Even if many viruses may utilize autophagy to degrade host restriction factors or to mature proteins involved in the viral life cycle, the data available are very few. One example is the cleavage of the capsid protein VP0 of the poliovirus in autolysosomes, leading to the maturation of a noninfectious virus to an infectious one [271].

### 3. Autophagy during HIV-1 infection

Data on the relationships between HIV-1 and autophagy are still fragmentary and further investigation is required. However, from the current literature, autophagy is recognized as an important anti-HIV-1 process manipulated by the virus for its own replication. This process is at the center of the innate and adaptive immune responses against HIV-1. Its regulation depends on the cell type ( $CD4^+$  T cells, macrophages or dendritic cells) and the status of the cells (*i.e.*, infected or non-infected cells). However, several Atgs including Atg7, Atg12, Atg16L, and GABARAPL2 appear to be required for HIV-1 infection [272] and strikingly, autophagy is also responsible for Env-mediated apoptosis of bystander  $CD4^+$  T cells.

#### 3.1. Regulation of autophagy in $CD4^+$ T cells

##### 3.1.1. Autophagy in uninfected $CD4^+$ T lymphocytes

HIV-1 infection is characterized by a progressive decline in the number of  $CD4^+$  T lymphocytes in untreated infected patients, ultimately leading to AIDS. Several mechanisms induced by HIV-1 infection are involved in the death of these cells by apoptosis, and Env exerts a major role in this process. HIV-Env can be considered as a pathological ligand as its interaction with cellular receptors ( $CD4$ ,  $CCR5$  or  $CXCR4$ ) constitutes the

primary interface between viruses and  $CD4^+$  T cells. Interestingly, the majority of cells dying during HIV-associated disease progression are not infected. In accordance, several studies have demonstrated that infected cells expressing Env at the cell surface, are able to induce apoptosis of bystander uninfected  $CD4^+$  T lymphocytes upon binding to either  $CXCR4$  or  $CCR5$  [56, 273-275].

There are multiple cross-talks between autophagy and apoptosis. We have demonstrated that Env expressed on HIV-infected cells induces autophagy, subsequently required to trigger  $CD4^+$  T cell apoptosis [276]. Indeed, the blockade of autophagy at different steps, by either drugs (3-methyladenine or Bafilomycin A1) or by short interfering RNAs specific for *beclin 1/atg6* and *atg7* genes, inhibited the Env-induced apoptotic process. Even if the presence of  $CD4$  and the co-receptor on uninfected target cells was required for Env-mediated autophagy, this process was independent of these receptors signalling pathways but rather depended on the gp41 fusion activity [277]. Both hemifusion and complete fusion, which leads to the formation of syncytia triggered autophagy in bystander  $CD4^+$  T cells. Notably, the deletion of the C-terminal part of gp41 enhanced Env-induced autophagy and apoptosis [277].

Recently, Doitsh *et al.* have identified a new mechanism of uninfected  $CD4^+$  T cell death during HIV-1 infection called pyroptosis, defined as a caspase-1-mediated cell death involving the release of pro-inflammatory cytokines. Pyroptosis could be triggered by abortive viral infection in quiescent lymphoid  $CD4^+$  T cells [58]. It would be interesting to analyze the possible involvement of autophagy in pyroptosis-associated uninfected  $CD4^+$  T cell death.

##### 3.1.2. Autophagy in productively infected $CD4^+$ T lymphocytes

After its entry in  $CD4^+$  T lymphocytes, the RNA viral genome of HIV-1 is retro-transcribed into DNA before integration into the host cell genome. In quiescent naive  $CD4^+$  T cells, this last step does not occur and in this case, autophagy-dependent cell death would occur. In contrast, activated  $CD4^+$  T cells are permissive to HIV replication with *de novo* production of viral particles. Interestingly, in these productively infected  $CD4^+$

T cells, autophagy appeared to be completely blocked [278-280]. Indeed, after a co-culture between target CD4<sup>+</sup> T cells and HIV-1-infected cells, two target cells populations were observed: a population of highly autophagic uninfected cells and a population of productively infected cells in which autophagy was impaired. Moreover, the level of LC3-II and Beclin 1 were dramatically decreased in the population of productively infected cells [279, 280]. These results suggested that a newly synthesized viral determinant, produced after the provirus integration step, was able to block autophagy [279]. Interestingly, induction of autophagy in productively infected CD4<sup>+</sup> T cells with drugs acting on the MTORC1 complex, decreased the production of new viral particles (our unpublished data), indicating that autophagy could behave as an anti-HIV process, however counteracted by the virus in order to replicate efficiently. To date, the mechanism by which HIV-1 could interfere with this essential cellular pathway is still under investigation. As seen before for other viruses, the way to understand the relationship between HIV-1 and autophagy is seemingly paved with complexity. Indeed, data from a genome-wide RNAi screen [272] and silencing of 30 candidate cofactors [281] indicated that HIV-1 replication in cells might require the presence of several Atgs (Atg7, GABARAPL2, Atg12, and Atg16L). A very recent study underlined the role of several Atgs, in particular Atg5 and Atg16, in HIV-1 replication in CD4<sup>+</sup> T cells [282].

It is worth noting that autophagy-related proteins can also function independently of the autophagic process, and this aspect has to be taken in consideration when trying to decipher the link between autophagy, autophagic proteins and HIV-1 infection.

### **3.2. Regulation of autophagy in macrophages**

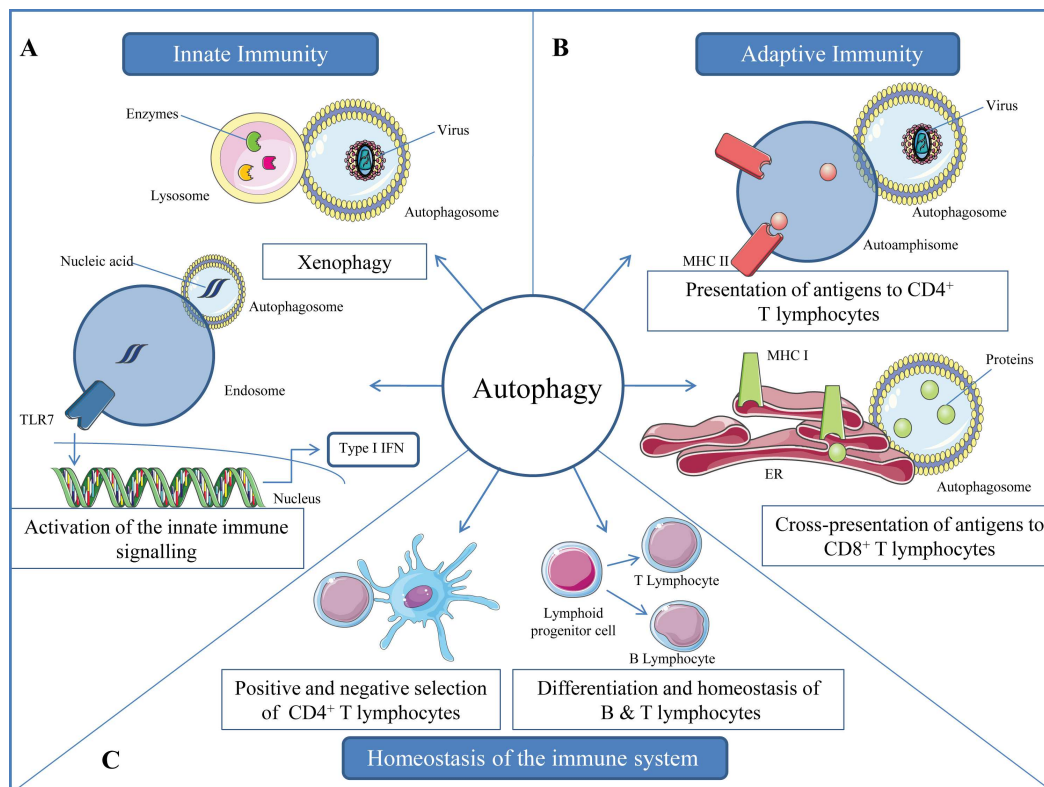
#### **3.2.1. Autophagy in uninfected macrophages**

In contrast to bystander CD4<sup>+</sup> T cells, autophagy induction was not observed in uninfected cells from the monocyte/macrophage lineage after contact with cells expressing HIV-1 R5 or X4 Env, although these cells were definitely susceptible to autophagy induced by pharmacological means [279]. The state of differentiation was

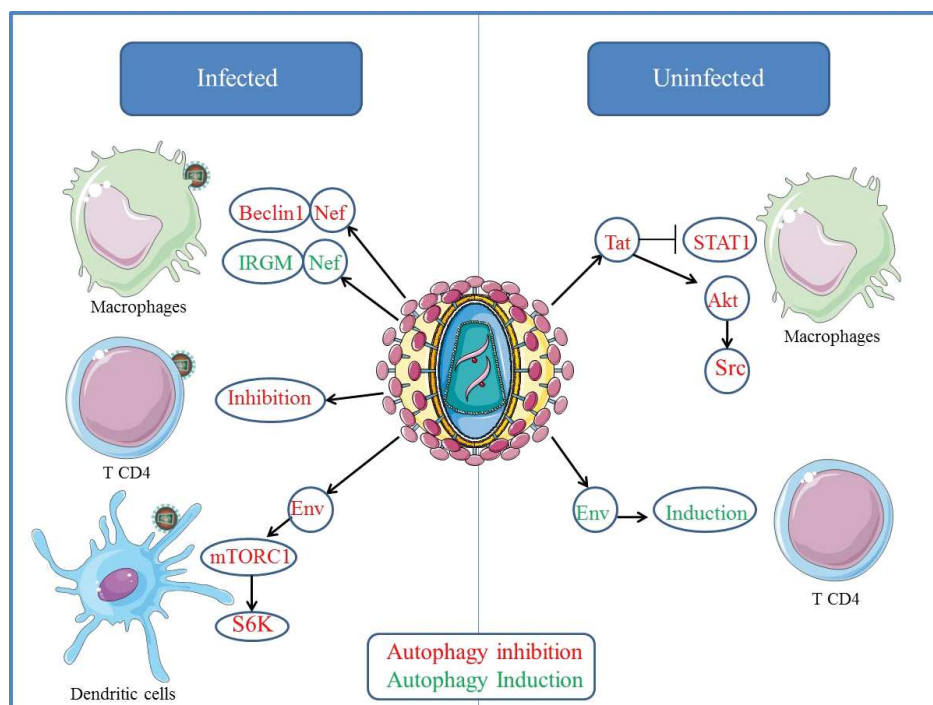
seemingly not responsible for their intrinsic resistance to Env-mediated autophagy. Furthermore, Van Grol *et al.* demonstrated that the absence of autophagy observed in these target cells could be due to the simultaneous activation of Src-Akt and STAT3 by HIV-1 Tat and IL-10, pathways previously known to inhibit autophagy [283]. As Tat upregulates IL-10, the release of Tat from HIV-1- infected cells in the presence of increased concentrations of IL10 can lead to a blockade of autophagy in neighboring, uninfected macrophages, independently of the presence of Env and Nef [283]. HIV-1 Tat was also shown to perturb IFN- $\gamma$  signaling in monocytes through the suppression of STAT1 phosphorylation [284] and consequently inhibiting MHC-II antigen expression. Recently, Li and collaborators demonstrated that Tat could suppress IFN- $\gamma$ -induced autophagy in primary macrophages [285], suggesting that inhibition of autophagy could impair the immune defenses by blocking the antigen processing for the recognition and killing of intracellular pathogens. This result correlated well with the physiopathology of HIV-1 infection. Indeed, macrophages do not undergo Env-mediated apoptosis and are not subjected to depletion during HIV-1 infection. However, it raises many unsolved questions, including why the fusogenic function of gp41 induces autophagy only in CD4<sup>+</sup> T cells and why Tat and IL-10 do not inhibit autophagy in the bystander CD4<sup>+</sup> T cells. While further investigation is needed to elucidate these major differences, one hypothesis would rely on the differential gp41-induced perturbations triggered at the membrane of macrophages or CD4<sup>+</sup> T cells. Indeed, HIV-1 can enter macrophages by endocytosis, and additional specific interactions with host membrane molecules following Env binding to the receptor/co-receptor could be involved (described in the paragraph 1.2.). The functions of these two types of cells are also highly different, and macrophages are more prone to autophagy triggering than CD4<sup>+</sup> T cells, which may also explain the observed differences.

#### **3.2.2. Autophagy in productively infected macrophages**

Conversely, in cells from the monocyte/macrophage lineage, autophagy is induced following productive infection through contact with HIV-1



**Figure 2**



**Figure 3**



X4 or R5-infected effector cells [279]. Surprisingly, two populations of autophagic cells are present: one highly autophagic and the other weakly autophagic, and viruses could be detected in the weakly autophagic cells but not in the highly autophagic cells, suggesting that autophagy might still be controlled by HIV-1 in these cells to avoid degradation. Interestingly, the early steps of autophagy promoted HIV-1 production since blockade of this process dramatically decreased the quantity of HIV-Gag p24 [216, 279]. In addition, the HIV-1 precursor Gag was found in complexes with LC3 and was also present in LC3-II-enriched membranes, suggesting that autophagy could favor Gag processing and thus production of viral particles [216]. In contrast, the degradative step of autophagy behaves with anti-HIV-1 activity and therefore, needs to be controlled by the virus to prevent its degradation. Indeed, blockade of the degradative step of autophagy increased HIV-1 production [216, 279]. Interestingly, the auxiliary HIV-1 protein Nef was shown to play a major role in the inhibition of the degradative stage of autophagy by binding to Beclin 1 [216]. Nef also interacted with immunity-associated GTPase family M (IRGM), a protein known to play an autophagy-dependent anti-bacterial function [286-288] and to bind to several key proteins of the autophagy process such as Atg5 and Atg10 [289]. Nef/IRGM interaction promoted autophagosome accumulation and improved HIV-1 replication [289]. In contrast,

its absence is detrimental for viral production. IRGM also triggers autophagy in cells infected by other RNA viruses, such as Hepatitis C virus (HCV) and Measles virus (MeV), suggesting that different RNA virus families use similar strategies, involving IRGM, to fine-tune autophagy to their own benefit.

In addition to HIV-1 proteins expressed through a transcript initiating from the promoter-harboring 5' long terminal repeat (LTR) region, antisense transcription leads to expression of the antisense protein ASP [290-293]. This protein is unstable in mammalian cells and seems to multimerize *in vitro*. ASP partially colocalizes with LC3 and preliminary data suggest that expression of ASP induces autophagy in the promonocytic U937 cell line and increases viral replication [294]. One hypothesis is that ASP might induce autophagy but then get degraded by autophagy as already shown for the human T-lymphotropic virus (HTLV) protein Tax, thus imposing a positive feedback on its own stability [295].

### 3.3. Regulation of autophagy in DC

As mentioned above, the autophagy pathway can behave as an important effector of DC-mediated antiviral immunity. In the context of HIV-1 infection of DC, an exhaustion of autophagy-related organelles was rapidly observed upon viral challenge [249]. Interestingly, this was paralleled with the appearance of the compartmentalized virus evidenced hours after viral challenge [249, 250].

---

#### Legend to Figure 2. Crosstalks between autophagy and the immune systems during viral infection.

- A. Autophagy and innate immunity: Autophagy can directly degrade intracellular pathogens after their sequestration in autophagosomes (xenophagy). It can also stimulate the production of type 1 IFN by allowing the delivery of viral nucleic acids to TLR7-containing endosomes.
- B. Autophagy and adaptive immunity: Pathogenic antigens can be presented to CD4<sup>+</sup> T lymphocytes by MHC II molecules after fusion of autophagosomes with MHC II-containing endosomes. Autophagosomes can allow the delivery of pathogenic antigens to MHC I molecules for a cross-presentation to CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.
- C. Autophagy and homeostasis of the immune system: Autophagy is involved in both the positive and negative selection of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, and in the differentiation and maintenance of B and T lymphocytes.

#### Legend to Figure 3. Interactions between HIV-1 and autophagic proteins.

The figure shows the complex relationship between the different HIV-1 and autophagic proteins in the different cellular types that constitute the HIV-1 target cells. The figure also illustrates the different autophagy modulation behavior of HIV-1 on its target cells according to their infection status (i.e. whether they were infected or not). Pathways leading to inhibition of autophagy are indicated in red, and those triggering autophagy are indicated in green.

Of note, there is now a growing line of evidence that autophagy-related organelles can intersect with internalized virions and behave as an early antiviral mechanism in myeloid cells [249, 296, 297]. Even more interesting is the observation that DC-SIGN level of expression was linked to autophagy flux induction [298] and the receptor could traffic through autophagy-related organelles early upon engagement [249, 259]. The link between CLR and autophagy therefore warrants further investigation and might be of interest for future therapeutic strategies aiming at enhancing DC antiviral immune responses.

Autophagy exhaustion correlates with a signaling cascade induced early upon HIV-envelope binding, leading to the activation of mTOR, a well-known inhibitor of autophagy flux initiation. However, the exact mechanism and upstream signaling effectors require further investigation. mTOR kinase is a target of numerous converging signaling pathways with implications on cellular growth, transcription and translation synthesis, autophagy flux regulation and cell survival (for review see [299]). Interestingly, there are now growing evidences that mTOR function and signaling are intriguingly connected to another amino acid sensor pathway converging toward the general control nonderepressible-2 (GCN-2) kinase. Of note, a link between inhibition of TOR signaling and activation of Gcn2 to phosphorylate eIF2 $\alpha$  has been demonstrated in yeast [300]. In mammalian cells, some studies also reported some potential crosstalk between both pathways, although never related to DC-mediated antiviral immunity [301, 302] but still with implications in protective innate immune and stress responses upon bacterial infection [303, 304]. Outstandingly, GCN2 was recently reported to be a target of HIV-1 infection [305, 306] and was shown to exert antiviral effects against RNA viruses [307]. It would thus be of interest to decipher the potential crosstalk of the mTOR and GCN2 pathways in the context of HIV-1 infection of DC and subsequent immune responses.

In DC, reduction of autophagy was shown to impair TLR-mediated innate immune response [249] while also strongly affecting antigen processing and MHC-II-mediated antigen presentation to CD4<sup>+</sup> T cells *in vitro* and *in vivo*

[249, 252]. Autophagy involvement in innate immunity was previously reported in pDC with the evidence that cytosolic viral replication intermediates could be transported into the lysosome by the process of autophagy and also regulate IFN- $\gamma$  secretion upon TLR7-mediated ssRNA recognition [308, 309]. Future studies on upstream cellular factors influencing viral trafficking through endocytic compartments linked to immune responses and intersecting with autophagy-related organelles are therefore required to better understand viral recognition mechanisms in DC, which could help in the design of vaccines.

### 3.4. Regulation of autophagy in neuronal cells

There is now compelling evidence that defects in neuronal intracellular trafficking is linked to neuropathologies [310]. In this light, the autophagy pathway is playing a key role in neuronal homeostasis as it is involved in clearance of protein aggregates that accumulate during aging and damaged organelles. Defects in this process are commonly found in neurodegenerative disorders [311]. Consistent with this, the autophagy machinery has been proposed to participate in HAND, even though conflicting data have been reported. Studies in patients and in transgenic mice expressing gp120 under an astrocyte-specific promoter have shown alteration in the autophagic pathway [312]. Young (under 50 years of age) patients had an increase in the level of key autophagy markers such as LC3 and Beclin 1, whereas these markers were decreased in older patients, suggesting a modification of the autophagy process during disease progression [312]. This report showed that aged gp120-expressing mice had reduced expression of autophagy markers and increased neurodegeneration compared to aged control animals [312]. Similarly, decreased autophagy has been reported in HIV-infected patients and SIV-infected monkeys [313]. Supernatant from SIV-infected microglia also led to decreased autophagy and alteration of autophagosome formation [314]. However, another study showed increased autophagic markers in HIV patient post-mortem brain samples, as well as in a neuronal cell lines exposed to gp120 [315]. Notably, increased expression/detection of markers such as LC3 can also be explained with a perturbed autophagic flux and not only with a global increase of autophagy.

Moreover, as reported recently, disease progression may interfere differently with the autophagic pathway [312], highlighting the balance between the role of autophagy in neuronal homeostasis and in pathogen defense. In this light, the viral load in the blood stream and therefore the severity of neurocognitive defects (*i.e.* the neurotoxicity) could switch this balance.

The exact mechanisms of how HIV brain infection does alter the autophagic pathway are still under characterization. More mechanistic studies are therefore needed to determine the exact role of autophagy in HAND and HAD, and in particular in which cell types this process is impaired. As HIV can infect various brain cells but not neurons, other neurotoxic factors, viral proteins included, may also interfere with neuronal autophagy. Interestingly, Tat was reported to modulate the endolysosomal and autophagy system in primary neurons [316], whereas recombinant gp120 was suggested to increase autophagosome formation in neural cells [315].

Finally, autophagy is emerging as a key pathway regulating aging. As stated earlier, defects in autophagy have been reported in pathologies such as Alzheimer and Parkinson's diseases. Notably, there is now compelling evidences that HIV patients developing HAND have symptoms usually associated with an aging brain and increased susceptibility to neuropathologies such as Alzheimer disease. Whether the dysregulation of autophagy observed in HAND and HAD patients has a direct effect on this process is therefore a pertinent question.

#### 4. CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Taken together, these results, presented in the Figure 3, suggest a complex, cell-type specific relationship between HIV-1 and the autophagic response, and highlight the complexity of HIV-1 pathogenesis.

Development of drugs acting on autophagy to treat HIV-1 infection is not yet achieved but several *in vivo* and *in vitro* data suggest that drugs that activate autophagy and/or inhibit the degradation step of autophagy may improve future prophylactic and therapeutic strategies by

enhancing the immune responses [297, 317-320] and may be used as antiviral compounds in association with HAART.

First, sirolimus (rapamycin, Rapamune), a compound that strongly activates autophagy through inhibition of mTORC1 pathway, enhances the viral effects of HIV treatment. Sirolimus represses HIV-1 replication *in vitro* through different mechanisms including, but not limited to, the down regulation of CCR5 [321, 322]. Although this was very surprising due to the known immunosuppressive action of sirolimus, the rapamycin effects might differ depending on the cell type targeted.

Moreover, the group of B. Levine demonstrated that an autophagy activator peptide, composed of the Tat transduction domain attached to an 18 amino acids sequence derived from the protein Beclin 1 that binds to Nef, decreases HIV-1 replication *in vitro* [297]. Finally, chloroquine, a compound that blocks the fusion between autophagosomes and lysosomes, reduced HIV-1 replication *in vitro* and the DC-DIGN-mediated HIV-1 transfer to CD4<sup>+</sup> T cells [323].

Modulation of the autophagy flux might thus be part of the currently developed therapeutic strategies against HIV infection as well as a promising approach to improve antiviral prophylactic regimen.

#### ACKNOWLEDGMENT

The work was supported by institutional funds from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Montpellier University, and grants from ANRS (agence nationale de recherches sur le sida et les hépatites virales).

#### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

There are no conflicts of interest in this review.

#### REFERENCES

1. Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W. E. and Picker, L. J. 2006, *Nat. Med.*, 12, 289-295.
2. Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M. and Markowitz, M. 1995, *Nature*, 373, 123-126.

3. Klatzmann, D., Barre-Sinoussi, F., Nugeyre, M. T., Danquet, C., Vilmer, E., Griscelli, C., Brun-Veziret, F., Rouzioux, C., Gluckman, J. C., Chermann, J. C. and Montagnier, L. 1984, *Science*, 225, 59-63.
4. Masur, H., Ognibene, F. P., Yarchoan, R., Shelhamer, J. H., Baird, B. F., Travis, W., Suffredini, A. F., Deyton, L., Kovacs, J. A., Falloon, J., Davey, R., Polis, M., Metcalf, J., Baseler, M., Wesley, R., Gill, V. J., Fauci, A. S. and Lane, H. C. 1989, *Ann. Intern. Med.*, 111, 223-231.
5. Sauce, D., Larsen, M., Fastenackels, S., Pauchard, M., Ait-Mohand, H., Schneider, L., Guihot, A., Boufassa, F., Zaunders, J., Iguertsira, M., Bailey, M., Gorochoy, G., Duvivier, C., Carcelain, G., Kelleher, A. D., Simon, A., Meyer, L., Costagliola, D., Deeks, S. G., Lambotte, O., Autran, B., Hunt, P. W., Katlama, C. and Appay, V. 2011, *Blood*, 117, 5142-5151.
6. Wu, L. and Kewal Ramani, V. N. 2006, *Nat. Rev. Immunol.*, 6, 859-868.
7. Nath, A. 2010, *Ann. NY Acad. Sci.*, 1187, 122-128.
8. Melikyan, G. B. 2013, *Curr. Opin. Virol.*, 4C, 1-7.
9. Koot, M., Keet, I. P., Vos, A. H., de Goede, R. E., Roos, M. T., Coutinho, R. A., Miedema, F., Schellekens, P. T. and Tersmette, M. 1993, *Ann. Intern. Med.*, 118, 681-688.
10. Richman, D. D. and Bozzette, S. A. 1994, *J. Infect. Dis.*, 169, 968-974.
11. Margolis, L. and Shattock, R. 2006, *Nat. Rev. Microbiol.*, 4, 312-317.
12. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.-C., Rey, F., Nugeyre, M.-T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Rozemaub, W. and Montagnier, L. 1983, *Science*, 220, 868-870.
13. Schacker, T., Little, S., Connick, E., Gebhard, K., Zhang, Z. Q., Krieger, J., Pryor, J., Havlir, D., Wong, J. K., Schooley, R. T., Richman, D., Corey, L. and Haase, A. T. 2001, *J. Infect. Dis.*, 183, 555-562.
14. Fauci, A. S. 1988, *Science*, 239, 617-622.
15. Bachelier, F., Alcamí, J., Arenzana-Seisdedos, F. and Virelizier, J. L. 1991, *Nature*, 350, 709-712.
16. Stevenson, M., Stanwick, T. L., Dempsey, M. P. and Lamonica, C. A. 1990, *EMBO J.*, 9, 1551-1560.
17. Vahedi, G., Kanno, Y., Sartorelli, V. and O'Shea, J. J. 2013, *Immunology*, 139, 294-298.
18. Zack, J. A., Arrigo, S. J., Weitsman, S. R., Go, A. S., Haislip, A. and Chen, I. S. Y. 1990, *Cell*, 61, 213-222.
19. Baldauf, H. M., Pan, X., Erikson, E., Schmidt, S., Daddacha, W., Burggraf, M., Schenkova, K., Ambiel, I., Wabnitz, G., Gramberg, T., Panitz, S., Flory, E., Landau, N. R., Sertel, S., Rutsch, F., Lasitschka, F., Kim, B., König, R., Fackler, O. T. and Keppler, O. T. 2012, *Nat. Med.*, 18, 1682-1687.
20. Descours, B., Cribier, A., Chable-Bessia, C., Ayinde, D., Rice, G., Crow, Y., Yatim, A., Schwartz, O., Laguet, N. and Benkirane, M. 2012, *Retrovirology*, 9, 87.
21. Cayota, A., Vuillier, F., Scott-Algara, D. and Dighiero, G. 1990, *Lancet*, 336, 941.
22. Schnittman, S. M., Lane, H. C., Greenhouse, J., Justement, J. S., Baseler, M. and Fauci, A. S. 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 6058-6062.
23. Donahue, D. A. and Wainberg, M. A. 2013, *Retrovirology*, 10, 11.
24. Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Ruff, L. E., Price, D. A., Taylor, J. H., Beilman, G. J., Nguyen, P. L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A. T. and Douek, D. C. 2004, *J. Exp. Med.*, 200, 749-759.
25. Clayton, L. K., Hussey, R. E., Steinbrich, R., Ramachandran, H., Husain, Y. and Reinherz, E. L. 1988, *Nature*, 335, 363-366.
26. Guadalupe, M., Reay, E., Sankaran, S., Prindiville, T., Flamm, J., McNeil, A. and Dandekar, S. 2003, *J. Virol.*, 77, 11708-11717.
27. Lim, S. G., Condez, A., Lee, C. A., Johnson, M. A., Elia, C. and Poulter, L. W. 1993, *Clin. Exp. Immunol.*, 92, 448-454.
28. Mehandru, S., Poles, M. A., Tenner-Racz, K., Horowitz, A., Hurley, A., Hogan, C., Boden, D., Racz, P. and Markowitz, M. 2004, *J. Exp. Med.*, 200, 761-770.



29. Fox, C. H., Kotler, D., Tierney, A., Wilson, C. S. and Fauci, A. S. 1989, *J. Infect. Dis.*, 159, 467-471.
30. Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J. F., Butini, L., Montroni, M., Fox, C. H., Orenstein, J. M., Kotler, D. P. and Fauci, A. S. 1993, *Nature*, 362, 355-358.
31. Schnittman, S. M., Psallidopoulos, M. C., Lane, H. C., Thompson, L., Baseler, M., Massari, F., Fox, C. H., Salzman, N. P. and Fauci, A. C. 1989, *Science*, 245, 305-308.
32. Li, Q., Duan, L., Estes, J. D., Ma, Z. M., Rourke, T., Wang, Y., Reilly, C., Carlis, J., Miller, C. J. and Haase, A. T. 2005, *Nature*, 434, 1148-1152.
33. Mattapallil, J. J., Douek, D. C., Hill, B., Nishimura, Y., Martin, M. and Roederer, M. 2005, *Nature*, 434, 1093-1097.
34. Veazey, R. S., DeMaria, M., Chalifoux, L. V., Shvetz, D. E., Pauley, D. R., Knight, H. L., Rosenzweig, M., Johnson, R. P., Desrosiers, R. C. and Lackner, A. A. 1998, *Science*, 280, 427-431.
35. Berges, B. K., Wheat, W. H., Palmer, B. E., Connick, E. and Akkina, R. 2006, *Retrovirology*, 3, 76.
36. Sun, Z., Denton, P. W., Estes, J. D., Othieno, F. A., Wei, B. L., Wege, A. K., Melkus, M. W., Padgett-Thomas, A., Zupancic, M., Haase, A. T. and Garcia, J. V. 2007, *J. Exp. Med.*, 204, 705-714.
37. Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F. A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M. R., Ghattas, G., Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Hill, B. J., Douek, D. C., Routy, J. P., Haddad, E. K. and Sékaly, R. P. 2009, *Nat. Med.*, 15, 893-900.
38. Chun, T. W., Stuyver, L., Mizell, S. B., Ehler, L. A., Mican, J. A., Baseler, M., Lloyd, A. L., Nowak, M. A. and Fauci, A. S. 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 13193-13197.
39. Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L. M., Buck, C., Chaisson, R. E., Quinn, T. C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., Gallant, J., Markowitz, M., Ho, D. D., Richman, D. D. and Siliciano, R. F. 1997, *Science*, 278, 1295-1300.
40. Wong, J. K., Hezareh, M., Gunthard, H. F., Havlir, D. V., Ignacio, C. C., Spina, C. A. and Richman, D. D. 1997, *Science*, 278, 1291-1295.
41. Buzon, M. J., Sun, H., Li, C., Shaw, A., Seiss, K., Ouyang, Z., Martin-Gayo, E., Leng, J., Henrich, T. J., Li, J. Z., Pereyra, F., Zurakowski, R., Walker, B. D., Rosenberg, E. S., Yu, X. G. and Lichterfeld, M. 2014, *Nat Med*, 20, 139-142.
42. Stein, B. S., Gowda, S. D., Lifson, J. D., Penhallow, R. C., Bensch, K. G. and Engleman, E. G. 1987, *Cell*, 49, 659-668.
43. Pierson, T. C. and Doms, R. W. 2003, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 281, 1-27.
44. Jolly, C., Kashefi, K., Hollinshead, M. and Sattentau, Q. J. 2004, *J. Exp. Med.*, 199, 283-293.
45. McDonald, D., Wu, L., Bohks, S. M., KewalRamani, V. N., Unutmaz, D. and Hope, T. J. 2003, *Science*, 300, 1295-1297.
46. Sattentau, Q. 2008, *Nat. Rev. Microbiol.*, 6, 815-826.
47. Arrighi, J. F., Pion, M., Garcia, E., Escola, J. M., van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T. B. and Piguet, V. 2004, *J. Exp. Med.*, 200, 1279-1288.
48. Felts, R. L., Narayan, K., Estes, J. D., Shi, D., Trubey, C. M., Fu, J., Hartnell, L. M., Ruthel, G. T., Schneider, D. K., Nagashima, K., Bess, J. W. Jr., Bavari, S., Lowekamp, B. C., Bliss, D., Lifson, J. D. and Subramaniam, S. 2010, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 13336-13341.
49. Groot, F., Welsch, S. and Sattentau, Q. J. 2008, *Blood*, 111, 4660-4663.
50. Rudnicka, D., Feldmann, J., Porrot, F., Wietgreffe, S., Guadagnini, S., Prevost, M. C., Estaquier, J., Haase, A. T., Sol-Foulon, N. and Schwartz, O. 2009, *J. Virol.*, 83, 6234-6246.
51. Ferri, K. F., Jacotot, E., Leduc, P., Geuskens, M., Ingber, D. E. and Kroemer, G. 2000, *Exp. Cell Res.*, 261, 119-126.
52. Murooka, T. T., Deruaz, M., Marangoni, F., Vrbanac, V. D., Seung, E., von Andrian, U. H., Tager, A. M., Luster, A. D. and Mempel, T. R. 2012, *Nature*, 490, 283-287.

53. Blanco, J., Barretina, J., Ferri, K. F., Jacotot, E., Gutierrez, A., Armand-Ugon, M., Cabrera, C., Kroemer, G., Clotet, B. and Este, J. A. 2003, *Virology*, 305, 318-329.
54. Garg, H. and Blumenthal, R. 2008, *Cell Mol. Life Sci.*, 65, 3134-3144.
55. Garg, H., Joshi, A., Freed, E. O. and Blumenthal, R. 2007, *J. Biol. Chem.*, 282, 16899-16906.
56. Roggero, R., Robert-Hebmann, V., Harrington, S., Roland, J., Vergne, L., Jaleco, S., Devaux, C. and Biard-Piechaczyk, M. 2001, *J. Virol.*, 75, 7637-7650.
57. Doitsh, G., Cavois, M., Lassen, K. G., Zepeda, O., Yang, Z., Santiago, M. L., Hebbeler, A. M. and Greene, W. C. 2010, *Cell*, 143, 789-801.
58. Doitsh, G., Galloway, N. L., Geng, X., Yang, Z., Monroe, K. M., Zepeda, O., Hunt, P. W., Hatano, H., Sowinski, S., Munoz-Arias, I. and Greene, W. C. 2014, *Nature*, 505, 509-514.
59. Jakobsen, M. R., Bak, R. O., Andersen, A., Berg, R. K., Jensen, S. B., Tengchuan, J., Laustsen, A., Hansen, K., Ostergaard, L., Fitzgerald, K. A., Xiao, T. S., Mikkelsen, J. G., Mogensen, T. H. and Paludan, S. R. 2013, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, E4571-4580.
60. Monroe, K. M., Yang, Z., Johnson, J. R., Geng, X., Doitsh, G., Krogan, N. J. and Greene, W. C. 2014, *Science*, 343, 428-432.
61. Coleman, C. M. and Wu, L. 2009, *Retrovirology*, 6, 51.
62. Martinez-Pomares, L. and Gordon, S. 2007, *Cell*, 131, 641-643.
63. Peters, P. J., Bhattacharya, J., Hibbitts, S., Dittmar, M. T., Simmons, G., Bell, J., Simmonds, P. and Clapham, P. R. 2004, *J. Virol.*, 78, 6915-6926.
64. Peters, P. J., Sullivan, W. M., Duenas-Decamp, M. J., Bhattacharya, J., Ankghuambom, C., Brown, R., Luzuriaga, K., Bell, J., Simmonds, P., Ball, J. and Clapham, P. R. 2006, *J. Virol.*, 80, 6324-6332.
65. Permanyer, M., Ballana, E. and Este, J. A. 2010, *Trends Microbiol.*, 18, 543-551.
66. Carter, G. C., Bernstone, L., Baskaran, D. and James, W. 2011, *Virology*, 409, 234-250.
67. Carter, G. C., Bernstone, L., Sangani, D., Bee, J. W., Harder, T. and James, W. 2009, *Virology*, 386, 192-202.
68. van Wilgenburg, B., Moore, M. D., James, W. S. and Cowley, S. A., 2014, *PLoS One*, 9, e86071.
69. Marechal, V., Prevost, M. C., Petit, C., Perret, E., Heard, J. M. and Schwartz, O. 2001, *J. Virol.*, 75, 11166-11177.
70. de Parseval, A., Bobardt, M. D., Chatterji, A., Chatterji, U., Elder, J. H., David, G., Zolla-Pazner, S., Farzan, M., Lee, T. H. and Gallay, P. A. 2005, *J. Biol. Chem.*, 280, 39493-39504.
71. Saphire, A. C., Bobardt, M. D., Zhang, Z., David, G. and Gallay, P. A. 2001, *J. Virol.*, 75, 9187-9200.
72. Wu, Z., Golub, E., Abrams, W. R. and Malamud, D. 2004, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 20, 600-607.
73. Chehimi, J., Luo, Q., Azzoni, L., Shawver, L., Ngoubilly, N., June, R., Jerandi, G., Farabaugh, M. and Montaner, L. J. 2003, *J. Leukoc Biol*, 74, 757-763.
74. Larkin, M., Childs, R. A., Matthews, T. J., Thiel, S., Mizuochi, T., Lawson, A. M., Savill, J. S., Haslett, C., Diaz, R. and Feizi, T. 1989, *AIDS*, 3, 793-798.
75. Nguyen, D. G. and Hildreth, J. E. 2003, *Eur. J. Immunol.*, 33, 483-493.
76. Bristow, C. L., Mercatante, D. R. and Kole, R. 2003, *Blood*, 102, 4479-4486.
77. Bosch, B., Clotet-Codina, I., Blanco, J., Pauls, E., Coma, G., Cedeno, S., Mitjans, F., Llano, A., Bofill, M., Clotet, B., Piulats, J. and Este, J. A. 2006, *Antiviral. Res.*, 69, 173-180.
78. Ma, G., Greenwell-Wild, T., Lei, K., Jin, W., Swisher, J., Hardegen, N., Wild, C. T. and Wahl, S. M. 2004, *J. Exp. Med.*, 200, 1337-1346.
79. Herzberg, M. C., Weinberg, A. and Wahl, S. M. 2006, *Adv. Dent. Res.*, 19, 158-166.
80. Deneka, M., Pelchen-Matthews, A., Byland, R., Ruiz-Mateos, E. and Marsh, M. 2007, *J. Cell Biol.*, 177, 329-341.

81. Jouve, M., Sol-Foulon, N., Watson, S., Schwartz, O. and Benaroch, P. 2007, *Cell Host Microbe*, 2, 85-95.
82. Welsch, S., Keppler, O. T., Habermann, A., Allespach, I., Krijnse-Locker, J. and Krausslich, H. G. 2007, *PLoS Pathog*, 3, e36.
83. Berre, S., Gaudin, R., Cunha de Alencar, B., Desdouits, M., Chabaud, M., Naffakh, N., Rabaza-Gairi, M., Gobert, F. X., Jouve, M. and Benaroch, P. 2013, *J. Exp. Med.*, 210, 2523-2538.
84. Liu, Y. J. 2005, *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 275-306.
85. Ahmed, Z., Czubala, M., Blanchet, F. and Piguet, V. 2013, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 762, 201-238.
86. Blanchet, F., Moris, A., Mitchell, J. P. and Piguet, V. 2011, *Curr. Opin. HIV AIDS*, 6, 391-397.
87. Barratt-Boyes, S. M., Zimmer, M. I. and Harshyne, L. 2002, *J. Med. Primatol.*, 31, 186-193.
88. Hu, J., Gardner, M. B. and Miller, C. J. 2000, *J. Virol.*, 74, 6087-6095.
89. Miller, C. J. and Hu, J. 1999, *J. Infect. Dis.*, 179(Suppl. 3), S413-417.
90. Spira, A. I., Marx, P. A., Patterson, B. K., Mahoney, J., Koup, R. A., Wolinsky, S. M. and Ho, D. D. 1996, *J. Exp. Med.*, 183, 215-225.
91. Fontenot, D., He, H., Hanabuchi, S., Nehete, P. N., Zhang, M., Chang, M., Nehete, B., Wang, Y. H., Ma, Z. M., Lee, H. C., Ziegler, S. F., Courtney, A. N., Miller, C. J., Sun, S. C., Liu, Y. J. and Sastry, K. J. 2009, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 16776-16781.
92. Li, Q., Estes, J. D., Schlievert, P. M., Duan, L., Brosnahan, A. J., Southern, P. J., Reilly, C. S., Peterson, M. L., Schultz-Darken, N., Brunner, K. G., Nephew, K. R., Pambuccian, S., Lifson, J. D., Carlis, J. V. and Haase, A. T. 2009, *Nature*, 458, 1034-1038.
93. Kwa, S., Kannanganat, S., Nigam, P., Siddiqui, M., Shetty, R. D., Armstrong, W., Ansari, A., Bosinger, S. E., Silvestri, G. and Amara, R. R. 2011, *Blood*, 118, 2763-2773.
94. Reeves, R. K., Evans, T. I., Gillis, J., Wong, F. E., Kang, G., Li, Q. and Johnson, R. P. 2012, *J. Infect. Dis.*, 206, 1462-1468.
95. Dillon, S. M., Robertson, K. B., Pan, S. C., Mawhinney, S., Meditz, A. L., Folkvord, J. M., Connick, E., McCarter, M. D. and Wilson, C. C. 2008, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 48, 1-12.
96. Ganesh, L., Leung, K., Lore, K., Levin, R., Panet, A., Schwartz, O., Koup, R. A. and Nabel, G. J. 2004, *J. Virol.*, 78, 11980-11987.
97. Granelli-Piperno, A., Delgado, E., Finkel, V., Paxton, W. and Steinman, R. M. 1998, *J. Virol.*, 72, 2733-2737.
98. Popov, S., Chenine, A. L., Gruber, A., Li, P. L. and Ruprecht, R. M. 2005, *J. Virol.*, 79, 602-608.
99. Reece, J. C., Handley, A. J., Anstee, E. J., Morrison, W. A., Crowe, S. M. and Cameron, P. U. 1998, *J. Exp. Med.*, 187, 1623-1631.
100. Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S. K., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., Florens, L., Washburn, M. P. and Skowronski, J. 2011, *Nature*, 474, 658-661.
101. Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Segéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O. and Benkirane, M. 2011, *Nature*, 474, 654-657.
102. Cribier, A., Descours, B., Valadao, A. L., Laguette, N. and Benkirane, M. 2013, *Cell Rep.*, 3, 1036-1043.
103. White, T. E., Brandariz-Nunez, A., Valle-Casuso, J. C., Amie, S., Nguyen, L. A., Kim, B., Tuzova, M. and Diaz-Griffero, F. 2013, *Cell Host Microbe*, 13, 441-451.
104. Goldstone, D. C., Ennis-Adeniran, V., Hedden, J. J., Groom, H. C., Rice, G. I., Christodoulou, E., Walker, P. A., Kelly, G., Haire, L. F., Yap, M. W., de Carvalho, L. P., Stoye, J. P., Crow, Y. J., Taylor, I. A. and Webb, M. 2011, *Nature*, 480, 379-382.
105. Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E. C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., Pancino, G., Priet, S.,

- Canard, B., Laguet, N., Benkirane, M., Transy, C., Landau, N. R., Kim, B. and Margottin-Goguet, F. 2012, *Nat. Immunol.*, 13, 223-228.
106. Powell, R. D., Holland, P. J., Hollis, T. and Perrino, F. W. 2011, *J. Biol. Chem.*, 286, 43596-43600.
107. Berger, G., Durand, S., Fargier, G., Nguyen, X. N., Cordeil, S., Bouaziz, S., Muriaux, D., Darlix, J. L. and Cimarelli, A. 2011, *PLoS Pathog*, 7, e1002221.
108. Blanchet, F. P., Stalder, R., Czubala, M., Lehmann, M., Rio, L., Mangeat, B. and Piguet, V. 2013, *Retrovirology*, 10, 6.
109. Peng, G., Greenwell-Wild, T., Nares, S., Jin, W., Lei, K. J., Rangel, Z. G., Munson, P. J. and Wahl, S. M. 2007, *Blood*, 110, 393-400.
110. Pion, M., Granelli-Piperno, A., Mangeat, B., Stalder, R., Correa, R., Steinman, R. M. and Piguet, V. 2006, *J. Exp. Med.*, 203, 2887-2893.
111. Turville, S. G., Arthos, J., Donald, K. M., Lynch, G., Naif, H., Clark, G., Hart, D. and Cunningham, A. L. 2001, *Blood*, 98, 2482-2488.
112. Turville, S. G., Cameron, P. U., Handley, A., Lin, G., Pohlmann, S., Doms, R. W. and Cunningham, A. L. 2002, *Nat. Immunol.*, 3, 975-983.
113. Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., Cornelissen, I. L., Nottet, H. S., KewalRamani, V. N., Littman, D. R., Figdor, C. G. and van Kooyk, Y. 2000, *Cell*, 100, 587-597.
114. Lambert, A. A., Gilbert, C., Richard, M., Beaulieu, A. D. and Tremblay, M. J. 2008, *Blood*, 112, 1299-1307.
115. Milone, M. C. and Fitzgerald-Bocarsly, P. 1998, *J. Immunol.*, 161, 2391-2399.
116. Engering, A., Geijtenbeek, T. B., van Vliet, S. J., Wijers, M., van Liempt, E., Demareux, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C. G., Piguet, V. and van Kooyk, Y. 2002, *J. Immunol.*, 168, 2118-2126.
117. Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y. and Figdor, C. G. 2000, *Cell*, 100, 575-585.
118. Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M. and Nussenzweig, M. C. 1995, *Nature*, 375, 151-155.
119. Meyer-Wentrup, F., Benitez-Ribas, D., Tacken, P. J., Punt, C. J., Figdor, C. G. and de Vries, I. J., Adema, G. J. 2008, *Blood*, 111, 4245-4253.
120. Prigozy, T. I., Sieling, P. A., Clemens, D., Stewart, P. L., Behar, S. M., Porcelli, S. A., Brenner, M. B., Modlin, R. L. and Kronenberg, M. 1997, *Immunity*, 6, 187-197.
121. Idoyaga, J., Cheong, C., Suda, K., Suda, N., Kim, J. Y., Lee, H., Park, C. G. and Steinman, R. M. 2008, *J. Immunol.*, 180, 3647-3650.
122. Nchinda, G., Kuroiwa, J., Oks, M., Trumpfheller, C., Park, C. G., Huang, Y., Hannaman, D., Schlesinger, S. J., Mizenina, O., Nussenzweig, M. C., Uberla, K. and Steinman, R. M. 2008, *J. Clin. Invest.*, 118, 1427-1436.
123. Garcia, E., Pion, M., Pelchen-Matthews, A., Collinson, L., Arrighi, J. F., Blot, G., Leuba, F., Escola, J. M., Demareux, N., Marsh, M. and Piguet, V. 2005, *Traffic*, 6, 488-501.
124. Braathen, L. R. 1988, *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 42, 305-308.
125. Cavois, M., Neidelman, J. and Greene, W. C. 2008, *PLoS Pathog*, 4, e1000051.
126. Letendre, S. 2011, *Topics in antiviral medicine*, 19, 137-142.
127. Corder, E. H., Robertson, K., Lannfelt, L., Bogdanovic, N., Eggertsen, G., Wilkins, J. and Hall, C. 1998, *Nat. Med.*, 4, 1182-1184.
128. Rausch, D. M. and Davis, M. R. 2001, *J. Neurovirol.*, 7, 85-96.
129. Youngsteadt, E. 2008, *Science*, 320, 1577.
130. Merrill, J. E. and Chen, I. S. 1991, *FASEB J*, 5, 2391-2397.
131. Shi, B., De Girolami, U., He, J., Wang, S., Lorenzo, A., Busciglio, J. and Gabuzda, D. 1996, *J. Clin. Invest.*, 98, 1979-1990.
132. Cheng, J., Nath, A., Knudsen, B., Hochman, S., Geiger, J. D., Ma, M. and Magnuson, D. S. 1998, *Neuroscience*, 82, 97-106.



133. Nath, A., Haughey, N. J., Jones, M., Anderson, C., Bell, J. E. and Geiger, J. D. 2000, *Ann. Neurol.*, 47, 186-194.
134. Sabatier, J. M., Vives, E., Mabrouk, K., Benjouad, A., Rochat, H., Duval, A., Hue, B. and Bahraoui, E. 1991, *J. Virol.*, 65, 961-967.
135. Toggas, S. M., Masliah, E., Rockenstein, E. M., Rall, G. F., Abraham, C. R. and Mucke, L. 1994, *Nature*, 367, 188-193.
136. Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M. and Verkhratsky, A. 2011, *Physiol. Rev.*, 91, 461-553.
137. Kaul, M. and Lipton, S. 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 8212-8216.
138. Yoshioka, M., Bradley, W. G., Shapshak, P., Nagano, I., Stewart, R. V., Xin, K. Q. and Srivastava, A. K., Nakamura, S. 1995, *Adv. Neuroimmunol.*, 5, 335-358.
139. Eugenin, E. A., Clements, J. E., Zink, M. C. and Berman, J. W. 2011, *J. Neurosci.*, 31, 9456-9465.
140. Kramer-Hammerle, S., Rothenaigner, I., Wolff, H., Bell, J. E. and Brack-Werner, R. 2005, *Virus Research*, 111, 194-213.
141. Lawrence, D. M., Durham, L. C., Schwartz, L., Seth, P., Maric, D. and Major, E. O. 2004, *J. Virol.*, 78, 7319-7328.
142. Rothenaigner, I., Kramer, S., Ziegler, M., Wolff, H., Kleinschmidt, A. and Brack-Werner, R. 2007, *AIDS*, 21, 2271-2281.
143. Hill, J. M., Mervis, R. F., Avidor, R., Moody, T. W. and Brenneman, D. E. 1993, *Brain Res.*, 603, 222-233.
144. Krathwohl, M. D. and Kaiser, J. L. 2004, *J. Infect. Dis.*, 190, 216-226.
145. Okamoto, S., Kang, Y. J., Brechtel, C. W., Siviglia, E., Russo, R., Clemente, A., Harrop, A., McKercher, S., Kaul, M. and Lipton, S. A. 2007, *Cell Stem Cell*, 1, 230-236.
146. Bergonzini, V., Delbue, S., Wang, J. Y., Reiss, K., Prisco, M., Amini, S., Khalili, K., Peruzzi, F., 2004, *Oncogene*, 23, 7701-7711.
147. Zhou, B. Y. and He, J. J. 2004, *Neurosci. Lett.*, 359, 155-158.
148. Mizushima, N., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y. 2011, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 27, 107-132.
149. Mizushima, N. and Komatsu, M. 2011, *Cell*, 147, 728-741.
150. Mizushima, N. 2011, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 76, 397-402.
151. Rubinsztein, D. C., Shpilka, T. and Elazar, Z. 2012, *Curr. Biol.*, 22, R29-34.
152. Klionsky, D. J. 2005, *J. Cell Sci.*, 118, 7-18.
153. Yoshimori, T. 2004, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313, 453-458.
154. Bestebroer, J., V'Kovski, P., Mauthe, M. and Reggiori, F. 2013, *Traffic*, 14, 1029-1041.
155. Mehta, P., Henault, J., Kolbeck, R. and Sanjuan, M. A. 2014, *Curr. Opin. Immunol.*, 26C, 69-75.
156. Virgin, H. W. and Levine, B. 2009, *Nat. Immunol.*, 10, 461-470.
157. Levine, B., Mizushima, N. and Virgin, H. W. 2011, *Nature*, 469, 323-335.
158. Lorin, S., Hamai, A., Mehrpour, M. and Codogno, P. 2013, *Semin. Cancer Biol.*, 23, 361-379.
159. Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J. E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z. W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V. I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D. C., Menzies, F. M., Moreau, K., Narayanan, U., Renna, M., Siddiqi, F. H., Underwood, B. R., Winslow, A. R. and Rubinsztein, D. C. 2010, *Physiol. Rev.*, 90, 1383-1435.
160. Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S. H., Kim, Y. M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M. and Kim, D. H. 2009, *Mol. Biol. Cell*, 20, 1992-2003.
161. Wirth, M., Joachim, J. and Tooze, S. A. 2013, *Semin Cancer Biol.*, 23, 301-309.
162. Zoncu, R., Efeyan, A. and Sabatini, D. M. 2011, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12, 21-35.
163. Puri, C., Renna, M., Bento, C. F., Moreau, K. and Rubinsztein, D. C. 2013, *Cell*, 154, 1285-1299.
164. Funderburk, S. F., Wang, Q. J. and Yue, Z. 2010, *Trends Cell Biol.*, 20, 355-362.
165. Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T. and Tang, D. 2011, *Cell Death Differ*, 18, 571-580.
166. Di Bartolomeo, S., Corazzari, M., Nazio, F., Oliverio, S., Lisi, G., Antonioli, M., Pagliarini, V., Matteoni, S., Fuoco, C.,

- Giunta, L., D'Amelio, M., Nardacci, R., Romagnoli, A., Piacentini, M., Cecconi, F. and Fimia, G. M. 2010, *J. Cell Biol.*, 191, 155-168.
167. Polson, H. E., de Lartigue, J., Rigden, D. J., Reedijk, M., Urbe, S., Clague, M. J. and Tooze, S. A. 2010, *Autophagy*, 6, 506-522.
  168. Taguchi-Atarashi, N., Hamasaki, M., Matsunaga, K., Omori, H., Ktistakis, N. T. and Yoshimori, T. and Noda, T. 2010, *Traffic*, 11, 468-478.
  169. Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y. 1998, *J. Biol. Chem.*, 273, 33889-33892.
  170. Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T. and Ohsumi, Y. 2000, *Nature*, 408, 488-492.
  171. Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. 2000, *Embo J.*, 19, 5720-5728.
  172. Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V. and Elazar, Z. 2010, *EMBO J.*, 29, 1792-1802.
  173. Hanada, T., Noda, N. N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F. and Ohsumi, Y. 2007, *J. Biol. Chem.*, 282, 37298-37302.
  174. Hemelaar, J., Lelyveld, V. S., Kessler, B. M. and Ploegh, H. L. 2003, *J. Biol. Chem.*, 278, 51841-51850.
  175. Tanida, I., Sou, Y. S., Ezaki, J., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T. and Kominami, E. 2004, *J. Biol. Chem.*, 279, 36268-36276.
  176. Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B. H. and Jung, J. U. 2006, *Nat. Cell Biol.*, 8, 688-699.
  177. Li, X., He, L., Che, K. H., Funderburk, S. F., Pan, L., Pan, N., Zhang, M., Yue, Z. and Zhao, Y. 2012, *Nat. Commun.*, 3, 662.
  178. Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., Akira, S., Noda, T. and Yoshimori, T. 2009, *Nat. Cell Biol.*, 11, 385-396.
  179. Takahashi, Y., Meyerkord, C. L., Hori, T., Runkle, K., Fox, T. E., Kester, M., Loughran, T. P. and Wang, H. G. 2011, *Autophagy*, 7, 61-73.
  180. Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K. and Mizushima, N. 2008, *Mol. Biol. Cell*, 19, 5360-5372.
  181. Zhong, Y., Wang, Q. J., Li, X., Yan, Y., Backer, J. M., Chait, B. T., Heintz, N. and Yue, Z. 2009, *Nat. Cell Biol.*, 11, 468-476.
  182. Thurston, T. L., Wandel, M. P., von Muhlinen, N., Foeglein, A. and Randow, F. 2012, *Nature*, 482, 414-418.
  183. Alemu, E. A., Lamark, T., Torgersen, K. M., Birgisdottir, A. B., Larsen, K. B., Jain, A., Olsvik, H., Overvatn, A., Kirkin, V. and Johansen, T. 2012, *J. Biol. Chem.*, 287, 39275-39290.
  184. Birgisdottir, A. B., Lamark, T. and Johansen, T. 2013, *J. Cell Sci.*, 126, 3237-3247.
  185. Boyle, K. B. and Randow, F. 2013, *Curr. Opin. Microbiol.*, 16, 339-348.
  186. Noda, N. N., Ohsumi, Y. and Inagaki, F. 2010, *FEBS Lett.*, 584, 1379-1385.
  187. Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G. and Johansen, T. 2007, *J. Biol. Chem.*, 282, 24131-24145.
  188. Wild, P., McEwan, D. G. and Dikic, I. 2014, *J. Cell. Sci.*, 127, 3-9.
  189. Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H. and Johansen, T. 2005, *J. Cell Biol.*, 171, 603-614.
  190. Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y. S., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E. and Tanaka, K. 2007, *Cell*, 131, 1149-1163.
  191. Kirkin, V., Lamark, T., Sou, Y. S., Bjorkoy, G., Nunn, J. L., Bruun, J. A., Shvets, E., McEwan, D. G., Clausen, T. H., Wild, P., Bilusic, I., Theurillat, J. P., Overvatn, A., Ishii, T., Elazar, Z., Komatsu, M., Dikic, I. and Johansen, T. 2009, *Mol. Cell*, 33, 505-516.

192. Thurston, T. L., Ryzhakov, G., Bloor, S., von Muhlinen, N. and Randow, F. 2009, *Nat. Immunol.*, 10, 1215-1221.
193. Wild, P., Farhan, H., McEwan, D. G., Wagner, S., Rogov, V. V., Brady, N. R., Richter, B., Korac, J., Waidmann, O., Choudhary, C., Dotsch, V., Bumann, D. and Dikic, I. 2011, *Science*, 333, 228-233.
194. von Muhlinen, N., Akutsu, M., Ravenhill, B. J., Foeglein, A., Bloor, S., Rutherford, T. J., Freund, S. M., Komander, D. and Randow, F. 2012, *Mol. Cell*, 48, 329-342.
195. Zhu, J., Wang, K. Z. and Chu, C. T. 2013, *Autophagy*, 9, 1663-1676.
196. Joubert, P. E., Meiffren, G., Gregoire, I. P., Pontini, G., Richetta, C., Flacher, M., Azocar, O., Vidalain, P. O., Vidal, M., Lotteau, V., Codogno, P., Rabourdin-Combe, C. and Faure, M. 2009, *Cell Host Microbe*, 6, 354-366.
197. Chakrabarti, A., Ghosh, P. K., Banerjee, S., Gaughan, C., Silverman, R. H., 2012, *J. Virol.*, 86, 11311-11321.
198. Delgado, M. A., Elmaoued, R. A., Davis, A. S., Kyei, G. and Deretic, V. 2008, *EMBO J.*, 27, 1110-1121.
199. Richetta, C. and Faure, M. 2013, *Cell Microbiol.*, 15, 368-376.
200. Richetta, C., Gregoire, I. P., Verlhac, P., Azocar, O., Baguet, J., Flacher, M., Tangy, F., Rabourdin-Combe, C. and Faure, M. 2013, *PLoS Pathog*, 9, e1003599.
201. Sir, D., Kuo, C. F., Tian, Y., Liu, H. M., Huang, E. J., Jung, J. U., Machida, K. and Ou, J. H. 2012, *J. Biol. Chem.*, 287, 18036-18043.
202. Su, W. C., Chao, T. C., Huang, Y. L., Weng, S. C., Jeng, K. S. and Lai, M. M. 2011, *J. Virol.*, 85, 10561-10571.
203. Beale, R., Wise, H., Stuart, A., Ravenhill, B. J., Digard, P. and Randow, F. 2014, *Cell Host Microbe*, 15, 239-247.
204. Dong, X. and Levine, B. 2013, *J. Innate Immun.*, 5, 480-493.
205. Li, P., Du, Q., Cao, Z., Guo, Z., Evankovich, J., Yan, W., Chang, Y., Shao, L., Stolz, D. B., Tsung, A. and Geller, D. A. 2011, *Cancer Lett.*, 314, 213-222.
206. Deretic, V., Saitoh, T. and Akira, S. 2013, *Nat. Rev. Immunol.*, 13, 722-737.
207. Espert, L., Codogno, P. and Biard-Piechaczyk, M. 2007, *J. Mol. Med.*, 85, 811-823.
208. Levine, B. and Deretic, V. 2007, *Nat. Rev. Immunol.*, 7, 767-777.
209. Levine, B. and Kroemer, G. 2008, *Cell*, 132, 27-42.
210. Levine, B. 2005, *Cell*, 120, 159-162.
211. Talloczy, Z., Virgin, H. W. T. and Levine, B. 2006, *Autophagy*, 2, 24-29.
212. Orvedahl, A., MacPherson, S., Sumpter, R. Jr., Talloczy, Z., Zou, Z. and Levine, B. 2010, *Cell Host Microbe*, 7, 115-127.
213. Moy, R. H., Gold, B., Molleston, J. M., Schad, V., Yanger, K., Salzano, M. V., Yagi, Y., Fitzgerald, K. A., Stanger, B. Z., Soldan, S. S. and Cherry, S. 2014, *Immunity*, 40, 51-65.
214. He, C. and Levine, B. 2010, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 22, 140-149.
215. Lee, J. S., Li, Q., Lee, J. Y., Lee, S. H., Jeong, J. H., Lee, H. R., Chang, H., Zhou, F. C., Gao, S. J., Liang, C. and Jung, J. U. 2009, *Nat. Cell Biol.*, 11, 1355-1362.
216. Kyei, G. B., Dinkins, C., Davis, A. S., Roberts, E., Singh, S. B., Dong, C., Wu, L., Kominami, E., Ueno, T., Yamamoto, A., Federico, M., Panganiban, A., Vergne, I. and Deretic, V. 2009, *J. Cell Biol.*, 186, 255-268.
217. Gannage, M., Dormann, D., Albrecht, R., Dengjel, J., Torossi, T., Ramer, P. C., Lee, M., Strowig, T., Arrey, F., Conenello, G., Pypaert, M., Andersen, J., Garcia-Sastre, A. and Munz, C. 2009, *Cell Host Microbe*, 6, 367-380.
218. Liu, B., Fang, M., Hu, Y., Huang, B., Li, N., Chang, C., Huang, R., Xu, X., Yang, Z., Chen, Z. and Liu, W. 2013, *Autophagy*, 10, 416-430.
219. Chaumorcet, M., Lussignol, M., Mouna, L., Cavignac, Y., Fahie, K., Cotte-Laffitte, J., Geballe, A., Brune, W., Beau, I., Codogno, P. and Esclatine, A. 2012, *J. Virol.*, 86, 2571-2584.
220. Chaumorcet, M., Souquere, S., Pierron, G., Codogno, P. and Esclatine, A., 2008, *Autophagy*, 4, 46-53.
221. Moloughney, J. G., Monken, C. E., Tao, H., Zhang, H., Thomas, J. D., Lattime, E. C. and Jin, S. 2011, *Autophagy*, 7, 1434-1447.



222. Surviladze, Z., Sterk, R. T., DeHaro, S. A. and Ozbun, M. A., 2013, *J. Virol.*, 87, 2508-2517.
223. Griffin, L. M., Cicchini, L. and Pyeon, D. 2013, *Virology*, 437, 12-19.
224. Orvedahl, A., Sumpter, R., Jr., Xiao, G., Ng, A., Zou, Z., Tang, Y., Narimatsu, M., Gilpin, C., Sun, Q., Roth, M., Forst, C. V., Wrana, J. L., Zhang, Y. E., Luby-Phelps, K., Xavier, R. J., Xie, Y. and Levine, B. 2011, *Nature*, 480, 113-117.
225. Judith, D., Mostowy, S., Bourai, M., Gangneux, N., Lelek, M., Lucas-Hourani, M., Cayet, N., Jacob, Y., Prevost, M. C., Pierre, P., Tangy, F., Zimmer, C., Vidalain, P. O., Couderc, T. and Lecuit, M. 2013, *EMBO Rep.*, 14, 534-544.
226. Henault, J., Martinez, J., Riggs, J. M., Tian, J., Mehta, P., Clarke, L., Sasai, M., Latz, E., Brinkmann, M. M., Iwasaki, A., Coyle, A. J., Kolbeck, R., Green, D. R. and Sanjuan, M. A. 2012, *Immunity*, 37, 986-997.
227. Liang, Q., Seo, G. J., Choi, Y. J., Kwak, M. J., Ge, J., Rodgers, M. A., Shi, M., Leslie, B. J., Hopfner, K. P., Ha, T., Oh, B. H. and Jung, J. U. 2014, *Cell Host Microbe*, 15, 228-238.
228. Lich, J. D., Elliott, J. F. and Blum, J. S. 2000, *J. Exp. Med.*, 191, 1513-1524.
229. Mukherjee, P., Dani, A., Bhatia, S., Singh, N., Rudensky, A. Y., George, A., Bal, V., Mayor, S. and Rath, S. 2001, *J. Immunol.*, 167, 2632-2641.
230. Chervonsky, A. and Sant, A. J. 1995, *Eur. J. Immunol.*, 25, 911-918.
231. Brazil, M. I., Weiss, S. and Stockinger, B. 1997, *Eur. J. Immunol.*, 27, 1506-1514.
232. Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Muller, M., Kreymborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., Brock, R., Driessen, C., Rammensee, H. G. and Stevanovic, S. 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 7922-7927.
233. Dorfel, D., Appel, S., Grunebach, F., Weck, M. M., Muller, M. R., Heine, A. and Brossart, P. 2005, *Blood*, 105, 3199-3205.
234. Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Behrends, U., Jaffee, E. M., Pardoll, D. M., Bornkamm, G. W. and Mautner, J. 2003, *Eur. J. Immunol.*, 33, 1250-1259.
235. Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T. and Munz, C. 2005, *Science*, 307, 593-596.
236. Schmid, D., Pypaert, M. and Munz, C. 2007, *Immunity*, 26, 79-92.
237. Comber, J. D., Robinson, T. M., Siciliano, N. A., Snook, A. E. and Eisenlohr, L. C. 2011, *J. Virol.*, 85, 6453-6463.
238. English, L., Chemali, M., Duron, J., Rondeau, C., Laplante, A., Gingras, D., Alexander, D., Leib, D., Norbury, C., Lippe, R. and Desjardins, M. 2009, *Nat. Immunol.*, 10, 480-487.
239. Leung, C. S., Haigh, T. A., Mackay, L. K., Rickinson, A. B. and Taylor, G. S. 2010, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 2165-2170.
240. Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P., Ferguson, D. J., Campbell, B. J., Jewell, D. and Simmons, A. 2010, *Nat. Med.*, 16, 90-97.
241. Russmann, H., Panthel, K., Kohn, B., Jellbauer, S., Winter, S. E., Garbom, S., Wolf-Watz, H., Hoffmann, S., Grauling-Halama, S. and Geginat, G. 2010, *Infect. Immun.*, 78, 5138-5150.
242. Aichinger, M., Wu, C., Nedjic, J. and Klein, L. 2013, *J. Exp. Med.*, 210, 287-300.
243. Kasai, M., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Seki, S., Ikeda, T. and Mizuochi, T. 2009, *J. Immunol.*, 183, 7278-7285.
244. Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., Mizushima, N. and Klein, L. 2008, *Nature*, 455, 396-400.
245. Zhou, D., Li, P., Lin, Y., Lott, J. M., Hislop, A. D., Canaday, D. H., Brutkiewicz, R. R. and Blum, J. S. 2005, *Immunity*, 22, 571-581.
246. Amer, A. O., Byrne, B. G. and Swanson, M. S. 2005, *Autophagy*, 1, 53-58.
247. Gordon, P. B. and Seglen, P. O. 1988, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151, 40-47.
248. Razi, M., Chan, E. Y. and Tooze, S. A. 2009, *J. Cell Biol.*, 185, 305-321.

249. Blanchet, F. P., Moris, A., Nikolic, D. S., Lehmann, M., Cardinaud, S., Stalder, R., Garcia, E., Dinkins, C., Leuba, F., Wu, L., Schwartz, O., Deretic, V. and Piguet, V. 2010, *Immunity*, 32, 654-669.
250. Blanchet, F. P. and Piguet, V. 2010, *Autophagy*, 6, 816-818.
251. Ireland, J. M. and Unanue, E. R. 2011, *J. Exp. Med.*, 208, 2625-2632.
252. Lee, H. K., Mattei, L. M., Steinberg, B. E., Alberts, P., Lee, Y. H., Chervonsky, A., Mizushima, N., Grinstein, S. and Iwasaki, A. 2010, *Immunity*, 32, 227-239.
253. Morris, S., Swanson, M. S., Lieberman, A., Reed, M., Yue, Z., Lindell, D. M. and Lukacs, N. W. 2011, *J. Immunol.*, 187, 3953-3961.
254. Reed, M., Morris, S. H., Jang, S., Mukherjee, S., Yue, Z. and Lukacs, N. W. 2013, *J. Immunol.*, 191, 2526-2537.
255. Tey, S. K. and Khanna, R. 2012, *Blood*, 120, 994-1004.
256. Wenger, T., Terawaki, S., Camosseto, V., Abdelrassoul, R., Mies, A., Catalan, N., Claudio, N., Clavarino, G., de Gassart, A., Rigotti Fde, A., Gatti, E. and Pierre, P. 2012, *Autophagy*, 8, 350-363.
257. Li, Y., Wang, L. X., Yang, G., Hao, F., Urba, W. J. and Hu, H. M. 2008, *Cancer Res.*, 68, 6889-6895.
258. Uhl, M., Kepp, O., Jusforgues-Saklani, H., Vicencio, J. M., Kroemer, G. and Albert, M. L. 2009, *Cell Death Differ*, 16, 991-1005.
259. Liu, Y., Tai, A., Joo, K. I. and Wang, P. 2013, *PLoS One*, 8, e67400.
260. Kembell, C. C., Alirezai, M., Flynn, C. T., Wood, M. R., Harkins, S., Kiosses, W. B. and Whitton, J. L. 2010, *J. Virol.*, 84, 12110-12124.
261. Wong, J., Zhang, J., Si, X., Gao, G., Mao, I., McManus, B. M. and Luo, H. 2008, *J. Virol.*, 82, 9143-9153.
262. Crawford, S. E., Hyser, J. M., Utama, B. and Estes, M. K. 2012, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, E3405-3413.
263. Jackson, W. T., Giddings, T. H., Taylor, M. P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R. R. and Kirkegaard, K. 2005, *PLoS Biol.*, 3, e156.
264. Prentice, E., Jerome, W. G., Yoshimori, T., Mizushima, N. and Denison, M. R. 2004, *J. Biol. Chem.*, 279, 10136-10141.
265. Zhao, Z., Thackray, L. B., Miller, B. C., Lynn, T. M., Becker, M. M., Ward, E., Mizushima, N. N., Denison, M. R. and Virgin, H. W. T. 2007, *Autophagy*, 3, 581-585.
266. Rubinstein, A. D. and Kimchi, A. 2012, *J. Cell Sci.*, 125, 5259-5268.
267. Joubert, P. E., Werneke, S. W., de la Calle, C., Guivel-Benhassine, F., Giodini, A., Peduto, L., Levine, B., Schwartz, O., Lenschow, D. J. and Albert, M. L. 2012, *J. Exp. Med.*, 209, 1029-1047.
268. Nakashima, A., Tanaka, N., Tamai, K., Kyuuma, M., Ishikawa, Y., Sato, H., Yoshimori, T., Saito, S. and Sugamura, K. 2006, *Virology*, 349, 254-263.
269. Zhirnov, O. P. and Klenk, H. D. 2013, *J. Virol.*, 87, 13107-13114.
270. Heaton, N. S. and Randall, G. 2010, *Cell Host Microbe*, 8, 422-432.
271. Richards, A. L. and Jackson, W. T. 2012, *PLoS Pathog*, 8, e1003046.
272. Brass, A. L., Dykxhoorn, D. M., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., Xavier, R. J., Lieberman, J. and Elledge, S. J. 2008, *Science*, 319, 921-926.
273. Ahr, B., Robert-Hebmann, V., Devaux, C. and Biard-Piechaczyk, M. 2004, *Retrovirology*, 1, 12.
274. Heinkelein, M., Sopper, S. and Jassoy, C. 1995, *J. Virol.*, 69, 6925-6931.
275. Laurent-Crawford, A. G., Krust, B., Riviere, Y., Desgranges, C., Muller, S., Kieny, M. P., Dauguet, C. and Hovanessian, A. G. 1993, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 9, 761-773.
276. Espert, L., Denizot, M., Grimaldi, M., Robert-Hebmann, V., Gay, B., Varbanov, M., Codogno, P. and Biard-Piechaczyk, M. 2006, *J. Clin. Invest.*, 116, 2161-2172.
277. Denizot, M., Varbanov, M., Espert, L., Robert-Hebmann, V., Sagnier, S., Garcia, E., Curriu, M., Mamoun, R., Blanco, J. and Biard-Piechaczyk, M. 2008, *Autophagy*, 4, 998-1008.
278. Espert, L. and Biard-Piechaczyk, M. 2009, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 335, 307-321.

279. Espert, L., Varbanov, M., Robert-Hebmann, V., Sagnier, S., Robbins, I., Sanchez, F., Lafont, V. and Biard-Piechaczyk, M. 2009, *PLoS One*, 4, e5787.
280. Zhou, D. and Spector, S. A. 2008, *AIDS*, 22, 695-699.
281. Eekels, J. J., Geerts, D., Jeeninga, R. E. and Berkhout, B. 2011, *Antiviral Res.*, 89, 43-53.
282. Eekels, J. J., Sagnier, S., Geerts, D., Jeeninga, R. E., Biard-Piechaczyk, M. and Berkhout, B. 2012, *Virology*, 9, 69.
283. Van Grol, J., Subauste, C., Andrade, R. M., Fujinaga, K., Nelson, J. and Subauste, C. S. 2010, *PLoS ONE*, 5, e11733.
284. Cheng, S. M., Li, J. C., Lin, S. S., Lee, D. C., Liu, L., Chen, Z. and Lau, A. S. 2009, *Blood*, 113, 5192-5201.
285. Li, J. C., Au, K. Y., Fang, J. W., Yim, H. C., Chow, K. H., Ho, P. L. and Lau, A. S. 2011, *AIDS*, 25, 15-25.
286. McCarroll, S. A., Huett, A., Kuballa, P., Chileski, S. D., Landry, A., Goyette, P., Zody, M. C., Hall, J. L., Brant, S. R., Cho, J. H., Duerr, R. H., Silverberg, M. S., Taylor, K. D., Rioux, J. D., Altshuler, D., Daly, M. J. and Xavier, R. J. 2008, *Nat. Genet.*, 40, 1107-1112.
287. Singh, S. B., Davis, A. S., Taylor, G. A. and Deretic, V. 2006, *Science*, 313, 1438-1441.
288. Singh, S. B., Ornatowski, W., Vergne, I., Naylor, J., Delgado, M., Roberts, E., Ponpuak, M., Master, S., Pilli, M., White, E., Komatsu, M. and Deretic, V. 2010, *Nat. Cell Biol.*, 12, 1154-1165.
289. Gregoire, I. P., Richetta, C., Meyniel-Schicklin, L., Borel, S., Pradezynski, F., Diaz, O., Deloire, A., Azocar, O., Baguet, J., Le Breton, M., Mangeot, P. E., Navratil, V., Joubert, P. E., Flacher, M., Vidalain, P. O., André, P., Lotteau, V., Biard-Piechaczyk, M., Roubourdin-Combe, C. and Faure, M. 2011, *PLoS Pathog.*, 7, e1002422.
290. Bukrinsky, M. I. and Etkin, A. F. 1990, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 6, 425-426.
291. Clerc, I., Laverdure, S., Torresilla, C., Landry, S., Borel, S., Vargas, A., Arpin-Andre, C., Gay, B., Briant, L., Gross, A., Barbeau, B. and Mesnard, J. M. 2011, *Retrovirology*, 8, 74.
292. Landry, S., Halin, M., Lefort, S., Audet, B., Vaquero, C., Mesnard, J. M. and Barbeau, B. 2007, *Retrovirology*, 4, 71.
293. Michael, H., Schmidt, H., Fleck, O., Gutz, H., Liedtke, C., Lorentz, A. and Ostermann, K. 1994, *Gene*, 145, 205-210.
294. Torresilla, C., Larocque, E., Landry, S., Halin, M., Coulombe, Y., Masson, J. Y., Mesnard, J. M. and Barbeau, B. 2013, *J. Virol.*, 87, 5089-5105.
295. Tang, S. W., Chen, C. Y., Klase, Z., Zane, L. and Jeang, K. T. 2013, *J. Virol.*, 87, 1699-1707.
296. Campbell, G. R. and Spector, S. A. 2011, *J. Biol. Chem.*, 286, 18890-18902.
297. Shoji-Kawata, S., Sumpter, R., Leveno, M., Campbell, G. R., Zou, Z., Kinch, L., Wilkins, A. D., Sun, Q., Pallauf, K., Macduff, D., Huerta, C., Virgin, H. W., Helms, J. B., Eerland, R., Tooze, S. A., Xavier, R., Lenschow, D.J., Yamamoto, A., King, D., Lichtarge, O., Grishin, N. V., Spector, S. A., Kaloyanova, D. V. and Levine, B. 2013, *Nature*, 494, 201-206.
298. Estrella, J. L., Kan-Sutton, C., Gong, X., Rajagopalan, M., Lewis, D. E., Hunter, R. L., Eissa, N. T. and Jagannath, C. 2011, *Front Microbiol.*, 2, 67.
299. Laplante, M. and Sabatini, D. M. 2012, *Cell*, 149, 274-293.
300. Cherkasova, V. A. and Hinnebusch, A. G. 2003, *Genes Dev.*, 17, 859-872.
301. Rodland, G. E., Tvegard, T., Boye, E. and Grallert, B. 2014, *Cell Cycle*, 13, 453-461.
302. Xiao, F., Huang, Z., Li, H., Yu, J., Wang, C., Chen, S., Meng, Q., Cheng, Y., Gao, X., Li, J., Liu, Y. and Guo, F. 2011, *Diabetes*, 60, 746-756.
303. Tattoli, I., Sorbara, M. T., Vuckovic, D., Ling, A., Soares, F., Carneiro, L. A., Yang, C., Emili, A., Philpott, D. J. and Girardin, S. E. 2012, *Cell Host Microbe*, 11, 563-575.
304. Tattoli, I., Sorbara, M. T., Yang, C., Tooze, S. A., Philpott, D. J. and Girardin, S. E. 2013, *EMBO J.*, 32, 3066-3078.
305. Cosnefroy, O., Jaspert, A., Calmels, C., Parissi, V., Fleury, H., Ventura, M.,

- Reigadas, S. and Andreola, M. L. 2013, *Cell Mol. Life Sci.*, 70, 2411-2421.
306. del Pino, J., Jimenez, J. L., Ventoso, I., Castello, A., Munoz-Fernandez, M. A., de Haro, C. and Berlanga, J. J. 2012, *PLoS One*, 7, e47272.
307. Berlanga, J. J., Ventoso, I., Harding, H. P., Deng, J., Ron, D., Sonenberg, N., Carrasco, L. and de Haro, C. 2006, *EMBO J.*, 25, 1730-1740.
308. Lee, H. K., Lund, J. M., Ramanathan, B., Mizushima, N. and Iwasaki, A. 2007, *Science*, 315, 1398-1401.
309. Zhou, D., Kang, K. H. and Spector, S. A. 2012, *J. Infect. Dis.*, 205, 1258-1267.
310. Salinas, S., Bilsland, L. G. and Schiavo, G. 2008, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 20, 445-453.
311. Nixon, R. A. 2013, *Nat. Med.*, 19, 983-997.
312. Fields, J., Dumaop, W., Rockenstein, E., Mante, M., Spencer, B., Grant, I., Ellis, R., Letendre, S., Patrick, C., Adame, A. and Masliah, E. 2013, *J. Neurovirol.*, 19, 89-101.
313. Alirezai, M., Kiosses, W. B. and Fox, H. S. 2008, *Autophagy*, 4, 963-966.
314. Alirezai, M., Kiosses, W. B., Flynn, C. T., Brady, N. R. and Fox, H. S. 2008, *PLoS One*, 3, e2906.
315. Zhou, D., Masliah, E. and Spector, S. A. 2011, *J. Infect. Dis.*, 203, 1647-1657.
316. Hui, L., Chen, X., Haughey, N. J., Geiger, J. D., 2012, *ASN Neuro*, 4, 243-252.
317. Jagannath, C., Lindsey, D. R., Dhandayuthapani, S., Xu, Y., Hunter, R. L. Jr. and Eissa, N. T. 2009, *Nat. Med.*, 15, 267-276.
318. Li, H., Li, Y., Jiao, J. and Hu, H. M. 2011, *Nature Nanotechnology*, 6, 645-650.
319. Li, Y., Wang, L. X., Pang, P., Cui, Z., Aung, S., Haley, D., Fox, B. A., Urba, W. J. and Hu, H. M. 2011, *Clin. Cancer Res.*, 17, 7047-7057.
320. Ravindran, R., Khan, N., Nakaya, H. I., Li, S., Loebbermann, J., Maddur, M. S., Park, Y., Jones, D. P., Chappert, P., Davoust, J., Weiss, D. S., Virgin, H. W., Ron, D. and Pulendran, B. 2014, *Science*, 343, 313-317.
321. Donia, M., McCubrey, J. A., Bendtzen, K. and Nicoletti, F. 2010, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 70, 784-793.
322. Roy, J., Paquette, J. S., Fortin, J. F. and Tremblay, M. J. 2002, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 3447-3455.
323. Naarding, M. A., Baan, E., Pollakis, G. and Paxton, W. A. 2007, *Retrovirology*, 4, 6.



## Annexe II

Chapitre de livre dans Encyclopedia of AIDS :

### Autophagy and HIV Infection

Laure Papin\*, Coralie F. Daussy\*, Jamal Alfaisal\*, (co-premiers auteurs), Lucile Espert, Fabien P. Blanchet, Julià Blanco et Martine Biard-Piechaczyk

*Reprinted by permission from Springer: Encyclopedia of AIDS, © 2014*





## Autophagy and HIV Infection

Laure Papin<sup>a,§</sup>, Coralie F. Daussy<sup>a,§</sup>, Jamal Alfaisal<sup>a,§</sup>, Lucile Espert<sup>a</sup>, Fabien P. Blanchet<sup>a</sup>, Julià Blanco<sup>b,c</sup> and Martine Biard-Piechaczyk<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS), CNRS-UMR, Montpellier, France

<sup>b</sup>Fundacio irsiCaixa, Institut de Recerca Germans Trias I Pujol (IGTP), Barcelona, Spain

<sup>c</sup>Universitat de Vic (UVIC-UCC), Vic, Spain

### Definition

Autophagy is a fundamental and highly regulated lysosomal degradation mechanism, dependent on specialized autophagy-related proteins (Atgs) (Mizushima et al. 2011). It can be classified into macroautophagy, microautophagy, and chaperone-mediated autophagy, but only macroautophagy will be described and hereafter referred to as autophagy since it is the major lysosomal route for the turnover of cytoplasmic constituents. It is characterized by the formation of membranes that engulf cytoplasmic material through the formation of autophagic vacuoles, called autophagosomes. These structures fuse with lysosomes to form autolysosomes where the sequestered material is digested by lysosomal hydrolases. Before this degradative step, autophagosomes can also fuse with endosomes to form amphisomes, making a direct connection between the endo-lysosomal and autophagic pathways. This process is highly dynamic, and constituents are continuously recycled through lysosomal transporters toward the cytosol. Autophagy plays essential physiological roles in survival, homeostasis, and development and is closely linked to several mechanisms of cell death such as apoptosis, pyroptosis, and necroptosis. It is also involved in the defense against invading intracellular pathogens and acts in both innate and adaptive immunities.

### Introduction

Autophagy has an essential role in cell homeostasis and has been implicated in several pathologies including cancer, neurodegeneration, and myopathies. It is a constitutive mechanism further induced by different stresses or stimuli that are dangerous for the cell. For example, autophagy is essential to provide energy and amino acids during starvation. It also prevents cell death or senescence due to accumulation of defective organelles, in particular damaged mitochondria, and large macromolecular aggregates.

The global autophagy process is presented in Fig. 1.

It requires several specific protein complexes regulating different steps of the autophagy flux (for review (Ravikumar et al. 2010)).

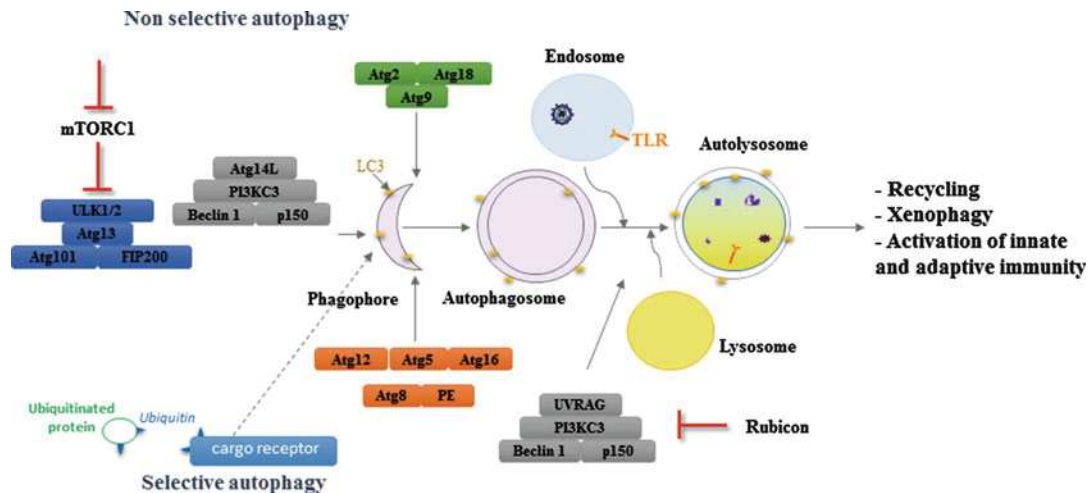
The ULK1/ULK2 complex is involved in the initiation step of autophagy. The function of this multi-protein complex, composed of ULK1/ULK2, Atg13, Atg101, and FIP200, is tightly controlled by the mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1 (MTORC1), which represses autophagy flux initiation under nutrient-rich conditions.

The second complex is composed of class III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3KC3), Beclin 1, p150, and Atg14L, which produces an autophagy-specific pool of phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P).

---

<sup>§</sup> Author contributed equally with all other contributors

\*Email: Martine.biard@cpbs.cnrs.fr



**Fig. 1** Autophagy pathway

Several additional proteins interacting with Beclin 1 ensure a timely and spatial regulation of PI3P formation during the autophagy process.

Then, two unique ubiquitin (Ub)-like conjugation systems drive the elongation and closure of the autophagic membrane. In the first conjugation system, Atg12 is conjugated to Atg5, in a reaction mediated by the Ub-activating enzyme (E1)-like Atg7 and the Ub-conjugating enzyme (E2)-like Atg10. No specific and exclusive Ub ligase (E3)-like has been discovered so far. Atg16L1 interacts with the Atg12–Atg5 conjugate to form a scaffold necessary for LC3 lipidation. The second conjugation system leads to the conjugation of proteins of the Atg8 family to the lipid phosphatidylethanolamine (PE) through a mechanism controlled by Atg7 and Atg3, another E2-like enzyme. The Atg12–Atg5 conjugate is an E3-like for the Atg8–PE conjugation reaction. In humans, the Atg8 family comprises three microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3A, LC3B, and LC3C), one gamma-aminobutyrate receptor-associated protein (GABARAP), and three GABARAP-like proteins (GABARAPL1–3). However, only LC3B has been extensively studied and will be hereafter referred to as LC3. LC3 is synthesized as pro-LC3 and is very rapidly processed by the protease Atg4 to expose its C-terminal glycine. During autophagosome formation, a fraction of this cytosolic, soluble form of LC3, also called LC3-I, can be conjugated to PE to generate the lipid-conjugated form of LC3, or LC3-II, which becomes tightly associated with the autophagosomal membrane while the Atg5–Atg12 conjugate is removed from the neo-formed vesicles. Interestingly, LC3-II can also return to an unlipidated state via the proteolytic activity of Atg4, indicating, therefore, that this process could be reversible, although its functionality is not yet understood.

In turn, Beclin 1 recruits several proteins such as UVRAG and PI3KC3 to form a complex that plays a major role in the maturation step of autophagy. This complex is negatively controlled by the RUN domain-containing protein Rubicon. It is worth noting that Beclin 1 interacts with the antiapoptotic protein Bcl2, as well as Bcl-XL, Bcl-w, and Mcl-1. Beclin 1 binding to Bcl2 represses autophagy when Bcl2 is localized in the endoplasmic reticulum. Upon stress, Beclin 1 dissociates from Bcl-2, allowing the activation of PI3KC3 and the subsequent stimulation of autophagy. This is one of the multiple links that exist between autophagy and apoptosis. Although not yet fully investigated, other cross talks also exist between autophagy and other programmed cell death pathways (necroptosis, pyroptosis) and the Ub–proteasome system, the other main degradative pathway.

Autophagy was first described as a nonselective bulk degradation pathway. However, specific forms of autophagy can also selectively degrade cytoplasmic components such as organelles (e.g., mitochondria, peroxisomes, lipid droplets, ribosomes) and proteins that can also be under aggregate forms.

This function is supported by cargo receptors (e.g., p62/SQSTM1, NBR1, and NDP52), which bind to both “eat-me” signals, mainly molecules of Ub, and Atg8 family members present on the autophagosomal membrane. Binding to Atg8 family engages a specific motif, called an LC3-interacting region (LIR), with the general sequence W/F/YxxI/L/V preceded by acidic residues.

There is now a growing line of evidence that autophagy is also an essential pathway for host defense against viral infection. Autophagy acts at different stages of antiviral immunity, including the degradation of entire viruses or specific viral proteins by a process termed xenophagy, the activation of innate immune signaling by delivery of viral nucleic acids to endosomal Toll-like receptors (TLRs), and the activation of adaptive immunity by presentation of viral antigens to major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules. As a consequence, the viruses have evolved strategies to counteract or to exploit autophagy for their own profit.

HIV-1, as many other viruses, manipulates autophagy for its own replication. Its regulation depends on the cell type (CD4<sup>+</sup> T cells, macrophages, or dendritic cells) and the status of the cells (i.e., infected or uninfected cells). This process is also at the center of the innate and adaptive immune responses against HIV-1.

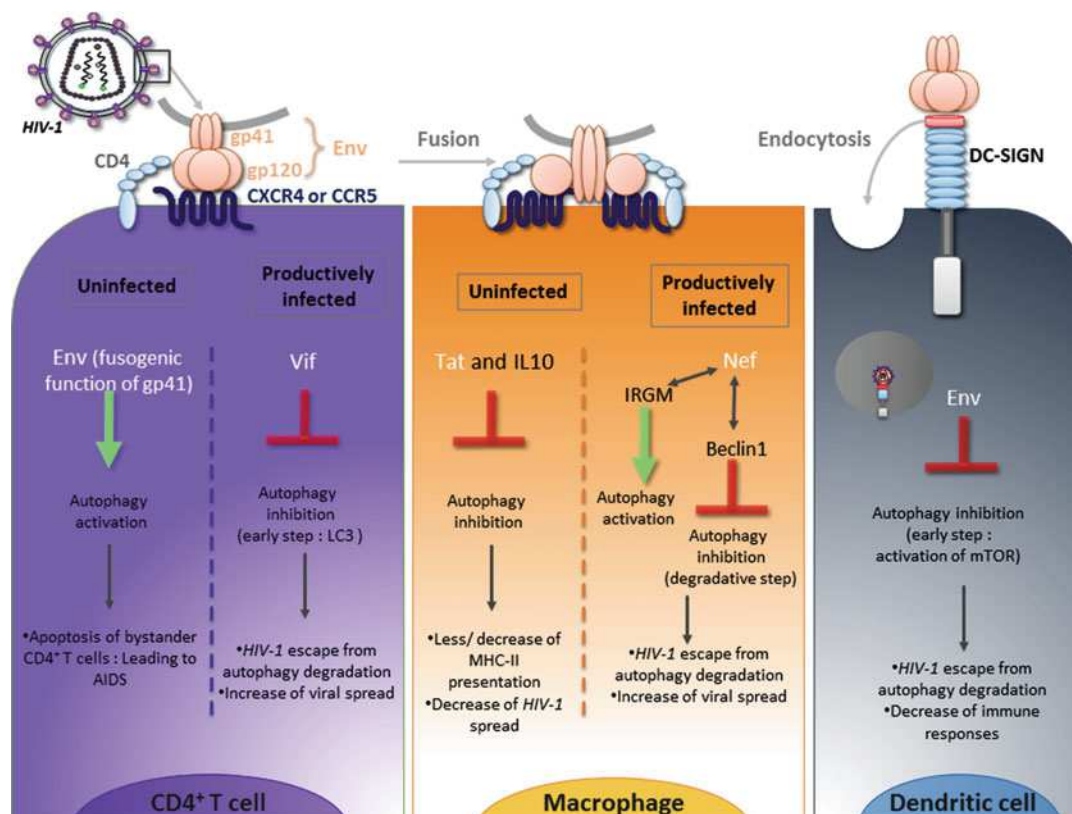
Autophagy is mainly an anti-HIV mechanism, although several Atgs, including Atg7, Atg12, Atg16L, and GABARAPL2, are seemingly required for HIV-1 infection, as demonstrated through a functional genomic screen using HeLa-derived TZM-bl cells (Brass et al. 2008). Several Atgs, in particular Atg5 and Atg16, are also needed for HIV-1 replication in CD4<sup>+</sup> T cells (Eekels et al. 2012), suggesting that either HIV-1 needs the initiation step of autophagy or at least some of its components. It is worth noting that autophagy-related proteins can also function independently of the autophagic process, and this aspect has to be taken into consideration when trying to decipher the link between autophagy, autophagic proteins, and HIV-1 infection.

Strikingly, autophagy is also responsible for the apoptosis of bystander CD4<sup>+</sup> T cells triggered by HIV-1 envelope.

## Autophagy in CD4<sup>+</sup> T Cells During HIV-1 Infection

CD4<sup>+</sup> T lymphocytes represent the main target cell population for HIV-1 infection, and their progressive destruction is the hallmark of AIDS (Barré-Sinoussi et al. 1983). Depletion of this cell population is mainly due to apoptosis of bystander uninfected CD4<sup>+</sup> T cells (“► [Lymphocyte Apoptosis](#)” and Finkel et al. (1995)) for which the viral envelope, composed of gp120 and gp41, plays an important role since it constitutes the primary interface between viruses and target cells. In particular, the gp41-mediated fusion process occurring during HIV-1 entry triggers activation of the intrinsic pathway of apoptosis, with activation of the caspases 9 and 3 (Roggero et al. 2001; Blanco et al. 2003; Garg and Blumenthal 2008). Recently, abortive HIV-1 infection, occurring in the vast majority of bystander quiescent CD4<sup>+</sup> T cells, was shown to be responsible for an inflammatory form of cell death, called pyroptosis (“► [Pyroptosis and HIV Replication](#)”), characterized by the activation of caspase 1 and the release of inflammatory cytokines upon viral DNA sensing by the interferon- $\gamma$ -inducible protein 16 (IFI16) (Doitsh et al. 2014; Monroe et al. 2014).

Importantly, autophagy is also activated in bystander CD4<sup>+</sup> T cells after their contact with infected cells, through the gp41-dependent fusion of both membranes, and leads to their apoptosis (Espert et al. 2006; Denizot et al. 2008). Autophagy contributes, therefore, to the depletion of CD4<sup>+</sup> T cells during HIV-1 infection.



**Fig. 2** Relationship between autophagy and HIV-1 infection of its main target cells, namely, CD4<sup>+</sup> T cells, macrophages, and dendritic cells

Autophagy is an anti-HIV-1 process by specifically degrading Tat, a viral protein essential for viral replication (Sagnier et al. 2015). As a consequence, autophagy is repressed in productively infected cells. Very recent data indicate that autophagy in CD4<sup>+</sup> T cells could be indeed targeted by the viral protein Vif upon specific binding to the autophagy-related protein LC3 (Borel et al. 2015) (Fig. 2, left part).

## Autophagy in Macrophages During HIV-1 Infection

In contrast to CD4<sup>+</sup> T cells, bystander macrophages do not undergo autophagy after contact with HIV-1 envelope (Espert et al. 2009). This blockade is dependent on the activation of Src–Akt and Stat 3 by HIV-1 Tat and IL-10, both previously reported to inhibit autophagy (Van Grol et al. 2010). HIV-1 Tat was also shown to suppress IFN- $\gamma$ -induced autophagy in primary macrophages (Li et al. 2011), suggesting that inhibition of autophagy could negatively impact on innate immune defenses of myeloid cells devoted in the killing of intracellular pathogens. Overall, this result correlated well with the physiopathology reported from HIV-1-infected patients. Indeed, macrophages do not undergo Env-mediated apoptosis and are seemingly not subjected to depletion during HIV-1 infection, at least compared to the level of CD4<sup>+</sup> T cell depletion. These observations raise many relevant but still unsolved questions, including why the fusogenic function of gp41 induces autophagy only in CD4<sup>+</sup> T cells and why Tat and IL-10 would not inhibit autophagy in bystander CD4<sup>+</sup> T cells.

Conversely, in cells from the monocyte/macrophage lineage, autophagy is induced following a productive infection (Espert et al. 2009) and acts as an antiviral mechanism (Espert et al. 2009; Kyei et al. 2009). Surprisingly, two populations of autophagic cells are present, one highly autophagic and the



other weakly autophagic, and viruses could be detected in the weakly autophagic cells but not in the highly autophagic cells, suggesting that autophagy might still be controlled by HIV-1 in these cells to avoid degradation (Espert et al. 2009). Indeed, Nef regulates autophagy in these cells by two ways. First, Nef binds to the immunity-associated GTPase family M (IRGM), inducing autophagy (Gregoire et al. 2011), and second, Nef binds to Beclin 1, blocking the degradative step of autophagy (Kyei et al. 2009).

The dual interaction of HIV-1 with autophagy thus enhances viral yields by using the early stages while inhibiting the late stages of autophagy (Fig. 2, central part).

Apart from Nef, the antisense protein ASP, produced from antisense transcription of the HIV-1 genome, partially co-localizes with LC3. Preliminary data suggest that expression of ASP induces autophagy and increases viral replication in the promonocytic U937 cell line (Torresilla et al. 2013).

## Autophagy in Dendritic Cells During HIV-1 Infection

Although some dendritic cell (DC) subsets could differ in phenotype and functions, one of their hallmarks is their propensity to regulate innate and adaptive immunity.

DC (DCs) are known to regulate innate and adaptive immunity, and most of the subsets express a plethora of pathogen recognition receptors (PRR) (“► [Pathogen Recognition Receptors \(General\)](#)”) facilitating their antigen sampling activity and contributing to their quickness in efficiently igniting adapted immune responses. Some DC subsets were also reported to be involved in the early events of HIV transmission. Even if they are mostly refractory to productive HIV infection, these cells can readily internalize virions via different receptors expressed at the surface, like C-type (CD209/DC-SIGN) or I-type (CD169/SIGLEC-1) lectins, and transmit them toward CD4<sup>+</sup> T cells.

Upon viral challenge, autophagy is rapidly inhibited in DCs through the activation of mTOR by HIV-1 envelope. This autophagy blockade impairs Toll-like receptor-mediated innate immune response while also strongly affecting antigen processing and MHC-II-mediated antigen presentation to CD4<sup>+</sup> T cells (Blanchet et al. 2010) (Fig. 2, right part) potentially limiting anti-HIV immune responses.

## Conclusion

Taken together, these results suggest a complex, cell-type-specific relationship between HIV-1 and the autophagic response and highlight the complexity of HIV-1 pathogenesis. Autophagy appears to play different roles in controlling HIV-1 replication, depending on the cell type. In turn, HIV-1 has evolved individualized strategies to manipulate autophagy in each cell type. Whatever the cells involved, autophagy is unambiguously involved in HIV-1 pathogenesis, and more investigation on its antiviral role should strengthen our understanding of the interplay between the virus and the host.

Further studies are needed to (i) decipher the mechanisms that are activated after gp41-dependent membrane fusion during the entry of the virus leading to autophagy, (ii) understand the link between autophagy and apoptosis or other cell death mechanisms in the bystander CD4<sup>+</sup> T cells, (iii) determine the viral proteins responsible for the control of autophagy in the infected cells, and (iv) understand the connections between autophagy and viral trafficking through endocytic compartments linked to immune responses in DC.

Modulation of the autophagy flux might thus be a promising approach to improve immunomodulatory approaches to treat HIV-1 infection aimed to increase immune responses in complementation to HAART.

## Acknowledgment

Laure Papin doctoral fellowship is funded by Sidaction, and Jamal Alfaisal is profiting from the DUNIA BEAM Erasmus Mundus scholarship, funded with the support of the European Commission.

## Cross-References

- ▶ [Lymphocyte Apoptosis](#)
- ▶ [Pathogen Recognition Receptors \(General\)](#)
- ▶ [Pyroptosis and HIV Replication](#)

## References

- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Rozembaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220:868–70.
- Blanchet FP, Moris A, Nikolic DS, Lehmann M, Cardinaud S, Stalder R, Garcia E, Dinkins C, Leuba F, Wu L, Schwartz O, Deretic V, Piguet V. Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunoamphisomes in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses. *Immunity*. 2010;32:654–69.
- Blanco J, Barretina J, Ferri KF, Jacotot E, Gutierrez A, Armand-Ugon M, Cabrera C, Kroemer G, Clotet B, Este JA. Cell-surface-expressed HIV-1 envelope induces the death of CD4 T cells during GP41-mediated hemifusion-like events. *Virology*. 2003;305:318–29.
- Borel S, Robert-Hebmann V, Alfaisal J, Jain A, Faure M, Espert L, Chaloin L, Paillart JC, Johansen T, Biard-Piechaczyk M. HIV-1 Vif interacts with microtubule-associated protein light chain 3 and inhibits autophagy. *AIDS* 2015. In press.
- Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, Lieberman J, Elledge SJ. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science*. 2008;319:921–6.
- Denizot M, Varbanov M, Espert L, Robert-Hebmann V, Sagnier S, Garcia E, Curriu M, Mamoun R, Blanco J, Biard-Piechaczyk M. HIV-1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells. *Autophagy*. 2008;4:998–1008.
- Doitsh G, Galloway NL, Geng X, Yang Z, Monroe KM, Zepeda O, Hunt PW, Hatano H, Sowinski S, Munoz-Arias I, Greene WC. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*. 2014;505:509–14.
- Eekels JJ, Sagnier S, Geerts D, Jeeninga RE, Biard-Piechaczyk M, Berkhout B. Inhibition of HIV-1 replication with stable RNAi-mediated knockdown of autophagy factors. *Virol J*. 2012;9:69.
- Espert L, Denizot M, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, Gay B, Varbanov M, Codogno P, Biard-Piechaczyk M. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J Clin Invest*. 2006;116:2161–72.

- Espert L, Varbanov M, Robert-Hebmann V, Sagnier S, Robbins I, Sanchez F, Lafont V, Biard-Piechaczyk M. Differential role of autophagy in CD4 T cells and macrophages during X4 and R5 HIV-1 infection. *PLoS One*. 2009;4:e5787.
- Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, Monks C, Baba TW, Ruprecht RM, Kupfer A. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat Med*. 1995;1:129–34.
- Garg H, Blumenthal R. Role of HIV Gp41 mediated fusion/hemifusion in bystander apoptosis. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:3134–44.
- Gregoire IP, Richetta C, Meyniel-Schicklin L, Borel S, Pradezynski F, Diaz O, Deloire A, Azocar O, Baguet J, Le Breton M, Mangeot PE, Navratil V, Joubert PE, Flacher M, Vidalain PO, Andre P, Lotteau V, Biard-Piechaczyk M, Rabourdin-Combe C, Faure M. IRGM is a common target of RNA viruses that subvert the autophagy network. *PLoS Pathog*. 2011;7:e1002422.
- Kyei GB, Dinkins C, Davis AS, Roberts E, Singh SB, Dong C, Wu L, Kominami E, Ueno T, Yamamoto A, Federico M, Panganiban A, Vergne I, Deretic V. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J Cell Biol*. 2009;186:255–68.
- Li JC, Au KY, Fang JW, Yim HC, Chow KH, Ho PL, Lau AS. HIV-1 trans-activator protein dysregulates IFN-gamma signaling and contributes to the suppression of autophagy induction. *AIDS*. 2011;25:15–25.
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:107–32.
- Monroe KM, Yang Z, Johnson JR, Geng X, Doitsh G, Krogan NJ, Greene WC. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. *Science*. 2014;343:428–32.
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2010;90:1383–435.
- Roggero R, Robert-Hebmann V, Harrington S, Roland J, Vergne L, Jaleco S, Devaux C, Biard-Piechaczyk M. Binding of human immunodeficiency virus type 1 gp120 to CXCR4 induces mitochondrial transmembrane depolarization and cytochrome c-mediated apoptosis independently of Fas signaling. *J Virol*. 2001;75:7637–50.
- Sagnier S, Daussy CF, Borel S, Robert-Hebmann V, Faure M, Blanchet FP, Beaumelle B, Biard-Piechaczyk M, Espert L. Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4+ T lymphocytes. *J Virol*. 2015;89:615–25.
- Torresilla C, Larocque E, Landry S, Halin M, Coulombe Y, Masson JY, Mesnard JM, Barbeau B. Detection of the HIV-1 minus-strand-encoded antisense protein and its association with autophagy. *J Virol*. 2013;87:5089–105.
- Van Grol J, Subauste C, Andrade RM, Fujinaga K, Nelson J, Subauste CS. HIV-1 inhibits autophagy in bystander macrophage/monocytic cells through Src-Akt and STAT3. *PLoS One*. 2010;5:e11733.





## Annexe III

Editorial dans Oncotarget :

### **Autophagy restricts HIV-1 infection**

Coralie F. Daussy, Bruno Beaumelle et Lucile Espert



## Autophagy restricts HIV-1 infection

Coralie F. Daussy, Bruno Beaumelle and Lucile Espert

Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) is a retrovirus that targets cells from the immune system such as the CD4 T lymphocytes, the macrophages and the dendritic cells (DCs). Although these host cells possess various defense mechanisms to fight this infection, HIV-1 has evolved multiple strategies to counteract them. For the past ten years, researchers have been focused on the identification of HIV-1 restriction factors and their mode of action for the development of new therapeutic strategies [1].

Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is a major cellular catabolic pathway involved in several fundamental physiological processes, such as homeostasis, innate and adaptive immunities, development and differentiation. It is characterized by the formation of vacuoles called autophagosomes that sequester cytoplasmic constituents. The sequestered material is then degraded and recycled after fusion of autophagosomes with lysosomes. The autophagic pathway is orchestrated by more than thirty specific proteins named ATGs acting at different levels of the process [2]. Autophagy is believed to be one of the most ancient mechanism of defense against intracellular pathogens. Consequently, pathogens evolved strategies to prevent or hijack this process to their own benefit. Autophagy has long been considered as a bulk degradation pathway but it becomes clear that it is a highly selective process. The selectivity of its substrates is mediated by adaptor proteins, such as p62/SQSTM1, NDP52, NBR1 or Optineurin, which interact with ubiquitinated proteins and organelles, targeting specific cargos to autophagosomes [2].

We have demonstrated that HIV-1 envelope glycoproteins (Env), trigger autophagy at the very first step of CD4 T cells infection by their interaction with specific receptors (i.e. CD4 and CCR5 or CXCR4). This autophagic process exerts a powerful anti-HIV effect by selectively degrading the viral transactivator Tat (Transactivator of Transcription), a viral protein absolutely required for the transcription of viral genes. The selectivity of this degradation is conferred by p62/SQSTM1, which interacts with Tat independently of its ubiquitination [3]. Beside its role in transcriptional elongation of HIV genes, Tat is also secreted by infected cells and can be captured by neighboring uninfected cells where it activates the transcription of different cellular genes or induces their death by apoptosis. Interestingly, incoming Tat can also be degraded by autophagy, expanding the potential role of

this mechanism beyond the viral replication itself.

By selectively addressing Tat to lysosomal degradation, autophagy is a major anti-HIV pathway. The virus has thus evolved to avoid this powerful antiviral effect. Accordingly, HIV-1 is able to counteract autophagy at various levels by the action of several viral proteins, depending on the cellular context. For example, the HIV protein Vif, which interacts with the essential ATG protein MAP-LC3B (Microtubule Associated Protein-Light Chain 3B), has been shown to inhibit autophagy at the late steps of the viral replication cycle in CD4 T lymphocytes. Another HIV protein, Nef, is able to block the degradative steps of autophagy in human macrophages by interacting with the ATG protein Beclin 1. In the same cell type, Nef is also able to induce the cytoplasmic sequestration of the TFEB transcription factor, which is known to participate to the synthesis of ATGs. In DCs, autophagy is blocked by the HIV-1-Env-mediated Akt activation, likely avoiding the viral antigen presentation to CD4 T cells by the major histocompatibility complex [4]. The drugs currently used to treat HIV-infected patients target different steps of the viral cycle. Thus, stimulating the host response would be an added value to the already existing treatments. Within this context, it is tempting to speculate that new therapeutic agents that can induce autophagy could be beneficial for HIV-1 infected patients. Along these lines, we have shown that Torin-1, which induces autophagy by inhibiting mTOR, decreases the level of HIV-1 production in CD4 T lymphocytes. Rapamycin, which has the same mode of action and which is already clinically approved, has also been shown to possess anti-HIV properties both *in vitro* and *in vivo* [5]. Moreover, other strong inducers of autophagy such as vitamin D3 and a fusion peptide between a Tat-cell penetrating peptide and the autophagic protein beclin 1 have been shown to drastically inhibit HIV-1 replication in primary human macrophages through autophagy induction [6]. Finally, autophagy modulation has already been proposed to be a potential therapeutic target for diverse diseases, including neurodegenerative disorders and cancers. It should be noted that no deleterious effect of a chemically upregulation of autophagy *in vivo* has been reported to date [7]. In conclusion, although a lot of work is needed to better understand the relationship between autophagy and pathogens, it becomes clear that the manipulation of this process is a promising route for the elaboration of new effective treatments.

Lucile Espert: CPBS FRE 3689 CNRS – Université de Montpellier, Montpellier, France

**Correspondence to:** Lucile Espert, **email** [lucile.espert@cpbs.cnrs.fr](mailto:lucile.espert@cpbs.cnrs.fr)

**Keywords:** Autophagy, HIV

**Received:** July 16, 2015

**Published:** August 07, 2015

## REFERENCES

1. Simon V, et al. Nature Immunology. 2015; 16: 546–553.
2. Reggiorri F, et al. International Journal of Cell Biology. 2012; 219625.
3. Sagnier S, et al. The Journal of Virology. 2015; 89: 615–625.
4. Dinkins C, et al. Immunology and Cell Biology. 2015; 93: 11-7.
5. Donia M, et al. British Journal of Clinical Pharmacology. 2010; 70: 784-93.
6. Levine B, et al. The Journal of Clinical Investigation. 2015; 125: 14-24.
7. Rubinsztein DC, et al. Nature Reviews Drug Discovery. 2012; 11: 709-30.

## Annexe IV

Revue dans Virologie

L'autophagie sélective au cours des infections virales

Coralie F. Daussy et Lucile Espert





# **L'autophagie sélective au cours des infections virales**

Coralie F Daussey et Lucile Espert

CPBS, FRE3689 CNRS/UM – 1919, route de Mende – 34293 Cedex 5, France.

## **Mots-clés**

Autophagie sélective, Immunité antivirale, virophagie, récepteurs autophagiques

## **Résumé**

L'autophagie est une voie catabolique majeure impliquée dans d'importantes fonctions cellulaires comme l'homéostasie, le développement, la différenciation et l'immunité. Par conséquent, des dérégulations de ce processus sont observées dans de nombreuses pathologies. La fonction principale de l'autophagie est la dégradation de composants cellulaires par voie lysosomale après leur séquestration dans des vacuoles appelées autophagosomes. L'autophagie peut dégrader de manière aléatoire ses substrats, comme c'est le cas au cours de carences nutritionnelles, mais peut également être hautement sélective grâce à des protéines permettant le ciblage des substrats aux autophagosomes. Ces protéines, appelées récepteurs autophagiques, se lient d'une part au substrat à dégrader et, d'autre part, aux protéines autophagiques de la famille « *ATG8-like* » (divisée en deux sous-familles LC3 et GABARAP chez les mammifères) présentes sur les autophagosomes. Le rôle de l'autophagie sélective reste encore peu étudié au cours des infections virales. Cependant, la littérature montre que les virus ont évolué pour bloquer, détourner ou utiliser ce processus afin de favoriser leur réplication.

## **Selective autophagy during viral infections**

Coralie F Daussy and Lucile Espert

CPBS, FRE3689 CNRS/UM – 1919, route de Mende – 34293 Cedex 5, France.

### **Key words**

Selective autophagy, autophagic receptors, antiviral immunity, virophagy

### **Abstract**

Autophagy is a major catabolic pathway involved in several important cellular functions including homeostasis, development, differentiation and immunity. Consequently, deregulations of this process have been observed in several pathologies. Autophagy leads to the lysosomal degradation of cellular components after their sequestration in vacuoles called autophagosomes. During nutrient starvation, autophagy degrades randomly cytoplasmic components, but it is now well established that this process can be highly selective thanks to proteins that allow the specific targeting of substrates to autophagosomes. These proteins, called autophagy receptors, are able to bind specific substrates and the members of the “ATG8-like” family (divided in two subfamilies: LC3 and GABARAP in mammals), which are decorating autophagosomes. The role of selective autophagy during viral infection is not extensively studied yet. However, the literature shows that viruses have evolved to block, divert or use this process to promote their replication.

## I. Introduction

L'autophagie, du grec « se manger », désigne un processus de dégradation cellulaire hautement conservé chez les eucaryotes et essentiel pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. Cette dernière dépend d'un équilibre finement régulé entre biosynthèse et catabolisme des macromolécules. A l'état basal, la cellule dispose de deux systèmes majeurs de dégradation de ses composants qui diffèrent dans leur fonction et dans la nature de leur substrat : la voie du protéasome, qui est responsable de la dégradation des protéines à courte durée de vie, et l'autophagie qui va prendre en charge les protéines à longue durée de vie ainsi que les organelles surnuméraires. Ces deux voies sont étroitement liées afin d'assurer leur rôle catabolique de manière optimale dans la cellule. Au-delà de son rôle au niveau basal, l'autophagie peut être induite en situation de stress. Par exemple, en cas de carence nutritionnelle, la dégradation et le recyclage par autophagie de constituants cellulaires va permettre l'apport énergétique nécessaire à la survie de la cellule. La nature des substrats dégradés, suite à un stress, est variée. Ainsi, l'autophagie peut prendre en charge l'élimination d'organelles endommagées, de protéines mal conformées ou encore d'agrégats. Par conséquent, ce processus est impliqué dans de nombreuses grandes fonctions cellulaires comme la survie, le développement, la différenciation, le vieillissement ou l'immunité [1, 2]. Concernant cette dernière, l'autophagie est probablement un des plus anciens mécanismes de défense contre les infections. Ainsi, elle prend part à la production d'interférons de type I, régule l'inflammation, la présentation antigénique mais a également la capacité de dégrader des agents pathogènes [3].

Il existe différents types d'autophagie : la macroautophagie, qui met en jeu plus de 30 protéines appelées ATG pour « AuTophagy-related », la microautophagie et l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA : *Chaperone-Mediated Autophagy*) [4, 5]. De plus, des mécanismes d'autophagie non canoniques ont également été décrits, suggérant que l'autophagie peut se produire en absence de certaines ATGs clés, par des mécanismes non conventionnels de biogénèse des autophagosomes [6]. La microautophagie se caractérise par une invagination de la membrane lysosomale permettant la séquestration de substrats à dégrader [7]. La CMA est un mécanisme permettant la dégradation par le lysosome de protéines cytosoliques contenant un motif peptidique de type « KFERQ » reconnu par la protéine chaperonne Hsc70. Cette forme d'autophagie, non conservée à travers l'évolution, n'est présente que chez les eucaryotes supérieurs [8]. Enfin, le processus de

macroautophagie, appelée « autophagie » dans la suite de cette revue, se décline en plusieurs étapes. La première d'entre elles aboutit à la formation d'une double membrane, appelée phagophore (aussi appelé membrane d'isolation). Puis, le phagophore s'allonge, au cours de l'étape d'élongation et se referme pour former une vacuole, l'autophagosome, dans laquelle sont séquestrés des constituants cytoplasmiques. Le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries, les endosomes, ou la membrane plasmique seraient autant d'origines différentes pour la formation de cette structure [9]. Enfin, l'autophagosome fusionne avec le lysosome dans lequel le matériel séquestré est déversé, dégradé par les enzymes lysosomales, puis recyclé (Figure 1). Plusieurs voies de signalisation, ainsi que deux systèmes de conjugaison semblables au processus d'ubiquitination, sont requis pour le déroulement de ce processus (Figure 1). Ces différentes étapes, qui impliquent des voies de signalisation extrêmement complexes, sont décrites brièvement ci-après.

### **L'initiation**

Le phagophore se forme à la suite d'un stress comme la carence nutritionnelle. Dans des conditions riches en nutriments, la kinase mTORC1 (*mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*) inhibe l'autophagie en s'associant avec le complexe ULK, composé de ULK1/2, ATG13, ATG101 et FIP200. En condition de carence nutritionnelle, l'activité de mTORC1 est inhibée par l'AMPK, conduisant à la dissociation de mTORC1 du complexe ULK. ULK va alors phosphoryler ATG13 et FIP200 et conduire au recrutement du complexe PI3 Kinase de classe III/Beclin 1 au site de formation de l'autophagosome. Il est à noter que le complexe ULK1 peut également être directement activé par l'AMPK, indépendamment de mTORC1 [10].

Le complexe PI3 Kinase de classe III/Beclin 1 est chargé de produire du PI3P (*Phosphatidylinositol 3 Phosphate*), permettant ainsi le recrutement de protéines de liaison au PI3P comme WIPI-1 et ATG14 [11, 12].

### **L'élongation**

L'élongation du phagophore est dépendante de deux systèmes de conjugaison semblables au processus d'ubiquitination. Le premier complexe fait intervenir la protéine autophagique ATG12 qui est activée par l'enzyme E1 d'activation ATG7, transférée sur l'enzyme E2 de conjugaison ATG10 puis liée de façon covalente à ATG5. Le conjugué ATG5-ATG12 se lie alors à ATG16L1 de manière non covalente pour former le premier complexe ATG5-

ATG12/ATG16L1. Le deuxième système de conjugaison a la particularité de conduire à la liaison covalente entre une protéine autophagique de la famille ATG8 à un lipide, le Phosphatidyléthanolamine (PE). ATG8 est l'unique représentant de cette famille chez la levure et comprend 7 orthologues chez les mammifères : MAP-LC3A, B, B2 et C (*Microtubule-Associated Protein-Light Chain 3*), communément appelées LC3A, B, B2 et C, GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2 (*Gamma-AminoButyric Acid type A (GABA(A) Receptor-Associated Protein*). Dans ce système, le précurseur de la protéine ATG8 (pro-ATG8) est immédiatement clivé par la protéase ATG4 après sa synthèse pour produire la protéine ATG8-I cytosolique. L'intervention de la E1 ATG7 puis de la E2 ATG3 conduit à la conjugaison d'ATG8 au PE, permettant ainsi la formation du deuxième conjugué ATG8-PE et l'élongation des membranes autophagosomales. Le conjugué ATG5-ATG12/ATG16L1 exerce ici le rôle de E3 ligase pour la formation de ce dernier complexe. Le conjugué ATG8-PE, aussi appelé ATG8-II, est localisé sur les autophagosomes, en faisant ainsi un excellent marqueur de ces structures [13]. LC3B, souvent appelé simplement LC3, est l'ATG de la famille ATG8 le plus étudié. La plupart du temps, l'autophagie est donc suivie en analysant ses formes cytosolique et conjuguée au PE, LC3-I et LC3-II respectivement.

### **La maturation et le recyclage**

L'étape de maturation, qui reflète le « flux autophagique », consiste en la fusion de l'autophagosome avec le lysosome, formant une structure appelée alors « autolysosome », et permettant la dégradation des éléments séquestrés. Plusieurs protéines sont impliquées dans cette fusion, notamment la protéine UVRAG retrouvée en complexe avec le complexe PI3 Kinase de classe III/Beclin 1. Il faut noter que l'autophagie peut ici être connectée au processus d'endocytose. En effet, les endosomes peuvent fusionner avec les autophagosomes, formant des structures alors appelées « amphisomes », capables de fusionner avec les lysosomes. Une fois dans l'autolysosome, le contenu de l'autophagosome ou de l'amphisome est dégradé par les protéases lysosomales et recyclé pour une utilisation par la cellule [14].

## **II. Autophagie sélective**

La dégradation autophagique a longtemps été décrite comme s'effectuant de manière aléatoire mais il est maintenant clairement établi que ce processus peut être hautement sélectif. Chez les mammifères, cette sélectivité est apportée par une famille de protéines

appelées « récepteurs autophagiques » qui vont permettre de cibler spécifiquement des cargos à la dégradation (Figure 2A). Ainsi, plusieurs termes pour qualifier ce processus sont apparus en fonction de la cible dégradée [15]. Par exemple, on parle de mitophagie pour définir la dégradation sélective des mitochondries, de pexophagie pour celle des peroxisomes, de ribophagie pour les ribosomes, d'agrégophagie pour les agrégats, etc. Le terme xénophagie est employé pour définir la dégradation spécifique des micro-organismes pathogènes intracellulaires [16] (Figure 2B).

Le premier récepteur autophagique à avoir été identifié est la protéine p62/SQSTM1 (sequestosome 1) [17]. Depuis, la liste de ces facteurs ne cesse de croître (Tableau I). Parmi leurs caractéristiques communes, ces protéines ont toutes la capacité de se lier aux membres de la famille « ATG8-like » par un site conservé appelé LIR (*LC3-Interacting Region*). L'étude des différents récepteurs autophagiques a permis de faire émerger la séquence LIR consensus suivante : W/F/Y-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>-L/I/V, comprenant un résidu aromatique en première position et un résidu hydrophobe en quatrième position. Des résidus acides sont souvent retrouvés dans au moins une des trois positions précédant l'acide aminé aromatique et, s'il n'y a pas de résidu acide dans cette position, on retrouve un résidu acide en X<sub>1</sub> [18]. Un programme informatique nommé « iLIR » (*In silico identification of functional LC3 Interacting Region Motifs*, disponible à l'adresse suivante : <http://repeat.biol.ucy.ac.cy/iLIR/>) a été développé par des bio-informaticiens afin de permettre l'identification de sites LIRs potentiels sur les protéines [19]. Une autre caractéristique commune à tous les récepteurs autophagiques est qu'ils sont dégradés en même temps que les cargos qu'ils conduisent à l'autophagie. De plus, la délétion de ces récepteurs n'affecte pas la fonction basique de la machinerie autophagique. Enfin, ils possèdent des domaines de liaison protéine-protéine ou des domaines de liaison aux membranes permettant l'interaction avec différents types de cargos.

Il existe différents types de récepteurs autophagiques :

- Les SLRs (*sequestosome 1-like receptors*), nommés ainsi car ils partagent des caractéristiques avec p62/SQSTM1 (Tableau I). Dans la plupart des cas, les cargos sont reconnus grâce à une étiquette ubiquitine [20-22]. Cependant, le récepteur NDP52 peut également reconnaître les cargos à dégrader via son interaction avec la Galectine 8, comme c'est le cas au cours d'infections bactériennes. L'entrée des bactéries dans le cytoplasme de leur cellule cible altère la membrane des phagosomes dans lesquels elles sont contenues. Ces altérations sont reconnues par la famille des galectines, lectines cytosoliques se liant aux

glycans exposés sur les vésicules endommagées. De ce fait, les galectines sont des récepteurs « senseurs de dangers » qui surveillent l'intégrité des compartiments endosomaux et lysosomaux et qui alertent ainsi la cellule de la présence de bactéries intracellulaires. Dans cette famille, la galectine 8 a été montrée comme limitant la prolifération de *Salmonella Typhimurium* par sa capacité à induire l'autophagie en se liant au récepteur autophagique NDP52 [20, 21]. Ainsi, les galectines représentent, avec l'ubiquitine, une étiquette de reconnaissance par les récepteurs autophagiques.

- Les récepteurs autophagiques se lient directement aux membranes. C'est, par exemple, le cas de BNIP3L/NIX (*NIP3-like protein X*), BNIP3, Bcl2-L-13 (*Bcl2-Like protein 13*) et FUNDC1 (*FUN14 Domain Containing 1*), dans le cas de la mitophagie. Ces récepteurs possèdent, d'une part, un domaine transmembranaire permettant leur ancrage dans la membrane de la mitochondrie, et d'autre part, un site LIR permettant leur liaison à LC3 (Tableau I) [23, 24].

- Les récepteurs spécialisés, comme Stbd1 (*starch-binding-domain-containing protein 1*), qui reconnaît spécifiquement le glycogène dans le cas de la glycophagie [15, 25, 26].

La présence d'une étiquette pour la reconnaissance des cargos n'est pas une généralité dans les mécanismes d'autophagie sélective. En effet, la famille des protéines TRIM (*TRIfpartite Motif*) a récemment été identifiée comme médiateur d'un mécanisme d'autophagie sélective appelé « autophagie de précision ». Ce type d'autophagie se démarque de l'autophagie sélective conventionnelle par le fait que l'autophagosome s'assemble directement autour du récepteur. Le processus se déroule en deux temps : (i) Les protéines TRIMs reconnaissent leur cible grâce à une interaction protéine-protéine directe sans nécessiter la présence d'une étiquette spécifique. (ii) La protéine TRIM, liée à sa protéine cible, sert de plateforme d'assemblage pour la formation du phagophore. TRIM s'associe directement avec les complexes ULK1 et Beclin-1 pour former une structure appelée « TRIMosome » [27]. Comme les récepteurs de l'autophagie sélective conventionnelle, certaines protéines TRIM ont la capacité de se lier aux différentes protéines de la famille « *ATG8-like* ». Cette liaison peut être directe via un motif LIR ou indirecte via une interaction avec des récepteurs autophagiques comme p62 [27-29].

Enfin, des travaux ont permis de montrer que les récepteurs autophagiques peuvent également avoir des actions indépendantes de l'adressage des cargos aux autophagosomes. Ainsi, la protéine NDP52 est capable de réguler positivement les étapes tardives de



l'autophagie en régulant la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes [30, 31]. Ces nouveaux concepts, qui vont permettre de progresser dans la compréhension des mécanismes d'autophagie sélective chez les mammifères, montrent par la même occasion leur complexité et leur importance en biologie cellulaire.

### **III. Autophagie et défense contre les agents pathogènes**

L'autophagie a un rôle important dans les réponses immunes innée et adaptative. En effet, l'invasion par des agents pathogènes perturbe l'homéostasie de la cellule à différents niveaux et active l'autophagie pour rétablir cet équilibre. L'autophagie est notamment induite lors de l'activation de différents senseurs permettant la reconnaissance des agents pathogènes comme les PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), comprenant les TLRs (*Toll-Like Receptors*), les NLRs (*NOD-Like Receptors*), et les RLRs (*RIG-I-Like Receptors*). L'interféron de type I, sécrété en réponse aux infections virales, l'interleukine 1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  sont également des inducteurs d'autophagie [32].

A la suite de son activation par ces différents signaux, l'autophagie joue un rôle majeur dans l'élimination des micro-organismes pathogènes intracellulaires par un processus d'autophagie sélective appelé xénophagie. C'est l'étude du rôle de l'autophagie au cours des infections bactériennes, notamment par *Streptococcus pyogenes* et *Mycobacterium tuberculosis*, qui a permis de mieux comprendre la xénophagie [33, 34]. Suite à ces premiers travaux, il a été montré que l'autophagie joue un rôle sur plusieurs agents pathogènes comme des bactéries (par exemple *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* et *Salmonella Typhimurium*), mais aussi des parasites (*Toxoplasma gondii*) et des virus (par exemple le virus Sindbis (SINV), le virus Chikungunya (CHIKV) ou le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1)). Des relations complexes ont été mises en place au cours de l'évolution entre l'autophagie et les agents pathogènes. Par conséquent, même si ce mécanisme restreint leur virulence dans les organismes eucaryotes, ces derniers ont développé des moyens pour éviter l'autophagie, la bloquer ou, au contraire, l'utiliser afin de se répliquer efficacement [35] (Tableau II).

Enfin, il faut noter que le processus autophagique exerce également d'autres fonctions importantes dans l'immunité. En effet, l'autophagie est impliquée dans la régulation de l'inflammasome, des PRRs et l'activation de l'immunité adaptative par la présentation d'antigènes viraux aux molécules des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe

I et II [36]. Elle a également un rôle dans la sélection thymique et l'homéostasie des lymphocytes [37].

#### **IV. Autophagie et infections virales**

Un grand nombre de virus à ARN ou ADN est en mesure de bloquer l'autophagie à plusieurs niveaux du processus (Figure 3). En effet, ils peuvent bloquer les phases d'initiation/élongation ou les phases plus tardives, notamment la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. Dans le premier cas, une absence d'augmentation, voire une diminution, du nombre des autophagosomes est observée. C'est notamment le cas de plusieurs *Herpesvirus* comme HSV-1 (*Herpes Simplex Virus Type 1*), HCMV (*Human CytoMegalovirus*) ou KSHV (*Kaposi's Sarcoma-associated Herpes Virus*) [38]. HSV-1 est capable de bloquer l'initiation de l'autophagie par différents moyens. D'une part, la protéine virale ICP34.5 interagit avec Beclin 1 et inhibe l'induction d'autophagie [39]. D'autre part, la protéine virale tardive Us11 impose un deuxième contrôle de ce blocage en interagissant avec la protéine PKR (*dsRNA-dependent protein kinase*). En effet, la PKR est connue pour le rôle antiviral qu'elle exerce en phosphorylant le facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$ . Par ce biais, elle induit le processus autophagique. Ainsi, Us11 peut empêcher l'arrêt de la traduction des protéines induit par la PKR et inhiber ainsi l'autophagie induite en réponse à l'infection par HSV-1 [40]. Des virus peuvent aussi bloquer les étapes tardives de l'autophagie : lors de ces infections, on observe une augmentation du nombre d'autophagosomes dans le cytoplasme des cellules cibles en absence de fusion avec les lysosomes et des étapes de dégradation. Ce mécanisme d'inhibition de l'autophagie a, par exemple, été observé au cours de l'infection par le poliovirus, le virus de la Dengue (DENV), le virus de l'hépatite C (HCV), le rotavirus ou le virus de la grippe. Dans les cas de l'infection par le poliovirus ou HCV, le blocage des phases tardives de l'autophagie permettrait d'accumuler des membranes autophagosomales qui serviraient de plate-forme de réplication [41]. Dans le cas du virus de la grippe, l'inhibition de la fusion entre autophagosomes et lysosomes par la protéine virale M2 préviendrait la dégradation des protéines virales et leur présentation par le CMH, et réduirait ainsi la réponse immunitaire contre cette infection [42]. Certains virus sont capables d'inhiber différentes étapes de l'autophagie en fonction du contexte comme c'est le cas pour le VIH-1 (*Retroviridae*, genre *Lentivirus*). Les protéines d'enveloppe de ce virus induisent l'autophagie dans les cellules T CD4 et ce processus est inhibé à différents niveaux en fonction du type cellulaire ciblé. En

effet, le virus bloque l'autophagie au niveau de ses premières étapes, via l'action de la protéine virale Vif, dans les lymphocytes T CD4 et au niveau de la maturation, par l'action de la protéine virale Nef, dans les macrophages [43-45]. Dans les cellules dendritiques, le VIH-1 peut également inhiber la présentation antigénique en bloquant les étapes d'initiation de l'autophagie [43-47].

Enfin, le processus autophagique complet est quelquefois utilisé pour fournir l'énergie nécessaire aux virus pour leur réplication. Ainsi, le virus de la Dengue induit la dégradation autophagique de gouttelettes lipidiques et de triglycérides dans le but de produire de l'ATP nécessaire à sa réplication [48, 49]. Dans le cas du virus de la rougeole (*Measle Virus*, MeV), l'autophagie est induite, fonctionnelle et bénéficie au virus en limitant la mort des cellules infectées et en permettant une meilleure réplication virale [50]. Le virus de la varicelle et du zona (*Varicella Zoster Virus*, VZV) induit l'autophagie dans ses cellules cibles et l'utilise pour la biosynthèse et la maturation de ses glycoprotéines [51].

L'ensemble de ces données montre l'amplitude et la complexité des relations existantes entre les infections virales et la réponse autophagique de l'hôte. Le rôle majeur de l'autophagie dans l'immunité innée a donc imposé une pression de sélection sur les virus. La recherche des mécanismes par lesquels l'autophagie exerce ses effets antiviraux est donc essentielle dans le but de restaurer cette immunité. Nous pouvons alors suggérer que, dans le cas où l'autophagie n'est pas bloquée par les virus, celle-ci doit être extrêmement sélective de l'infection.

## **V. Autophagie sélective au cours des infections virales**

Nous avons vu que les virus sont en mesure de contrer les effets antiviraux de l'autophagie en agissant à plusieurs étapes de ce processus. Dans ce chapitre, nous allons plus particulièrement nous focaliser sur les relations entre l'autophagie sélective et les infections virales. Même si cet aspect est encore très peu étudié, il joue un rôle fondamental dans la lutte contre les virus.

### **Virophagie**

Le premier cas de dégradation sélective d'une protéine virale par autophagie a été rapporté par le groupe de Beth Levine et concerne l'infection par le virus Sindbis (SINV) (famille des *Togaviridae*, genre alphavirus) [52]. Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'infection

par ce virus à tropisme neuronal induit l'autophagie dans les neurones de souris infectée. La caractérisation du rôle de l'autophagie au cours de cette infection a permis de montrer que le récepteur autophagique p62/SQSTM1 conduit sélectivement la protéine de capsid du SINV à la dégradation par autophagie. De façon intéressante, cette dégradation n'a pas d'effet sur la réplication virale mais a un rôle dans la survie des cellules infectées, constituant un avantage pour le virus. Les auteurs suggèrent que la dégradation sélective par autophagie de la capsid virale permettrait de limiter son expression et d'empêcher son agrégation, constituant un signal de mort cellulaire. Il est à noter que le domaine UBA de p62/SQSTM1, impliqué dans la liaison de ce récepteur à l'ubiquitine, n'est pas requis pour son interaction avec la capsid du SINV, suggérant une dégradation indépendante de cette étiquette [52].

Le récepteur p62/SQSTM1 a également été montré comme interagissant avec la capsid du CHIKV, un arbovirus du genre alphavirus. Cette interaction, contrairement à celle observée avec la capsid du SINV, est dépendante de l'ubiquitination de la cible virale. De ce fait, le domaine UBA de p62/SQSTM1 est requis pour conduire la capsid de ce virus à la dégradation par autophagie. De la même façon que pour le SINV, cette dégradation participe à la survie des cellules infectées mais, dans ce cas, n'est pas favorable à la réplication virale. Il est à noter qu'un autre récepteur autophagique a été impliqué au cours de cette infection. En effet, NDP52 est capable d'interagir avec la protéine non structurale du CHIKV nsP2. Cette interaction, qui ne conduit pas à la dégradation de la protéine virale, permet une meilleure réplication du virus. De plus, les auteurs montrent que NDP52 et p62/SQSTM1 co-localisent avec la capsid du virus mais dans des groupes d'autophagosomes différents [53]. p62/SQSTM1 pourrait conduire la capsid virale à la dégradation autophagique, alors que NDP52, localisé sur d'autres groupes d'autophagosome, pourrait bloquer le flux autophagique, permettant l'apport de membranes nécessaires aux complexes de réplication viraux, et ainsi favoriserait la réplication virale.

Contrairement aux deux cas précédents, la dégradation de protéines virales par autophagie sélective n'est pas toujours avantageuse pour le virus. En effet, dans le cas du VIH-1, le transactivateur viral Tat est sélectivement conduit à la dégradation par le récepteur p62/SQSTM1. Ce processus fait de l'autophagie un puissant mécanisme anti-VIH. De ce fait, ce virus a mis en place des stratégies afin de bloquer cette dégradation pour assurer sa réplication. Une fois encore, il semble que l'interaction entre les protéines p62/SQSTM1 et Tat ne soit pas dépendante de la modification de cette dernière par l'ubiquitine : la délétion du

domaine UBA de p62/SQSTM1 n'empêche pas son interaction avec Tat et des mutations ponctuelles de Tat au niveau de lysines connues pour être ubiquitinées n'empêchent pas sa dégradation par autophagie. Le rôle de la dégradation de Tat sur la survie de la cellule infectée n'a pas été étudié [54, 55]. Il est intéressant de noter que le transactivateur viral Tax du virus T-lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1 pour *Human T cell Leukemia Virus*) semble également être une cible de dégradation par autophagie. En effet, le blocage de l'autophagie permet d'augmenter l'expression de cette protéine dans des cellules HeLa. Cependant, les auteurs n'ont pas étudié le rôle potentiel de l'autophagie sélective dans ce contexte [56]. Une autre protéine du VIH-1 semble être la cible d'une dégradation autophagique. La protéine de capsid de ce virus est dégradée sélectivement par autophagie grâce à son interaction avec le facteur de restriction TRIM5. Dans ces travaux, TRIM5 se comporte comme un récepteur autophagique puisqu'il permet la dégradation de la capsid via son interaction avec la protéine autophagique LC3. Cette dégradation sélective aurait un rôle dans la restriction de l'infection par le VIH-1 [28]. Cependant ces travaux sont controversés. En effet, une autre étude montre que, bien que l'expression de TRIM5 soit régulée par autophagie et que TRIM5 soit associé à plusieurs facteurs de la machinerie autophagique, la restriction de l'infection induite par cette protéine n'est pas associée à son rôle dans l'autophagie [57]. Enfin, des travaux récents sur l'infection de neurones par le HSV-1 montrent un regroupement inhabituel d'autophagosomes dans les neurones ne présentant pas d'antigènes viraux mais positifs pour le génome viral. La présence de p62/SQSTM1 au niveau de ces regroupements d'autophagosomes et leur absence en réponse à une carence nutritionnelle sont des éléments étayant un mécanisme d'autophagie sélective [58].

### **Inhibition de l'autophagie sélective par les virus**

L'autophagie sélective de protéines virales est un moyen pour la cellule hôte de lutter contre l'infection même si, dans certains cas, ce processus peut également être bénéfique au virus en permettant la survie cellulaire. Afin de s'affranchir des effets antiviraux de l'autophagie sélective, certains virus sont en mesure de cibler directement l'action des récepteurs autophagiques. C'est le cas du virus coxsackie de type B3 (CVB3, Picornaviridae, genre Enterovirus) dont les protéases 2Apro et 3Cpro sont capables de cliver des récepteurs autophagiques [59]. Plus précisément, p62/SQSTM1 est clivée au niveau de sa glycine 241 par la protéase 2Apro virale. Ce clivage fournit deux fragments de p62/SQSTM1 incapables

d'exercer une fonction dans l'autophagie sélective. Cette même protéase peut également cliver NBR1, un autre récepteur autophagique similaire à p62/SQSTM1. Ce dernier est également la cible de l'activité de la protéase 3Cpro virale. De façon intéressante, les auteurs montrent que les fragments C-terminaux résultant du clivage de ces deux récepteurs autophagiques conservent un potentiel dominant négatif sur la fonction des récepteurs natifs, grâce à la conservation de leur capacité à interagir avec LC3 [59]. Les auteurs ne mentionnent pas quelles pourraient être les cibles virales ou cellulaires dont la dégradation serait inhibée par ces clivages protéolytiques.

La protéine p62/SQSTM1 est également prise pour cible au cours de l'infection par le virus de la dengue. En effet, au cours de cette infection, l'autophagie serait induite dans un premier temps puis inhibée et p62/SQSTM1 serait dégradée progressivement par le protéasome. Dans ce cas, p62/SQSTM1 se comporterait comme un facteur de restriction virale, les auteurs montrant que la restauration d'une expression stable de cette protéine inhibe la réplication virale. Le virus de la dengue est donc en mesure d'inhiber l'autophagie sélective en dégradant le récepteur p62/SQSTM1 [60].

## **VI. Conclusion et Perspectives**

Le rôle de l'autophagie sélective au cours des infections virales, contrairement aux infections bactériennes, reste encore très peu étudié. Actuellement, les études se focalisent essentiellement sur le récepteur autophagique p62/SQSTM1. Cependant, la diversité des récepteurs autophagiques laisse penser qu'il existe une multiplicité de mécanismes en fonction des virus et des contextes d'infection. Les travaux futurs devraient permettre d'acquérir de nouvelles connaissances et de mieux comprendre les effets de l'autophagie en tant que mécanisme d'immunité innée. Ce domaine devrait notamment avoir un fort impact en termes de thérapeutique puisque l'identification des cibles spécifiques de l'autophagie sélective au cours des infections virales pourrait permettre le développement de stratégies thérapeutiques ciblées.

## **VII. Références**

1. Mizushima N. Physiological functions of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009;335:71-84.

2. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW *et al.* Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*2010 Oct;90(4):1383-435.
3. Shibutani ST, Saitoh T, Nowag H, Munz C, Yoshimori T. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. *Nat Immunol*2015 Oct;16(10):1014-24.
4. Bento CF, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M *et al.* Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu Rev Biochem*2016 Feb 8.
5. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*2011;27:107-32.
6. Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol*2012 Jan;13(1):7-12.
7. Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*2011 Jul;7(7):673-82.
8. Cuervo AM, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res*2014 Jan;24(1):92-104.
9. Ktistakis NT, Tooze SA. Digesting the Expanding Mechanisms of Autophagy. *Trends in cell biology*2016 Apr 2.
10. Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W *et al.* Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*2011 Jan 28;331(6016):456-61.
11. Gallagher LE, Chan EY. Early signalling events of autophagy. *Essays Biochem*2013;55:1-15.
12. Lin MG, Hurley JH. Structure and function of the ULK1 complex in autophagy. *Curr Opin Cell Biol*2016 Feb 24;39:61-68.
13. Geng J, Klionsky DJ. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep*2008 Sep;9(9):859-64.
14. Ganley IG. Autophagosome maturation and lysosomal fusion. *Essays Biochem*2013;55:65-78.
15. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*2011 Mar;7(3):279-96.
16. Gomes LC, Dikic I. Autophagy in antimicrobial immunity. *Mol Cell*2014 Apr 24;54(2):224-33.
17. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*2005 Nov 21;171(4):603-14.
18. Birgisdottir AB, Lamark T, Johansen T. The LIR motif - crucial for selective autophagy. *J Cell Sci*2013 Aug 1;126(Pt 15):3237-47.
19. Kalvari I, Tsompanis S, Mulakkal NC, Osgood R, Johansen T, Nezis IP *et al.* iLIR: A web resource for prediction of Atg8-family interacting proteins. *Autophagy*2014 May;10(5):913-25.
20. Boyle KB, Randow F. The role of 'eat-me' signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. *Curr Opin Microbiol*2013 Jun;16(3):339-48.
21. Li S, Wandel MP, Li F, Liu Z, He C, Wu J *et al.* Sterical hindrance promotes selectivity of the autophagy cargo receptor NDP52 for the danger receptor galectin-8 in antibacterial autophagy. *Sci Signal*2013 Feb 5;6(261):ra9.
22. von Muhlinen N, Akutsu M, Ravenhill BJ, Foeglein A, Bloor S, Rutherford TJ *et al.* LC3C, bound selectively by a noncanonical LIR motif in NDP52, is required for antibacterial autophagy. *Mol Cell*2012 Nov 9;48(3):329-42.
23. Otsu K, Murakawa T, Yamaguchi O. BCL2L13 is a mammalian homolog of the yeast mitophagy receptor Atg32. *Autophagy*2015 Oct 3;11(10):1932-3.
24. Wei H, Liu L, Chen Q. Selective removal of mitochondria via mitophagy: distinct pathways for different mitochondrial stresses. *Biochimica et biophysica acta*2015 Oct;1853(10 Pt B):2784-90.
25. Jiang S, Wells CD, Roach PJ. Starch-binding domain-containing protein 1 (Stbd1) and glycogen metabolism: Identification of the Atg8 family interacting motif (AIM) in Stbd1 required for interaction with GABARAPL1. *Biochem Biophys Res Commun*2011 Sep 30;413(3):420-5.

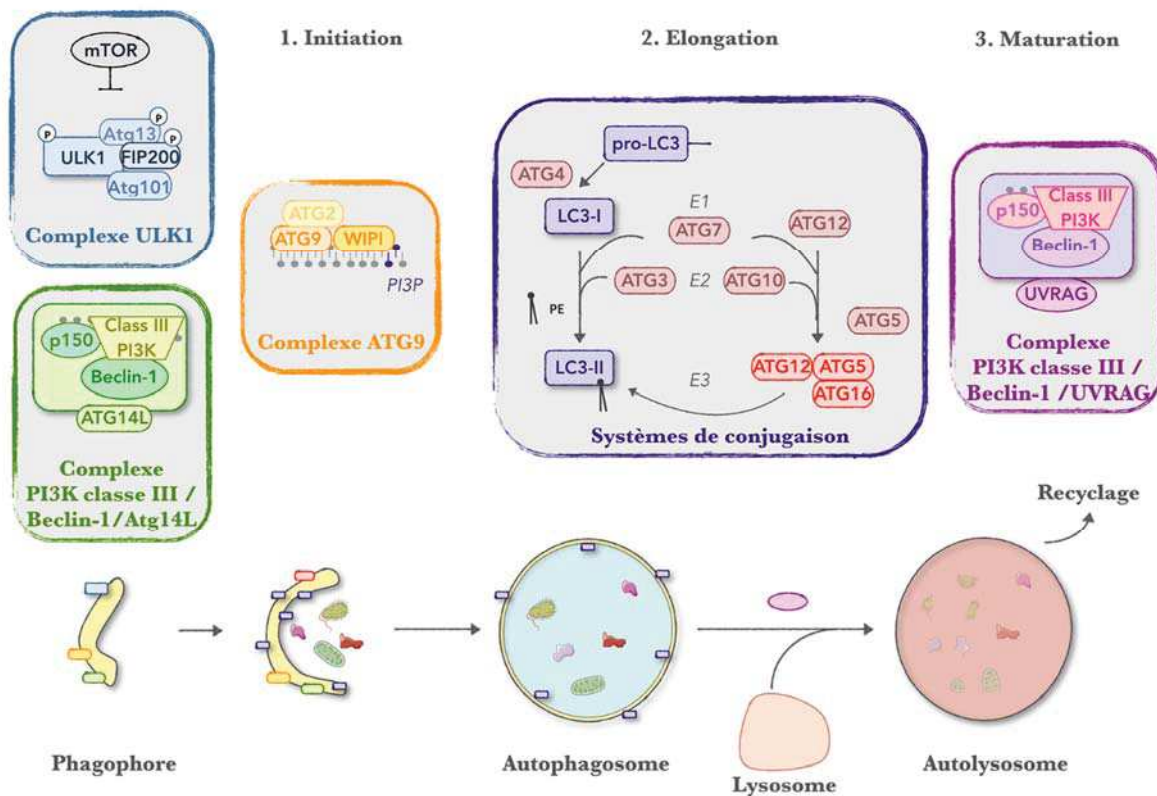


26. Kim BW, Kwon do H, Song HK. Structure biology of selective autophagy receptors. *BMB Rep*2016 Feb;49(2):73-80.
27. Kimura T, Mandell M, Deretic V. Precision autophagy directed by receptor regulators - emerging examples within the TRIM family. *J Cell Sci*2016 Mar 1;129(5):881-91.
28. Mandell MA, Kimura T, Jain A, Johansen T, Deretic V. TRIM proteins regulate autophagy: TRIM5 is a selective autophagy receptor mediating HIV-1 restriction. *Autophagy*2014;10(12):2387-8.
29. O'Connor C, Pertel T, Gray S, Robia SL, Bakowska JC, Luban J *et al.* p62/sequestosome-1 associates with and sustains the expression of retroviral restriction factor TRIM5alpha. *Journal of virology*2010 Jun;84(12):5997-6006.
30. Verlhac P, Gregoire IP, Azocar O, Petkova DS, Baguet J, Viret C *et al.* Autophagy receptor NDP52 regulates pathogen-containing autophagosome maturation. *Cell host & microbe*2015 Apr 8;17(4):515-25.
31. Verlhac P, Viret C, Faure M. Dual function of CALCOCO2/NDP52 during xenophagy. *Autophagy*2015;11(6):965-6.
32. Deretic V. Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors. *Curr Opin Immunol*2012 Feb;24(1):21-31.
33. Amano A, Nakagawa I, Yoshimori T. Autophagy in innate immunity against intracellular bacteria. *J Biochem*2006 Aug;140(2):161-6.
34. Deretic V, Singh S, Master S, Harris J, Roberts E, Kyei G *et al.* Mycobacterium tuberculosis inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cell Microbiol*2006 May;8(5):719-27.
35. Lennemann NJ, Coyne CB. Catch me if you can: the link between autophagy and viruses. *PLoS pathogens*2015 Mar;11(3):e1004685.
36. Randow F, Munz C. Autophagy in the regulation of pathogen replication and adaptive immunity. *Trends Immunol*2012 Oct;33(10):475-87.
37. Kuballa P, Nolte WM, Castoreno AB, Xavier RJ. Autophagy and the immune system. *Annu Rev Immunol*2012;30:611-46.
38. Cavnac Y, Esclatine A. Herpesviruses and autophagy: catch me if you can! *Viruses*2010 Jan;2(1):314-33.
39. Orvedahl A, Alexander D, Talloczy Z, Sun Q, Wei Y, Zhang W *et al.* HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell host & microbe*2007 Mar 15;1(1):23-35.
40. Lussignol M, Queval C, Bernet-Camard MF, Cotte-Laffitte J, Beau I, Codogno P *et al.* The herpes simplex virus 1 Us11 protein inhibits autophagy through its interaction with the protein kinase PKR. *Journal of virology*2013 Jan;87(2):859-71.
41. Wang L, Tian Y, Ou JH. HCV induces the expression of Rubicon and UVRAG to temporally regulate the maturation of autophagosomes and viral replication. *PLoS pathogens*2015 Mar;11(3):e1004764.
42. Gannage M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, Ramer PC *et al.* Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell host & microbe*2009 Oct 22;6(4):367-80.
43. Borel S, Robert-Hebmann V, Alfaisal J, Jain A, Faure M, Espert L *et al.* HIV-1 viral infectivity factor interacts with microtubule-associated protein light chain 3 and inhibits autophagy. *AIDS*2015 Jan 28;29(3):275-86.
44. Espert L, Varbanov M, Robert-Hebmann V, Sagnier S, Robbins I, Sanchez F *et al.* Differential role of autophagy in CD4 T cells and macrophages during X4 and R5 HIV-1 infection. *PLoS One*2009;4(6):e5787.
45. Kyei GB, Dinkins C, Davis AS, Roberts E, Singh SB, Dong C *et al.* Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J Cell Biol*2009 Jul 27;186(2):255-68.
46. Blanchet FP, Moris A, Nikolic DS, Lehmann M, Cardinaud S, Stalder R *et al.* Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunoamphisomes in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses. *Immunity*2010 May 28;32(5):654-69.

47. Espert L, Denizot M, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, Gay B, Varbanov M *et al.* Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J Clin Invest* 2006 Aug;116(8):2161-72.
48. Jackson WT. Viruses and the autophagy pathway. *Virology* 2015 May;479-480:450-6.
49. Kirkegaard K. Subversion of the cellular autophagy pathway by viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009;335:323-33.
50. Richetta C, Gregoire IP, Verlhac P, Azocar O, Baguet J, Flacher M *et al.* Sustained autophagy contributes to measles virus infectivity. *PLoS pathogens* 2013;9(9):e1003599.
51. Buckingham EM, Carpenter JE, Jackson W, Grose C. Autophagy and the effects of its inhibition on varicella-zoster virus glycoprotein biosynthesis and infectivity. *Journal of virology* 2014 Jan;88(2):890-902.
52. Orvedahl A, MacPherson S, Sumpter R, Jr., Talloczy Z, Zou Z, Levine B. Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell host & microbe* 2010 Feb 18;7(2):115-27.
53. Judith D, Mostowy S, Bourai M, Gangneux N, Lelek M, Lucas-Hourani M *et al.* Species-specific impact of the autophagy machinery on Chikungunya virus infection. *EMBO Rep* 2013 Jun;14(6):534-44.
54. Daussy CF, Beaumelle B, Espert L. Autophagy restricts HIV-1 infection. *Oncotarget* 2015 Aug 28;6(25):20752-3.
55. Sagnier S, Daussy CF, Borel S, Robert-Hebmann V, Faure M, Blanchet FP *et al.* Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4+ T lymphocytes. *Journal of virology* 2015 Jan;89(1):615-25.
56. Tang SW, Chen CY, Klase Z, Zane L, Jeang KT. The cellular autophagy pathway modulates human T-cell leukemia virus type 1 replication. *Journal of virology* 2013 Feb;87(3):1699-707.
57. Imam S, Talley S, Nelson RS, Dharan A, O'Connor C, Hope TJ *et al.* TRIM5alpha degradation via autophagy is not required for retroviral restriction. *Journal of virology* 2016 Jan 13.
58. Katzenell S, Leib DA. Herpes simplex virus and interferon signaling induce novel autophagic clusters in sensory neurons. *Journal of virology* 2016 Feb 24.
59. Shi J, Fung G, Piesik P, Zhang J, Luo H. Dominant-negative function of the C-terminal fragments of NBR1 and SQSTM1 generated during enteroviral infection. *Cell Death Differ* 2014 Sep;21(9):1432-41.
60. Metz P, Chiramel A, Chatel-Chaix L, Alvisi G, Bankhead P, Mora-Rodriguez R *et al.* Dengue Virus Inhibition of Autophagic Flux and Dependency of Viral Replication on Proteasomal Degradation of the Autophagy Receptor p62. *Journal of virology* 2015 Aug;89(15):8026-41.

## Remerciements

Les études réalisées par notre laboratoire sont financées par le CNRS, Sidaction et l'ANRS. Les auteurs remercient Martine Biard-Piechaczyk pour la relecture du manuscrit.

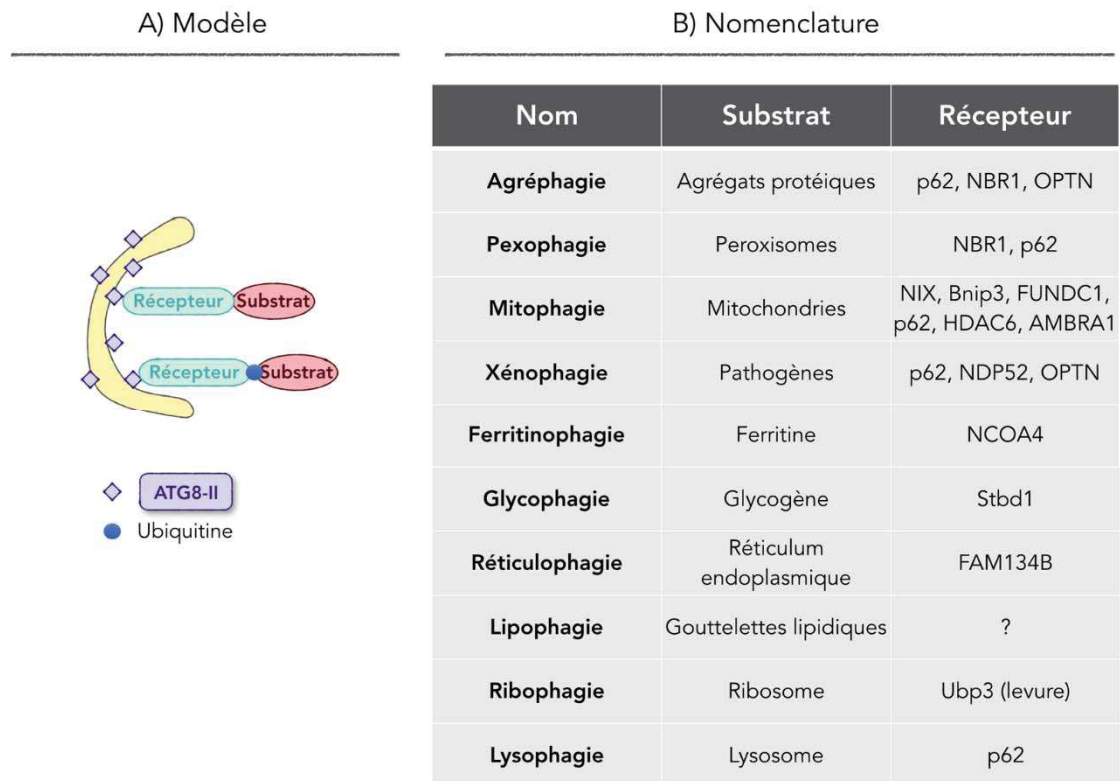


**Figure 1 : Le mécanisme d'autophagie**

L'autophagie est un processus qui se décline en plusieurs étapes :

- L'initiation, qui implique les complexes de signalisation ULK1, Beclin-1/PI3K/ATG14L et ATG9, conduisant à la formation du phagophore.
- L'élongation de la membrane du phagophore met en jeu deux systèmes de conjugaison « Ubiquitine-like », ATG12-ATG5/ATG16L1 et LC3-PE, et aboutit à la formation de l'autophagosome.
- La maturation et le recyclage, au cours desquels les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes, sont dépendants du complexe de signalisation Beclin-1/PI3K/UVRAG.

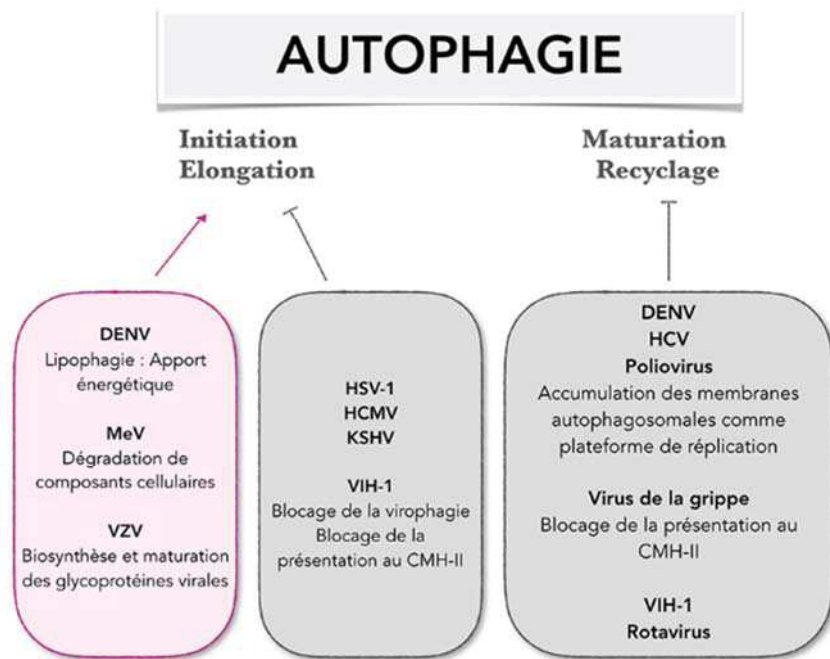
*Cette figure a été en partie réalisée à l'aide de Servier medical art <http://smart.servier.fr>*



**Figure 2 : L'autophagie sélective**

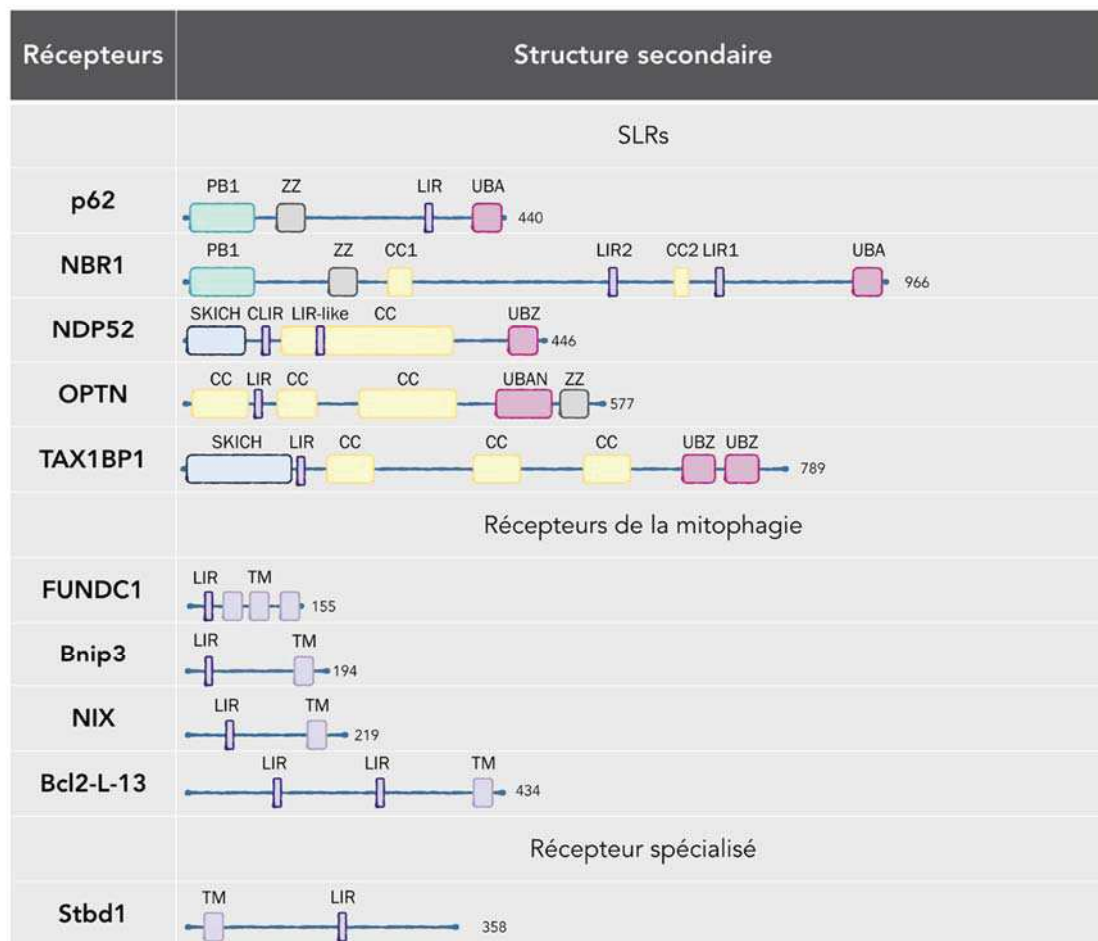
A) Modèle de l'autophagie sélective : Les récepteurs autophagiques ont la propriété d'interagir d'une part avec les protéines de la famille « *ATG8-like* » et d'autre part avec un substrat spécifique qu'ils conduisent à la dégradation autophagique.

B) Différents types de l'autophagie sélective en fonction du substrat dégradé et récepteur(s) associé(s).



**Figure 3 :** Modulation de l'autophagie par les virus

Les virus peuvent soit induire l'autophagie (exemples en rose sur le schéma), soit l'inhiber (exemples en gris sur le schéma) afin de se répliquer efficacement. Certaines des conséquences potentielles de ces modulations sont précisées dans les encadrés.



**Tableau I : Les récepteurs de l'autophagie sélective**

Représentation schématique des différents domaines des principaux récepteurs de l'autophagie sélective.

PB1 : Phox and BEM1 domain; ZZ : domaine en doigt de zinc de type ZZ ; CC : domaine coiled-coil ; LIR : domaine de liaison à LC3 (LC3-interacting region) ; CLIR : LC3C interacting region ; UBA, UBAN, UBZ : domaines de liaison à l'ubiquitine (Ubiquitin-associated domain, ubiquitin binding in ABIN and NEMO domain, Ubiquitin-binding zinc finger) ; SKICH : SKIP carboxyl homologie domain, TM : domaine transmembranaire. Les nombres inscrits sur la figure correspondent à la longueur de la séquence protéique.

#### A. Virophagie

Virus	Cible	Récepteur
SINV	Capside	p62
CHIKV	Capside ubiquitinée	p62
VIH-1	Tat	p62
VIH-1	Capside	TRIM5
HTLV-1	Tax	?

#### B. Récepteurs autophagiques ciblés par les virus

Virus	Mécanisme d'action	Récepteurs ciblés
CVB3	Protases virales 2Apro et 3Cpro	p62, NBR1
DENV	Dégradation par le protéasome	p62

**Tableau II : L'autophagie sélective et les infections virales**

A) Protéines virales ciblées par autophagie sélective et récepteur impliqué

B) Récepteurs autophagiques ciblés par les virus.