



**HAL**  
open science

# Rôle de la rupture membranaire dans l'activation de la réponse antivirale lors d'infection par l'Adénovirus

Noémie Pied

► **To cite this version:**

Noémie Pied. Rôle de la rupture membranaire dans l'activation de la réponse antivirale lors d'infection par l'Adénovirus. Immunologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0314 . tel-03053328

**HAL Id: tel-03053328**

**<https://theses.hal.science/tel-03053328>**

Submitted on 11 Dec 2020

**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 PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE**

**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE : Sciences de la Vie et de la Santé  
SPÉCIALITÉ : Microbiologie et Immunologie

Par Noémie PIED

**Rôle de la rupture membranaire dans l'activation de la réponse  
antivirale lors d'infection par l'Adénovirus**

Sous la direction du Dr Fabienne RAYNE

Soutenue le 10 Décembre 2018

Membres du jury :

Pr. Thierry NOEL	Université de Bordeaux	Président
Dr. Lucile ESPERT	Université de Montpellier	Rapporteur
Dr. Raul DURAN	CABIMER, Séville	Rapporteur
Dr. Julie DECHANET-MERVILLE	Université de Bordeaux	Examineur
Dr. Fabienne RAYNE	Université de Bordeaux	Directrice de thèse
Dr. Harald WODRICH	Université de Bordeaux	Invité



## Rôle de la rupture membranaire dans l'activation de la réponse antivirale lors d'infection par l'Adénovirus

L'Adénovirus (AdV) entre dans la cellule hôte par endocytose puis s'échappe de l'endosome en lysant la membrane de ces vésicules, empêchant ainsi sa dégradation *via* les lysosomes. Or, les membranes endommagées sont reconnues comme des signaux de danger par le système immunitaire et peuvent déclencher une réponse antivirale, telle que l'expression d'interféron (IFN). Dans nos conditions expérimentales, nous avons montré que l'infection par l'AdV n'induit pas l'expression d'IFN $\beta$  et qu'au contraire, le virus semble inhiber cette réponse. En revanche, l'entrée du virus active TBK1 (Tank Binding Kinase 1) qui est une kinase clef de la voie IFN mais qui est également impliquée dans la régulation de l'autophagie, une voie de dégradation cellulaire. Notre laboratoire a précédemment montré que l'autophagie est activée lors de l'entrée de l'AdV, par la rupture de la membrane endosomale. Nous avons donc étudié le mécanisme d'activation et le rôle de TBK1 lors de l'infection par l'AdV. Nos résultats montrent que la rupture de la membrane endosomale induite par le virus est nécessaire pour l'activation de TBK1 et que cette kinase est recrutée spécifiquement sur les sites de dommage membranaire. De plus, nous avons montré que TBK1 est impliqué dans l'activation de l'autophagie induite par l'AdV. Cependant, contrairement à ce qui est décrit pour l'autophagie dirigée contre les bactéries, cette activation de TBK1 est indépendante de NDP52 et d'autres adaptateurs conventionnels de l'autophagie. En résumé, nos travaux montrent que l'AdV est capable de contrôler la réponse IFN et que les ruptures de membrane induites par le virus activent TBK1 et l'autophagie par un nouveau mécanisme. Nos données suggèrent un rôle conservé de TBK1 dans l'activation de l'autophagie sélective contre les agents pathogènes.

**Mots clés :** Adénovirus, Autophagie, rupture de membrane, TBK1, interféron

---

## Involvement of membrane ruptures in antiviral response activation upon adenoviral infection

Adenoviruses enter host cells by endocytosis and then escape from the endosomal compartment by lysing the endosomal membrane, thereby preventing its degradation *via* lysosomes. However, damaged membranes are recognized as danger signals by the cell intrinsic immune system and trigger an antiviral response, such as expression of interferon (IFN). In our experimental conditions we have shown that adenovirus infection does not induce the expression of IFN $\beta$ . On the contrary, our data suggest that the virus appears to inhibit the IFN $\beta$  response. However, adenovirus entry activates TBK1 (Tank Binding Kinase 1), which is a key kinase of the IFN pathway but is also involved in the regulation of autophagy, a cellular degradation pathway. Our laboratory previously showed that autophagy is activated upon rupture of the endosomal membrane during adenovirus entry. We therefore studied the activation mechanism and the role of TBK1 during adenovirus infection. Our results show that virus-induced endosomal membrane rupture is required for activation of TBK1 and that this kinase is specifically recruited at membrane damage sites. In addition, we show that TBK1 is involved in the activation of autophagy induced by adenovirus. TBK1 activation is independent of NDP52 and other conventional autophagic adapters, which is in contrast to membrane damaging bacteria. Thus, autophagy targeting membrane penetrating adenoviruses differs from the one induced by bacteria. In summary our work shows that adenovirus is able to control the IFN response and that membrane rupture induced by adenoviruses activates TBK1 and autophagy by a novel mechanism. In contrast our data suggest a conserved role for TBK1 in driving selective autophagy against invading pathogens.

**Keys words:** Adenovirus, Autophagy, membrane rupture, TBK1, interferon

---

Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité (MFP),  
CNRS UMR 5234,  
146 rue Léo Saignat, Bâtiment 2B 1<sup>er</sup> étage,  
33076 Bordeaux Cedex



*« L'expérience est un professeur brutal, mais nous apprenons,  
Mon Dieu que nous apprenons ! »*

C.S Lewis



## Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer cette thèse. Merci Dr Lucile Espert et Dr Raul Duran pour votre présence en tant que rapporteurs. Merci Dr Julie Dechanet d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse, et pour les cellules HFF-CAR que vous nous avez fournies.

Je remercie également Pr Thierry Noël qui a accepté d'être président de ce jury, ce qui est désormais une tradition dans notre laboratoire. Merci également de m'avoir intégrée dans le master MiMu ce qui m'a permis de poursuivre mon aventure dans la microbiologie jusqu'à cette thèse.

Je souhaite adresser mes sincères remerciements au Dr Fabienne Rayne, ma directrice de thèse mais bien plus que ça ! Merci Fabienne de m'avoir formée depuis le master 2 et de m'avoir par la suite accompagnée pendant ces années de thèse. Merci de transmettre ta passion pour la virologie, des enseignements à la paillasse. Merci d'avoir toujours été disponible lorsque je venais à ton bureau et que j'avais des centaines de questions à te poser (souvent très naïves). Je te remercie pour ton écoute, ta patience et tes conseils. Et merci pour tes ☺ qui ont guidé avec bonne humeur la correction de ce manuscrit.

Je souhaite également remercier Dr Harald Wodrich de m'avoir intégrée dans son laboratoire où on se sent si bien ! Merci Harry pour l'attention que tu portes à tous tes étudiants, merci de m'avoir soutenue dans mon projet quand parfois ça devenait compliqué. Merci pour ton écoute et tes précieux conseils, merci de m'avoir aidée à prendre confiance en moi. Je te remercie également pour toutes les opportunités scientifiques que tu m'as données, d'assister à des congrès, et de me permettre de poursuivre ma « petite carrière » dans ton équipe.

Merci à tous les membres de l'équipe Adeno de m'avoir accueillie et soutenue pendant ces années passées avec vous. Merci pour les repas du midi animés ! Merci Muriel pour ton oreille attentive, surtout dans les dernières semaines de rédaction, et merci d'avoir toujours accepté d'apporter ton aide à mes manip (et les transferts de blot ☺). Merci Jessica pour ton aide, ta gentillesse et pour nos discussions en salle de culture qui faisaient paraître le temps moins long. Merci Benoît pour tes conseils et tes questions lors des lab-meetings qui m'ont permis de prendre du recul sur mes résultats. Merci Tetsuro pour la construction des lignées U2OS-STING et pour toutes tes connaissances que tu apportais au laboratoire.

Merci Marie-Edith pour ta gentillesse, je me souviens que lorsque je cherchais mon stage de master 2 c'est toi qui m'a conseillé de frapper à la porte de ce labo... alors merci. Merci Cathy pour ta bonne humeur et tes conseils mode.

Merci à tous les membres de l'UMR5234, merci à Paul et Christine pour l'organisation des « Sciences in English » et leur bienveillance.

Un énorme merci à celles avec qui j'ai partagé mon bureau quotidiennement pendant ces quelques années.

Merci Charlotte d'avoir ouvert la voie de l'autophagie dans le labo et répondu à toutes mes questions, mon canapé reste dispo pour tes venues à Bordeaux !

Merci Irene pour ta disponibilité et pour nos discussions qu'elles soient scientifiques ou non. Ta présence juste derrière mon bureau était rassurante car je savais qu'à la moindre question je pouvais me tourner vers toi.

Merci Lara, avec qui j'ai partagé l'intégralité de ces 3 années. Merci pour ton écoute, tes conseils et tes mots d'encouragements qui me vont droit au cœur. Merci d'avoir pris tant de ton temps pour me rassurer.

Merci Floriane, pour ta présence, tes conseils, nos séances de sport et nos bières partagées jusqu'à la fin de cette thèse ! Merci de m'avoir apporté toute ta bonne humeur et ton énergie dans les dernières semaines de rédaction.

Je suis si heureuse d'avoir pu partager cette thèse avec vous. Merci pour tout car avec vous « la réalité de notre métier » est au top !!

Je souhaite également remercier mes amis qui sont présents depuis longtemps. Merci Coralie et Laurie, les moments partagés ensemble sont toujours si précieux, même s'ils sont malheureusement trop rares. Merci à ceux présents à Bordeaux, merci Fabien de m'avoir invité à tes pauses notamment pendant la rédaction de cette thèse et merci Justine d'être toujours disponible pour un verre.

Je remercie sincèrement toute ma famille car même avec la distance, les samedis soirs sont précieux lorsque je suis avec vous. Merci également à ma belle-famille pour tous les moments partagés avec vous.

Merci à vous tous de m'avoir fait oublier ma thèse pendant ces moments.

Merci à mes parents qui m'ont soutenue depuis le début, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir permis de réaliser mes objectifs. Merci pour votre soutien et pour votre écoute, notamment sur mon chemin de retour du laboratoire toujours accrochée au téléphone.

Grâce à vous je savais toujours à qui me confier quand cette thèse devenait un peu compliquée.

Merci à mon frère Corentin, qui m'a offert les meilleurs fous rires et les plus dures séances de tennis pendant la rédaction de cette thèse. Merci de m'avoir fait penser à tellement autre chose quand le stress était un peu trop présent.

Et surtout merci Thomas. Merci de m'avoir suivie à Bordeaux et d'avoir été présent pour moi pendant ces 3 ans, et même bien avant.

Merci d'avoir accepté mon absence (et supporté mon stress) pendant la rédaction de cette thèse. Merci d'être toujours présent à mes côtés aujourd'hui et de m'avoir soutenue sans arrêt.

Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragée jusqu'aux derniers jours.

Merci pour tout ce que tu as fait pour moi et pour tout ce que nous allons faire ensemble.



# **Table des matières**

<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>17</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>20</b>
<b>ACTIVATION DE L'IMMUNITE INNEE : DEFENSE FACE AUX INFECTIONS</b>	<b>22</b>
<b>I- Détection du pathogène</b>	<b>22</b>
A) Récepteurs liés aux membranes	23
1- Signalisation dépendante de Myd88	25
2- Signalisation dépendante de TRIF	25
B) Récepteurs cytosoliques	28
C) Inflammasome	31
<b>II- Des facteurs de transcription à l'activation de la réponse antivirale</b>	<b>33</b>
A) Facteurs de transcription	33
B) Activation de la réponse IFN	34
C) Fonction antivirale des ISG	36
<b>III- Régulation de la réponse IFN</b>	<b>38</b>
A) Contrôle par la cellule	38
B) Contremesures virales	40
<b>L'AUTOPHAGIE : UNE VOIE DE DEGRADATION LIMITANT L'INFECTION</b>	<b>44</b>
<b>I- L'autophagie : un mécanisme de dégradation</b>	<b>44</b>
A) Généralités	44
B) Les différentes étapes de l'autophagie et facteurs impliqués	46
1- Activation	46
2- Initiation	48
3- Elongation	48
4- Fermeture	51
5- Fusion avec le lysosome	51
C) Activation de l'autophagie et fonctions cellulaires	51
1- Autophagie non sélective	52
2- Autophagie sélective	52
3- Autophagie de précision	52
4- Pathologies associées à l'autophagie	54
5- Rôle de l'autophagie dans l'infection	54
<b>II- Autophagie sélective : la xénophagie</b>	<b>55</b>
A) Signaux de reconnaissance et adaptateurs	55
1- Signaux « Eat-me »	55
2- Adaptateurs	56

B)	Mécanismes d'activation de l'autophagie	59
C)	Implication des TRIM dans l'autophagie sélective	60
D)	Fonctions de l'autophagie sélective contre les pathogènes	60
1-	L'autophagie sélective lors d'infections bactériennes	60
2-	L'autophagie sélective dans les infections virales	63
E)	Contrôle de l'autophagie par les pathogènes	65
1-	Contremesures limitant l'autophagie	65
2-	Détournement de l'autophagie	67
<b>REPONSE IMMUNITAIRE ET AUTOPHAGIE</b>		<b>68</b>
<b>I-</b>	<b>Interaction entre réponse immunitaire et autophagie</b>	<b>68</b>
A)	Modulation de l'activité des TLR par autophagie	69
1-	Activation	69
2-	Suppression	69
B)	Modulation de l'activité cGAS-STING par autophagie	71
1-	Activation	71
2-	Suppression	71
<b>II-</b>	<b>TBK1 une kinase multifonctionnelle</b>	<b>73</b>
A)	Généralités et mécanisme d'activation	73
B)	TBK1 : immunité et autophagie	76
1-	Rôle de TBK1 dans l'immunité innée	76
2-	Rôle de TBK1 dans l'autophagie	76
3-	Implication de TBK1 dans les interactions entre immunité innée et autophagie	78
<b>LES ADENOVIRUS</b>		<b>82</b>
<b>I-</b>	<b>Généralités</b>	<b>82</b>
A)	Histoire	82
B)	Classification	82
<b>II-</b>	<b>Structure</b>	<b>83</b>
A)	Protéines majeures	85
B)	Protéines mineures	87
C)	Protéines core	89
D)	Maturation de la capsid	89
E)	Structure du génome	90
<b>III-</b>	<b>Cycle viral</b>	<b>92</b>
A)	Interaction entre le virus et sa cellule hôte	92
B)	Endocytose du virus	94
C)	Rupture et échappement endosomal	95
D)	Transport du virus vers le noyau	95
E)	Import nucléaire et libération du génome viral	96
F)	Réplication et production de nouvelles particules virales	96
<b>IV-</b>	<b>Pathologies et traitement</b>	<b>97</b>
<b>V-</b>	<b>Utilisation thérapeutique</b>	<b>99</b>

<b>VI- Activation de l'immunité innée par l'AdV</b>	<b>100</b>
A) L'AdV induit l'activation d'IFN	100
B) Limites des modèles d'études et controverses	105
<b>VII- Autophagie ciblant l'AdV</b>	<b>106</b>
<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b>	<b>112</b>
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>114</b>
<b>I- Culture cellulaire</b>	<b>116</b>
A) Lignées cellulaires	116
B) Transfection de si ARN	117
C) Lignées stables exprimant des sh ARN	118
D) Traitements pharmacologiques	118
<b>II- Production de virus et infection</b>	<b>119</b>
A) Amplification du virus	119
B) Purification du virus	120
C) Marquage du virus	120
D) Quantification du virus	121
E) Infection synchronisée	121
<b>III- Quantification de l'expression d'ARNm par RT-qPCR</b>	<b>122</b>
A) Infection et extraction d'ARN totaux	122
B) Reverse Transcription (RT)	123
C) PCR quantitative (qPCR)	123
<b>IV- Analyse des protéines par western blot</b>	<b>125</b>
A) Infection et lyse	125
B) Electrophorèse en gel d'acrylamide dénaturant et réducteur (SDS-PAGE)	125
C) Transfert sur membrane de nitrocellulose	126
D) Western blot	126
E) Révélation et quantification	127
<b>V- Transduction et cytométrie en flux</b>	<b>128</b>
<b>VI- Immunofluorescence</b>	<b>129</b>
A) Infection et fixation	129
B) Immunofluorescence	129
C) Acquisition et analyse	130
<b>VII- Graphiques et Statistiques</b>	<b>132</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>134</b>
<b>ETUDE DE L'EXPRESSION D'INTERFERON B AU COURS DE L'INFECTION PAR L'ADENOVIRUS</b>	<b>136</b>
<b>I- Expression d'IFN<math>\beta</math> dans des cellules non immunitaires</b>	<b>136</b>

A) Etude dans la lignée cellulaire U2OS _____	136
B) Implication de l'autophagie _____	139
<b>II- Expression d'IFN<math>\beta</math> dans des cellules primaires immortalisées _____</b>	<b>139</b>
A) Validation du modèle expérimental _____	141
B) Etude de l'expression d'IFN $\beta$ dans les cellules HFF-CAR _____	141
<b>III- Effet de l'infection sur l'expression d'IFN<math>\beta</math> _____</b>	<b>144</b>
<b>IV- Conclusion générale du chapitre _____</b>	<b>147</b>
<b>ETUDE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION EN AMONT DE L'EXPRESSION D'INTERFERON B _____</b>	
<b>I- Etude de l'activation de NF-<math>\kappa</math>B _____</b>	<b>148</b>
<b>II- Etude de l'activation d'IRF3 _____</b>	<b>153</b>
<b>III- Conclusion générale du chapitre _____</b>	<b>155</b>
<b>ETUDE DE L'ACTIVATION DE TBK1 ET DE SON ROLE AU COURS DE L'INFECTION PAR L'ADENOVIRUS _____</b>	
<b>I- Etude de l'activation de TBK1 _____</b>	<b>156</b>
A) Activation de TBK1 au cours de l'infection _____	156
B) TBK1, dommages membranaires et autophagie induits par l'AdV _____	158
<b>II- Rôle des galectines dans l'activation de TBK1 _____</b>	<b>168</b>
A) Activation de TBK1 en absence des galectines _____	168
B) Rôle de la galectine 8 dans le recrutement de TBK1 _____	170
<b>III- Rôle des adaptateurs conventionnels de l'autophagie dans l'activation de TBK1 _____</b>	<b>175</b>
A) Activation de TBK1 en absence des adaptateurs _____	175
B) Rôle de l'autophagie dans la régulation de l'activation de TBK1 _____	182
<b>IV- Conclusion générale du chapitre _____</b>	<b>184</b>
<b>ETUDE DE L'IMPLICATION DE TBK1 DANS L'ACTIVATION DE L'AUTOPHAGIE _____</b>	
<b>I- Rôle de TBK1 dans l'infectiosité du mutant M1 _____</b>	<b>186</b>
A) Effet de la déplétion partielle de TBK1 _____	186
B) Effet des inhibiteurs Bx795 et MRT67307 _____	188
1- Vérification de l'inhibition fonctionnelle de TBK1 _____	188
2- Effet des inhibiteurs Bx795 et MRT67307 sur l'infectiosité du M1 _____	190
C) Combinaison de la déplétion partielle et de l'inhibition fonctionnelle de TBK1 _____	193
<b>II- Effet de TBK1 sur l'activation de l'autophagie _____</b>	<b>195</b>
<b>III- Conclusion générale du chapitre _____</b>	<b>197</b>

<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>198</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>200</b>
<b>L'ADENOVIRUS LIMITE L'EXPRESSION D'INTERFERON B</b>	<b>202</b>
<b>I- Conditions d'infection et impact sur la réponse IFN<math>\beta</math></b>	<b>202</b>
<b>II- Mécanisme d'inhibition de la réponse IFN<math>\beta</math></b>	<b>204</b>
<b>LES MECANISMES D'ACTIVATION DE TBK1 PAR L'ADENOVIRUS</b>	<b>206</b>
<b>I- Recrutement de TBK1</b>	<b>206</b>
<b>II- Phosphorylation de TBK1</b>	<b>212</b>
<b>III- Régulation de l'activation de TBK1 et rôle de l'autophagie</b>	<b>214</b>
<b>L'ACTIVATION DE TBK1 PAR L'ADENOVIRUS : ROLE PROVIRAL OU ANTIVIRAL ?</b>	<b>218</b>
<b>I- Rôle antiviral de TBK1</b>	<b>218</b>
A) Implication de la phosphorylation	218
B) Rôle des interactions avec des adaptateurs	220
<b>II- Rôle proviral de TBK1</b>	<b>221</b>
A) Implication de la phosphorylation	221
B) Fonction dans le transport du virus	221
C) Fonction dans l'inhibition d'IFN $\beta$	221
<b>MODELE D'ACTIVATION</b>	<b>224</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>226</b>
<b>ABBREVIATIONS</b>	<b>228</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>232</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1: Contrôle cellulaire de la réponse immunitaire innée _____	39
Tableau 2: Exemples de contremesures virales de la réponse immunitaire innée _____	41
Tableau 3 : Classification des AdV _____	83
Tableau 4: Conditions d'ensemencement _____	116
Tableau 5 : Liste et séquence des si ARN utilisés pour l'ARN interférence _____	117
Tableau 6: Conditions de transfection en fonction des plaques utilisées _____	118
Tableau 7: Mélange réactionnel pour la RT _____	123
Tableau 8 : Liste des amorces utilisées pour la qPCR _____	123
Tableau 9 : Mélange réactionnel pour la qPCR _____	124
Tableau 10: Anticorps utilisés pour les western blot _____	127
Tableau 11: Anticorps utilisés pour les immunofluorescences _____	130

## Liste des figures

Figure 1: Activation des TLR dépendante de Myd88 _____	24
Figure 2: Activation des TLR dépendante de TRIF _____	26
Figure 3: Détection de l'ARN cytosolique viral _____	27
Figure 4: Détection de l'ADN cytosolique viral _____	29
Figure 5: Activation de l'inflammasome _____	32
Figure 6 : Production d'IFN et expression des ISG _____	35
Figure 7: Etapes simplifiées de l'autophagie _____	45
Figure 8: Etapes d'initiation de la formation de l'autophagosome _____	47
Figure 9: Mécanisme de lipidation de LC3 _____	50
Figure 10: Les différents types d'autophagie et leur fonction _____	53
Figure 11: L'autophagie sélective _____	57
Figure 12: Les différents domaines des adaptateurs de l'autophagie sélective _____	57
Figure 13: L'autophagie sélective dirigée contre la Salmonelle _____	61
Figure 14: Signaux « eat-me » décrits pour l'autophagie antivirale _____	64
Figure 15: Beclin1, une cible de contremesure virale _____	66
Figure 16: L'autophagie et les TLR _____	70
Figure 17: La voie cGAS-STING et l'autophagie _____	72
Figure 18: Domaines et structure de TBK1 _____	74
Figure 19: Modèle d'activation de TBK1 par transautophosphorylation _____	75
Figure 20: Rôles de TBK1 _____	77
Figure 21: TBK1, une kinase clef connectant l'immunité innée et l'autophagie _____	79
Figure 22: Représentation schématique de l'AdV _____	84
Figure 23: Structure de l'AdV _____	86
Figure 24: Les différents domaines de la protéine VI de l'AdV _____	88
Figure 25: Schéma simplifié de l'organisation du génome de l'AdV _____	91
Figure 26: Cycle viral de l'AdV _____	93
Figure 27: Signaux potentiels détectés par la cellule au cours de l'entrée de l'AdV _____	102
Figure 28: Autophagie dirigée contre l'AdV _____	107
Figure 29: Infection synchronisée _____	122
Figure 30: Utilisation du logiciel Image J pour quantifier l'intensité des signaux de western blot _____	128

Figure 31 : Utilisation du logiciel Image J pour quantifier les colocalisations	131
Figure 32: Etude de l'expression d'IFN $\beta$ dans les lignées U2OS sauvages et modifiées	137
Figure 33: Etude de l'expression d'IFN $\beta$ dans les cellules HFF-CAR	140
Figure 34: Etude de l'impact de doses croissantes d'AdV sur l'expression d'IFN $\beta$	142
Figure 35: Etude de l'expression IFN $\beta$ au cours du temps	143
Figure 36: Etude de l'impact de l'infection sur l'expression d'IFN $\beta$ induite par le poly IC	145
Figure 37: Etude de la phosphorylation de NF- $\kappa$ B	149
Figure 38: Etude de la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B	151
Figure 39: Etude de l'effet de l'infection par l'AdV sur la phosphorylation de NF- $\kappa$ B	152
Figure 40: Etude de la translocation nucléaire d'IRF3	154
Figure 41: Etude de la phosphorylation de TBK1	157
Figure 42: Etude de la phosphorylation de TBK1 induite par l'AdV WT et par les mutants	159
Figure 43: Etude du recrutement de TBK1 aux sites de dommage membranaire	161
Figure 44: Etude du recrutement de TBK1 aux sites de dommage membranaire induit par l'AdV WT et les mutants	163
Figure 45: Etude du recrutement de TBK1 au site de dommage membranaire, au cours du temps	165
Figure 46: Quantification de la présence du virus aux sites de dommage membranaire	167
Figure 47: Etude de la phosphorylation de TBK1 en absence de galectines	169
Figure 48: Etude du recrutement de pTBK1 aux sites de dommage membranaire en absence de galectine 8	171
Figure 49: Quantification du recrutement de pTBK1 aux sites de dommage membranaire en absence de galectine 8	173
Figure 50: Etude de la phosphorylation de TBK1 en absence de NDP52	176
Figure 51: Etude de la phosphorylation de TBK1 en absence de NDP52 et de Tax1BP1	177
Figure 52: Etude de l'infectiosité du virus M1 en absence des adaptateurs NDP52 et Tax1BP1	179
Figure 53: Etude de la phosphorylation de TBK1 en absence des adaptateurs NDP52, Tax1BP1 et p62	181
Figure 54: Etude de la phosphorylation de TBK1 en absence d'ATG5	183
Figure 55: Etude de la déplétion de TBK1 sur l'infectiosité du mutant M1	187
Figure 56: Etude de l'effet des inhibiteurs de TBK1 sur sa phosphorylation	189
Figure 57: Etude de la translocation nucléaire d'IRF3 en présence d'inhibiteurs	191
Figure 58 : Etude de l'effet des inhibiteurs de TBK1 sur l'infectiosité du virus M1	192
Figure 59: Etude de l'effet de la combinaison de la déplétion de TBK1 et de son inhibition fonctionnelle	194
Figure 60: Etude de l'effet de la déplétion de TBK1 sur la lipitation de LC3	196
Figure 61: Rôle des ruptures membranaires dans l'activation de la réponse anti-adénovirale	199
Figure 62: Mécanisme d'inhibition de la réponse IFN $\beta$ par l'AdV	203
Figure 63: Activation de TBK1 par les dommages membranaires induits par l'AdV	207
Figure 64: Rôle des TRIM dans l'autophagie sélective et de précision	208
Figure 65: Etude de l'implication des TRIM dans l'autophagie dirigée contre l'AdV	210
Figure 66: Etude du recrutement de TRIM23 aux sites de dommage membranaire	211
Figure 67: Etude de l'effet de l'inhibition d'AMPK sur la phosphorylation de TBK1	213
Figure 68: Mécanisme d'inhibition de TBK1 par l'AdV	215
Figure 69: Fonctions antivirales et provirales de TBK1	219
Figure 70: Modèle d'activation	225



# **INTRODUCTION**

Les travaux de cette thèse traitent de la réponse cellulaire induite par l'entrée de l'Adénovirus dans la cellule hôte, avec un intérêt particulier pour la réponse IFN et l'autophagie. Dans cette introduction, les mécanismes d'activation de ces 2 voies seront présentés ainsi que leur rôle lors d'infections, notamment virales.

## CHAPITRE 1

### Activation de l'immunité innée : défense face aux infections

Face aux infections, la cellule hôte a développé un système de défense afin de limiter la propagation du pathogène. L'activation de l'immunité innée constitue une de ces premières barrières de défense de l'hôte. Elle s'appuie sur la reconnaissance, par la cellule, de motifs exposés par le pathogène. Ceci permet d'induire des cascades de signalisation menant à l'activation de facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B et IRF3. Ces facteurs de transcription sont transloqués dans le noyau pour activer la production de cytokines, dont les interférons (IFN). Ceux-ci activent une réponse cellulaire visant à limiter la multiplication et la dissémination du pathogène et à activer la réponse adaptative, plus spécifique.

Les pathogènes ont quant à eux développé des mécanismes de contournement de ces réponses afin d'assurer leur survie. Par conséquent, l'efficacité avec laquelle le pathogène se développe chez l'hôte dépend d'une balance entre réponse cellulaire et contremesures de l'agent infectieux.

#### I- Détection du pathogène

L'immunité innée est définie comme un mécanisme de défense qui n'est pas constitutivement actif mais qui peut être rapidement mobilisé en présence de pathogènes (Samuel, 2001). L'activation de l'immunité innée requiert donc que la cellule détecte spécifiquement sa présence. Lors de leur cycle d'infection dans la cellule hôte, les pathogènes exposent des motifs considérés comme étrangers par la cellule, ce sont des PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern). L'infection peut également perturber le métabolisme cellulaire (apoptose, rupture de membranes) et elle induit alors des signaux de danger nommés DAMP (Danger Associated Molecular Pattern). Ces signaux, induits ou exposés au cours de l'infection, sont reconnus par des récepteurs cellulaires spécifiques nommés PRR (Pattern Recognition Receptor) (Escamilla-Tilch et al., 2013). Ces récepteurs sont présents dans différents compartiments cellulaires, ce qui assure que, à n'importe quelle étape du cycle de multiplication, la cellule puisse détecter le pathogène afin de limiter l'infection. Certains de ces récepteurs sont présents au niveau des membranes cellulaires (endosome, membrane plasmique), d'autres dans le cytosol (Thompson et al., 2011). Dans la suite de ce manuscrit, l'activation de la réponse immunitaire et les facteurs impliqués seront détaillés dans le cas d'infections virales.

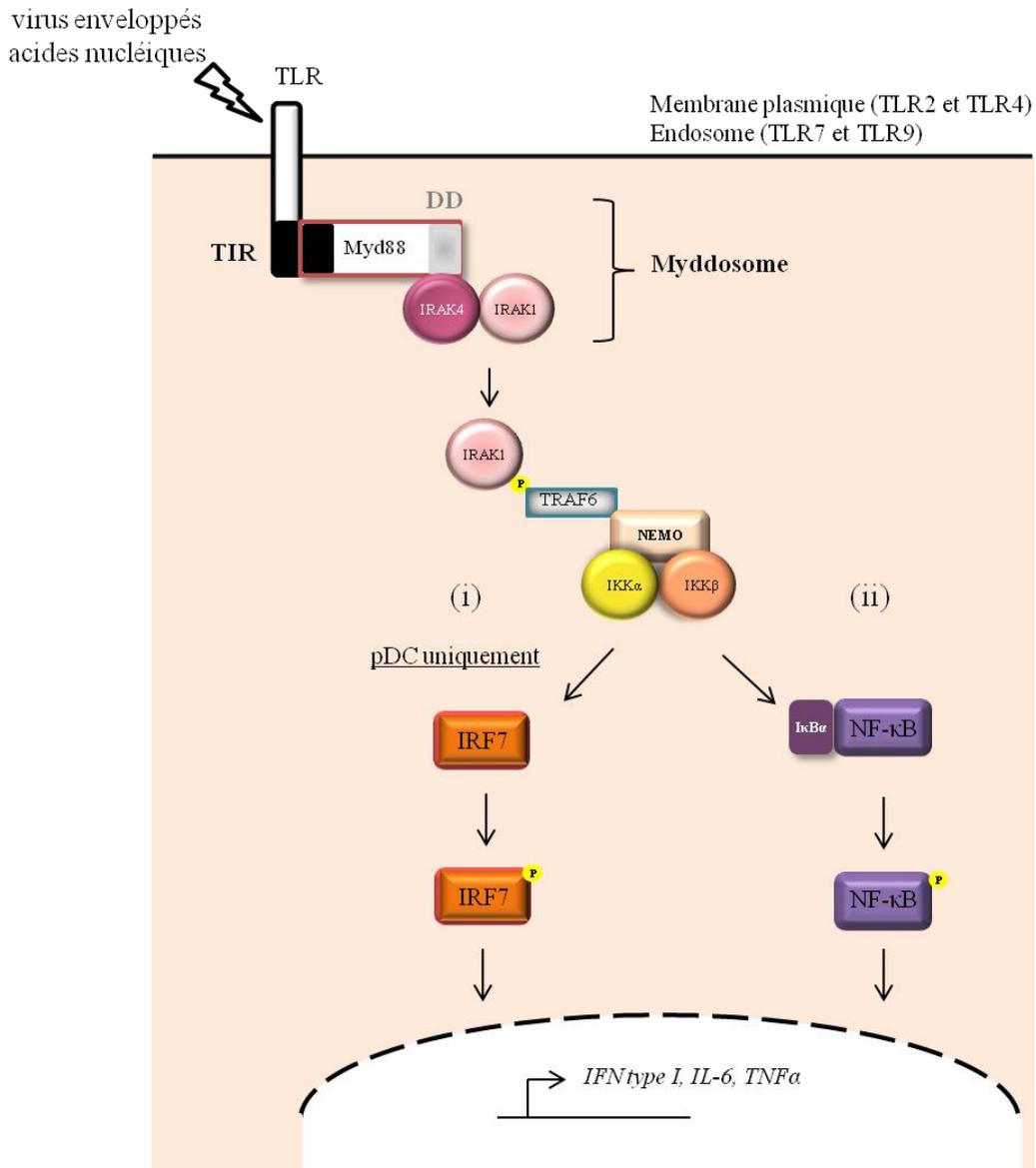
### A) Récepteurs liés aux membranes

Les TLR (Toll Like Receptor) constituent une famille de récepteurs membranaires regroupant 10 membres chez l'Homme dont l'expression varie en fonction du type cellulaire. Ils sont surtout exprimés par les cellules de l'immunité (cellules dendritiques [DC : Dendritic Cell], macrophages) mais également par les cellules épithéliales et les fibroblastes (Kawasaki and Kawai, 2014). Ils sont retrouvés soit dans la membrane plasmique (TLR2, TLR4), soit dans l'endosome (TLR3, TLR7, TLR9), leur localisation définissant les PAMP reconnus (O'Neill et al., 2013).

Les TLR2 et TLR4 localisés dans la membrane plasmique détectent des glycoprotéines. Ils sont activés lors d'infections bactériennes, notamment le TLR4 qui reconnaît le LPS (Lipopolysaccharide) bactérien (Lu et al., 2008). Ces TLR reconnaissent également les virus enveloppés tels que le virus de la rougeole (Bieback et al., 2002), l'herpès virus de type 1 (HSV-1) (Kurt-Jones et al., 2004), le virus de l'hépatite C (HCV) (Düesberg et al., 2002) ou encore le virus respiratoire syncytial (Kurt-Jones et al., 2000). La détection de ces virus par les TLR active une cascade de signalisation menant à la production de cytokines pro-inflammatoires, qui limitent ainsi l'infection (Vidya et al., 2018).

Les virus non enveloppés quant à eux ne présentent pas de glycoprotéines de surface, mais ils entrent le plus souvent dans la cellule par endocytose. Des TLR sont présents dans l'endosome et détectent les acides nucléiques viraux tels que l'ARN double brin (TLR3 [Alexopoulou et al., 2001]), l'ARN simple brin (TLR7 [Hornung et al., 2008]) ou encore l'ADN présentant des motifs CpG non méthylés (TLR9 [Hemmi et al., 2000]). Ces derniers sont le plus souvent spécifiques des pathogènes, mais c'est surtout leur localisation dans l'endosome qui induit un signal de danger, puisque les acides nucléiques cellulaires ne sont normalement pas retrouvés dans ces compartiments (Pichlmair and Reis e Sousa, 2007).

Les TLR sont composés de 3 domaines, un domaine riche en leucines (LRR : Leucine Rich Region) qui reconnaît le pathogène, un domaine transmembranaire et un domaine cytosolique exposant un motif TIR (Toll/IL-1 Receptor) impliqué dans l'interaction avec des adaptateurs. Après détection du PAMP, les TLR forment des dimères (homo- ou hétéro-dimères) induisant alors le recrutement des adaptateurs Myd88 ou TRIF. Ce sont ces adaptateurs qui définissent la cascade de signalisation en aval.



### Figure 1: Activation des TLR dépendante de Myd88

Le recrutement de Myd88 par son domaine TIR induit la formation d'un myddosome par le recrutement des kinases IRAK1 et IRAK4 via leur domaine DD (Death Domain). Au sein de ce complexe, IRAK1 est phosphorylé puis recrute l'ubiquitine ligase TRAF6. Cette dernière induit le recrutement du complexe NEMO, de façon dépendante de l'ubiquitine. Ce complexe est formé de NEMO et de 2 kinases IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ , induisant :

- (i) l'activation d'IRF7 dans les cellules pDC
- (ii) la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  pour libérer NF $\kappa$ B.

Les facteurs de transcription transloquent vers le noyau où ils activent l'expression des IFN de type I et des cytokines pro-inflammatoires.

### 1- Signalisation dépendante de Myd88

L'adaptateur Myd88 est recruté par tous les TLR à l'exception du TLR3 (Vidya et al., 2018) (**Figure 1**). Le domaine TIR de Myd88 interagit avec le domaine TIR du TLR sous sa forme dimérisée. Myd88 induit le recrutement, via son domaine DD (Death Domain), des kinases IRAK4 et IRAK1 formant ainsi le Myddosome (Lin et al., 2010). Au sein de ce complexe, IRAK1 est phosphorylé (Kollewe et al., 2004) et se libère du myddosome afin de recruter l'ubiquitine ligase TRAF6 (Jiang et al., 2002). Cette plateforme recrute, de façon dépendante de l'ubiquitine, le complexe modulateur de NF- $\kappa$ B nommé NEMO (NF- $\kappa$ B Essential MOdulator).

NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa B) est un facteur de transcription présent dans le cytoplasme sous une forme inactive, son NLS (Nuclear Localisation Signal) masqué par l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$ . Lors de l'activation, le complexe NEMO en interaction avec deux kinases, IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ , phosphoryle I $\kappa$ B $\alpha$  menant à sa dégradation. NF- $\kappa$ B est alors libéré et son NLS est exposé menant à sa translocation vers le noyau. NF- $\kappa$ B se lie alors aux différents promoteurs afin d'activer l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-6...) (Kawai and Akira, 2007).

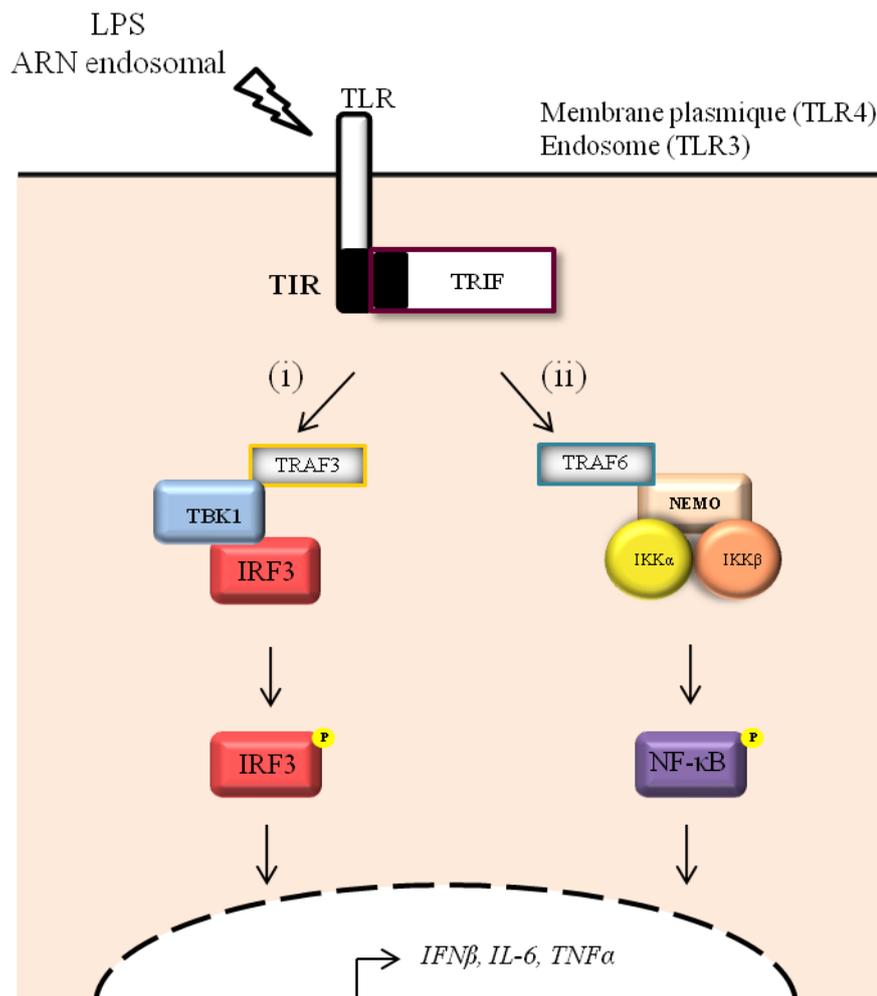
Cette voie de signalisation est particulière dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) quand les TLR7 et TLR9 sont activés. En effet, ce type cellulaire est le seul à exprimer le facteur de transcription IRF7 (Interferon Regulatory Factor) de façon constitutive (Izaguirre et al., 2003). Ainsi, l'activation de cette cascade de signalisation mène à la phosphorylation d'IRF7 par la kinase IKK $\alpha$ , et à la production d'IFN par les pDC (Hoshino et al., 2006). Cette expression étant très forte, les cellules pDC ont longtemps été considérées comme les cellules productrices d'IFN (Honda et al., 2005). Cependant, d'autres cellules immunitaires (cellules dendritiques myéloïdes [mDC], macrophages) ou non immunitaires (fibroblastes, cellules épithéliales) peuvent également activer la réponse IFN par d'autres voies de signalisation décrites dans la suite de ce chapitre (Diebold et al., 2003 ; Swiecki and Colonna, 2011).

### 2- Signalisation dépendante de TRIF

Les TLR3 et TLR4 interagissent via leur domaine TIR avec l'adaptateur TRIF (**Figure 2**). Cet adaptateur recrute par la suite les ubiquitine ligases TRAF3 et TRAF6 menant à l'activation de cascades de signalisation différentes. Dans le cas de TRAF6, la cascade activée est identique à celle dépendante de Myd88 et mène à la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B et à l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Le recrutement de TRAF3 va, quant à lui,

induire l'activation de TBK1 (Tank-Binding Kinase 1) qui est une kinase responsable de la phosphorylation d'IRF3. Ce facteur de transcription se dimérise et est transloqué dans le noyau pour activer l'expression d'IFN (Vidya et al., 2018).

Cependant, il a été mis en évidence, à l'aide de souris déplétées pour les adaptateurs Myd88 et TRIF, que les TLR n'étaient pas les seuls récepteurs responsables de l'activation de la réponse IFN et que d'autres PRR sont présents dans la cellule pour détecter la présence du pathogène (Thompson et al., 2011).

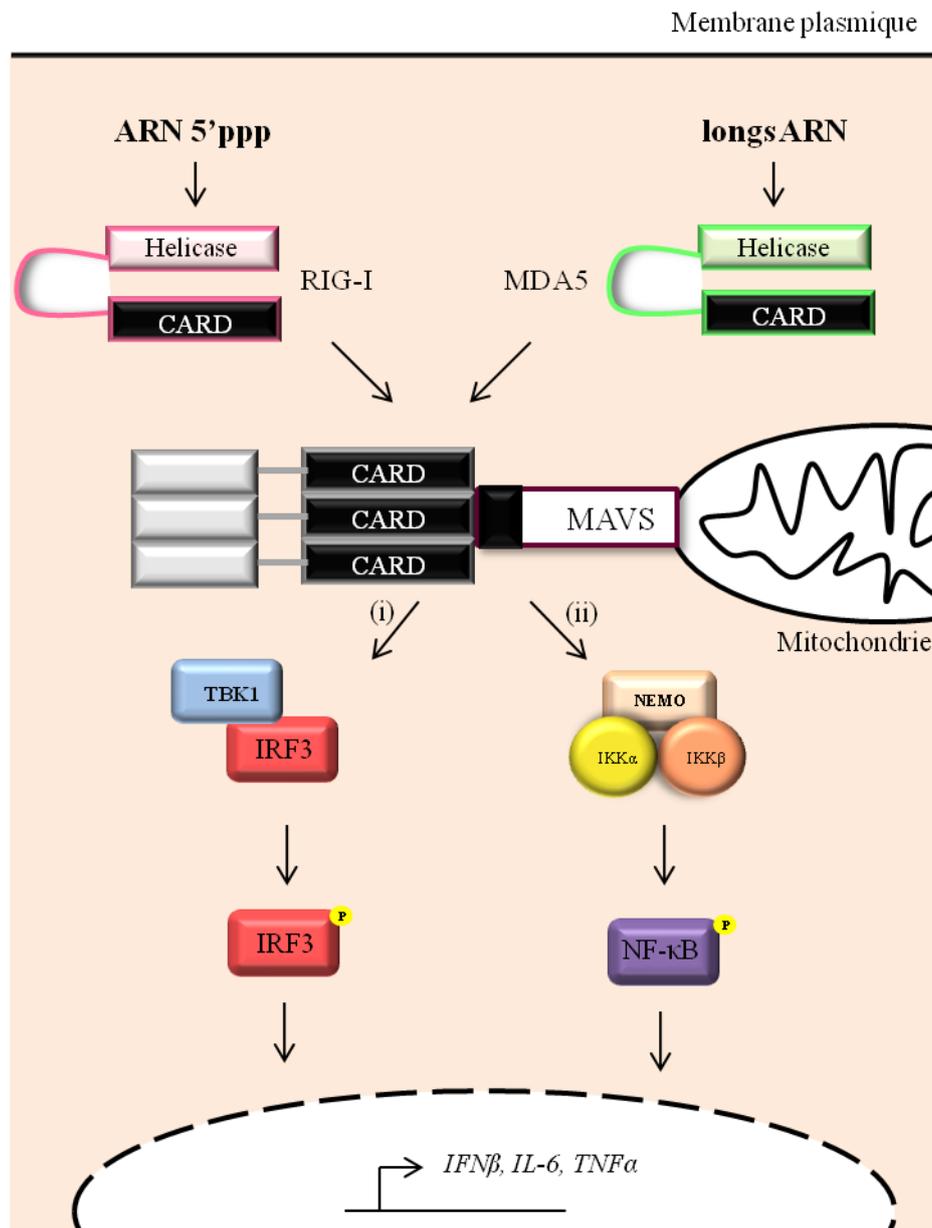


**Figure 2: Activation des TLR dépendante de TRIF**

Le recrutement de TRIF par son domaine TIR active deux voies de signalisation :

- (i) par le recrutement de l'ubiquitine ligase TRAF3 qui induit l'activation de la kinase TBK1. Cette kinase phosphoryle IRF3.
- (ii) par le recrutement de l'ubiquitine ligase TRAF6 qui interagit avec le complexe NEMO, dont les kinases IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  induisent l'activation de NF $\kappa$ B.

Les facteurs de transcription transloquent vers le noyau où ils activent l'expression des IFN de type I et des cytokines pro-inflammatoires.



### Figure 3: Détection de l'ARN cytosolique viral

RIG-1 et MDA5 sont présents dans le cytoplasme pour détecter respectivement les ARN avec une extrémité 5'ppp et les longs transcrits d'ARN. Ces senseurs présentent un domaine hélicase qui permet d'interagir avec l'ARN et un domaine CARD qui après activation se lie au domaine CARD de MAVS. Les senseurs s'oligomérisent au niveau de cette protéine localisée sur la membrane des mitochondries menant à l'activation de deux cascades d'activation :

- (i) par le recrutement de la kinase TBK1 qui phosphoryle IRF3.
- (ii) par le recrutement du complexe NEMO dont les kinases IKKα et IKKβ induisent l'activation de NFκB.

Les facteurs de transcription transloquent vers le noyau où ils activent l'expression des IFN de type I et des cytokines pro-inflammatoires.

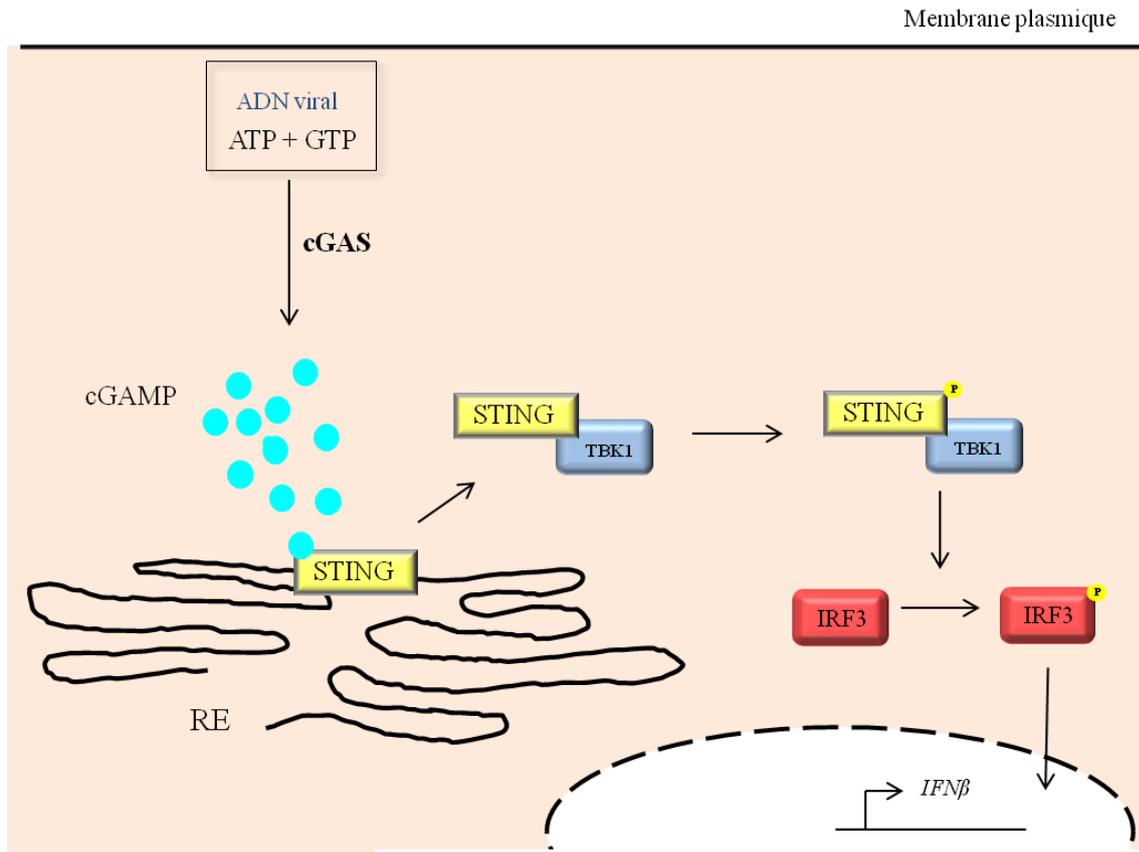
## B) Récepteurs cytosoliques

Les acides nucléiques exposés par le virus sont les motifs majoritaires détectés au cours de l'infection et sont reconnus dans différents compartiments cellulaires dont le cytosol. Les PRR impliqués dans cette détection sont exprimés dans la plupart des cellules qu'elles soient immunitaires ou non (Loo and Gale, 2011).

La capacité des cellules à répondre à l'ARN étranger a tout d'abord été montré par l'effet du poly IC (acide polyinosinique-polycytidylique) qui est un analogue de l'ARN double brin induisant une réponse IFN (Yoneyama et al., 2004). La présence d'ARN dans le cytoplasme peut donc induire une réponse immunitaire. Cependant, l'activation de ces voies nécessite un contrôle étroit car des ARN cellulaires sont également présents dans le cytoplasme. Des motifs spécifiques des pathogènes sont détectés par deux adaptateurs cytosoliques (**Figure 3**).

Il est généralement décrit dans la littérature que RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene I) détecte les ARN simple brin (Pichlmair et al., 2006) ou double brin (Takahasi et al., 2008) présentant une extrémité 5' triphosphate (5'-ppp), qui n'est généralement pas retrouvée sur les ARN cellulaires (Hornung et al., 2006). MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5) quant à lui reconnaît principalement les longs ARN, de taille supérieure à 1 000 pb (Kato et al., 2006), bien que d'autres signaux d'activation soient également décrits comme le défaut de méthylation de la coiffe des ARNm viraux (Züst et al., 2011). Chacun de ces adaptateurs a été impliqué dans la reconnaissance de différents virus, ainsi RIG-I détecte l'ARN 5'-ppp des virus dont le virus Influenza ou encore le HCV. MDA5 quant à lui, reconnaît les virus de la famille des *Picornaviridae* dont la réplication dépend d'un long transcrit d'ARN (Onoguchi et al., 2011).

Ces senseurs sont dans un état inactif dans le cytoplasme (Kowalinski et al., 2011). L'ARN viral est reconnu par la partie C-terminale et le domaine hélicase de ces protéines (Luo et al., 2011) ce qui entraîne un changement de conformation permettant l'exposition d'un domaine CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain) (Saito et al., 2007). Ce domaine CARD permet l'interaction avec le domaine CARD de MAVS (Mitochondrial AntiViral Signaling protein) (Zeng et al., 2010). MAVS est présent sur la membrane des mitochondries et sert de plateforme d'activation où les senseurs s'oligomérisent (Loo and Gale, 2011 ; Hou et al., 2011).



#### Figure 4: Détection de l'ADN cytosolique viral

Dans le cytosol, l'ADN viral est détecté par cGAS, qui en présence d'ATP et de GTP synthétise un dinucléotide cyclique, cGAMP. Ce dernier se lie à STING, localisé au niveau du réticulum endoplasmique, ce qui induit sa dimérisation et sa translocation vers le cytoplasme. STING interagit alors avec TBK1 qui induit sa phosphorylation, permettant le recrutement et l'activation d'IRF3. Ce facteur de transcription phosphorylé transloque vers le noyau où il active l'expression d'IFN $\beta$ .

MAVS recrute d'une part, TBK1 nécessaire à l'activation d'IRF3 et à la production d'IFN (Pichlmair and Reis e Sousa, 2007) et d'autre part, le complexe NEMO (NEMO avec IKK $\alpha$  / IKK $\beta$ ) menant à l'activation de NF- $\kappa$ B (Loo and Gale, 2011).

La présence d'ADN dans le cytoplasme active également la réponse IFN. Plusieurs senseurs impliqués dans cette réponse ont été mis en évidence dès 2007 avec la découverte de DAI (DNA dependent Activator of IRF) (Takaoka et al., 2007). Mais, l'activation d'IFN en réponse à l'ADN cytoplasmique dépend principalement de la présence de la protéine STING (Stimulator of Interferon Genes), identifiée en 2008 (Ishikawa and Barber, 2008). Cette protéine ubiquitaire réside au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Son activation par l'ADN induit la production d'IFN de façon indépendante du TLR9 mais dépendante d'IRF3 et de TBK1 (Ishikawa and Barber, 2008).

La cascade de signalisation impliquée dans cette activation a été mise en évidence pour les bactéries (*Mycobacterium tuberculosis* [Watson et al., 2015], *Listeria monocytogenes* [Hansen et al., 2014], Streptocoque de groupe B [Andrade et al., 2016]) et les virus à ADN (Adénovirus [Lam et al., 2014], HSV-1 [Su and Zheng, 2017] et KSHV (Wu et al., 2015)) (**Figure 4**).

Lors d'une infection par *Listeria monocytogenes*, des dinucléotides cycliques (CDN) sont sécrétés par la bactérie et activent la réponse IFN (Woodward et al., 2010), en se liant et en activant STING (Sauer et al., 2011).

Lors d'infection virale, l'ADN cytoplasmique est détecté par une enzyme cellulaire nommée cGAS (cyclic GAMP Synthase) (Sun et al., 2013). Cette enzyme se lie à l'ADN, de façon non spécifique de séquence, ce qui entraîne sa dimérisation (Li et al., 2013), et un changement de conformation dévoilant le domaine catalytique NTase (nucleotidyl transférase) (Zhang et al., 2014). Ce domaine catalytique, en présence d'ATP et de GTP, permet la synthèse du CDN cGAMP (cyclic Guanosine monophosphate – Adenosine monophosphate) (Wu et al., 2013). Comme ce qui est décrit pour les CDN bactériens, cGAMP se lie à STING induisant sa dimérisation (Shu et al., 2012). Cette étape est nécessaire pour l'activation de la cascade de signalisation (Sun et al., 2009) et induit la relocalisation de STING du RE vers des structures cytoplasmiques qui colocalisent avec TBK1 (Ishikawa et al., 2009).

Le recrutement de TBK1 induit son autophosphorylation. Cependant, l'activation de TBK1 seule ne permet pas d'induire la phosphorylation d'IRF3 (Liu et al., 2015). En effet, il est nécessaire que TBK1 phosphoryle STING sur différents résidus dont la sérine 366 (Tanaka and Chen, 2012). Cette phosphorylation induit le recrutement d'IRF3 sur la plateforme

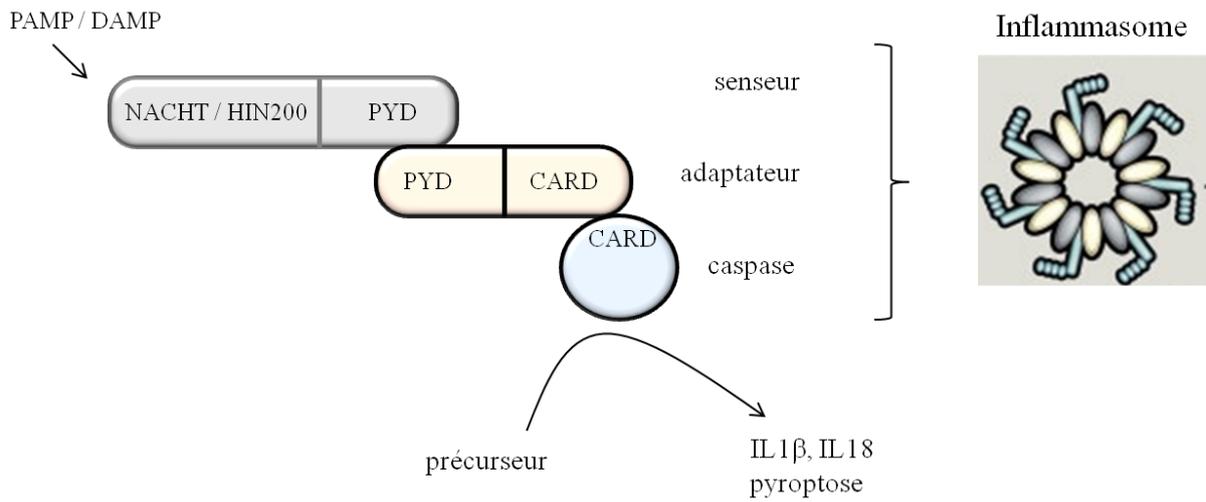
formée par STING. TBK1 est alors à proximité d'IRF3 et phosphoryle la sérine 396 du facteur de transcription, induisant son activation et l'expression d'IFN (Liu et al., 2015).

### C) Inflammasome

En plus de l'activation des facteurs de transcription, la détection de PAMP et de DAMP peut induire l'activation de l'inflammasome (**Figure 5**). Ce système multimérique active la maturation des cytokines IL1 $\beta$  et IL18 qui sont synthétisées sous une forme précurseur inactive. L'inflammasome se compose de 3 partenaires : un senseur qui détecte le signal, un adaptateur relayant ce signal et une cystéine protéase (caspase) (Latz et al., 2013). Différentes familles de senseurs sont décrites, les deux principales étant NLRP (Nucleotide-binding domain Like Receptor) et AIM (Absent In Melanoma 2 like receptor) dont les représentants principaux sont respectivement NLRP3 et AIM2 (Sharma and Kanneganti, 2016).

NLRP3 détecte différents signaux tels que les acides nucléiques, les composants des parois bactériennes et des signaux de danger (cristaux d'acide urique, niveau d'ATP...) (Man and Kanneganti, 2015). AIM2 quant à lui, détecte l'ADN double brin grâce à son domaine HIN200 (Lamkanfi and Dixit, 2014). Les senseurs présentent également un domaine PYD impliqué dans les interactions avec l'adaptateur ASC (Apoptosis associated Speck like protein containing a CARD) (Sharma and Kanneganti, 2016). La multimérisation de cet adaptateur permet le recrutement d'une caspase grâce à son domaine CARD, principalement la caspase 1. Cette enzyme est alors autoactivée pour induire le clivage des précurseurs d'IL1 $\beta$  et d'IL18 afin de permettre la sécrétion de ces cytokines (Broz and Dixit, 2016). Ces dernières pourront alors promouvoir la réponse adaptative, notamment la réponse des lymphocytes T auxiliaires. L'activation de l'inflammasome induit également une mort cellulaire spécifique nommée pyroptose (Lamkanfi, 2011).

Le rôle de l'inflammasome dans la défense au cours de l'infection a été mis en évidence pour de nombreux pathogènes, notamment bactériens (*Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis* [Alnemri, 2010 ; Rathinam et al., 2010]) et viraux (cytomégalovirus humain [HCMV], le virus de la vaccine, l'Adénovirus, le virus Influenza [Kanneganti, 2010]). Bien qu'ayant divers rôles dans l'immunité innée et la régulation de l'immunité adaptative, les fonctions et mécanismes d'activation de l'inflammasome ne seront pas traités en détails dans ce manuscrit.



### Figure 5: Activation de l'inflammasome

Le pathogène est détecté par le domaine NACHT (dans le cas des NLRP) ou par le domaine HIN200 (dans le cas des AIM) ce qui induit l'interaction par les domaines PYD avec l'adaptateur ASC et le recrutement par le domaine CARD de la caspase 1. Ce complexe se multimérise afin de former l'inflammasome et induire la maturation des cytokines IL1 $\beta$  et IL18 et la mort cellulaire par pyroptose.

## II- Des facteurs de transcription à l'activation de la réponse antivirale

### A) Facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont activés dans le cytoplasme puis transloquent vers le noyau pour se lier aux promoteurs et induire l'expression d'IFN et de cytokines. Les facteurs de transcription majoritairement impliqués sont NF- $\kappa$ B et IRF3/7. Seuls ces facteurs seront détaillés dans la suite de ce manuscrit et nous nous intéresserons spécifiquement à leur rôle dans la production d'IFN. Cependant, d'autres facteurs de transcription peuvent être impliqués dans cette production, comme AP1 formé d'un dimère c-Jun et ATF-2 (ou c-Fos en fonction du dimère) induit par l'activation des MAP kinases (Hommes et al., 2003).

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est composé d'un hétérodimère. Cinq sous-unités peuvent être assemblées pour former ce dimère : RelA (ou p65), RelB, c-Rel, p105 et p100 (Gilmore, 2006). Dans les cas d'activation de NF- $\kappa$ B par les TLR ou les senseurs cytoplasmiques, le dimère impliqué est composé de p65-p50 (Hayden et al., 2006). Ces sous-unités présentent toutes un domaine RHD (Rel Homology domain) qui se lie aux séquences  $\kappa$ B présentes dans le promoteur du gène de l'IFN $\beta$  (Kawai and Akira, 2007).

Il existe deux voies d'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B en fonction des sous-unités impliquées : (i) la voie classique décrite précédemment où le dimère p65-p50 est séquestré dans le cytoplasme par I $\kappa$ B $\alpha$ , la phosphorylation de cet inhibiteur par les kinases IKK permet la relocalisation nucléaire de NF- $\kappa$ B (Hayden et al., 2006) ; (ii) la voie alternative qui implique les sous-unités p105 et p100 qui sont des précurseurs présentant une extrémité inhibitrice en C-terminal. Leur phosphorylation par IKK $\alpha$  permet la dégradation de l'extrémité inhibitrice et leur maturation respectivement en p50 et p52.

Ces facteurs de transcription, une fois clivés, sont transloqués dans le noyau (Hayden et al., 2006). Avant cette translocation, la sous-unité p65 peut être phosphorylée par les kinases IKK sur son domaine de transactivation (Hayden and Ghosh, 2004), ce qui permet de faciliter le recrutement de co-activateurs et de favoriser l'expression d'IFN $\beta$  (O'Mahony et al., 2004).

L'autre famille de facteurs de transcription impliqués dans l'activation d'IFN est IRF. Cette famille se compose de 9 membres (Miyamoto et al., 1988) qui présentent tous en N-terminal un domaine de liaison à l'ADN (DBD : DNA Binding Domain) (Mamane et al., 1999). Ce domaine est responsable de l'interaction avec les régions PRD (Positive Regulatory Domain) présentes dans le promoteur du gène de l'IFN $\beta$  (Escalante et al., 2007). Les IRF peuvent

également se lier directement aux séquences ISRE (IFN Stimulated Response Element) présentes dans les promoteurs des gènes répondant à l'IFN (ISG : Interferon Stimulated Gene), afin d'en induire directement l'expression (Schmid et al., 2010). Le domaine C-terminal, nommé IAD (IRF Association Domain) est impliqué dans l'interaction des IRF avec différents partenaires cellulaires modulant leur fonction (Takahasi et al., 2003). Ces interactions entre IRF et facteurs cellulaires peuvent activer ou inhiber la réponse IFN (Mancino and Natoli, 2016). Par exemple, dans le cas de l'expression d'IFN, l'interaction d'IRF3 avec des co-activateurs, notamment l'histone acétyltransférase cellulaire CBP, facilite l'activation du promoteur de l'IFN $\beta$  (Qin et al., 2005).

Suite à leur phosphorylation par TBK1, IRF3 et IRF7 sont dimérisés, ce qui est nécessaire pour leur activation puis sont transloqués dans le noyau (Mori et al., 2004).

### **B) Activation de la réponse IFN**

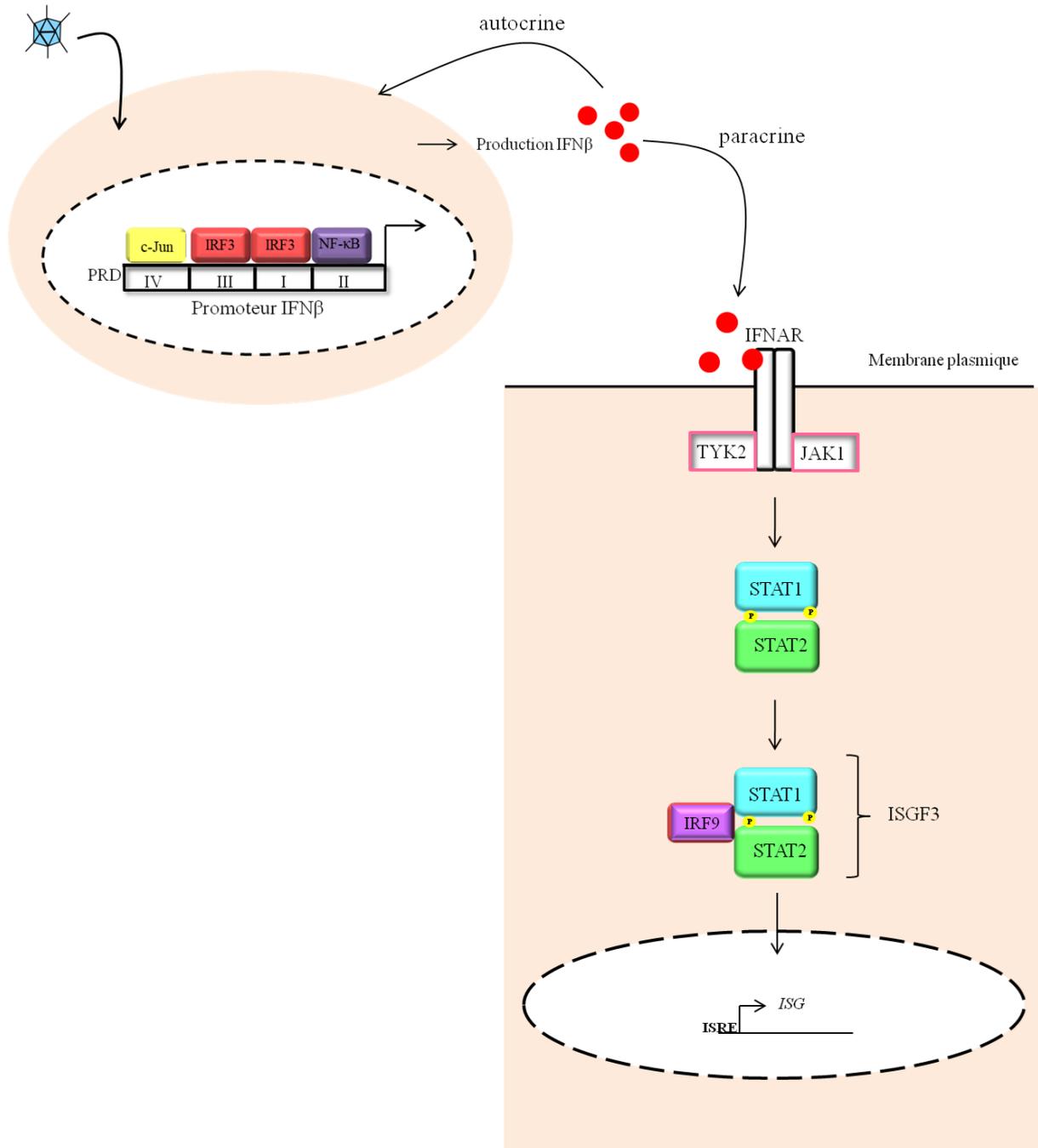
Les IFN furent découverts en 1957, dans le cas d'une infection par le virus Influenza, comme étant des éléments sécrétés interférant avec la réplication virale (Isaacs and Lindenmann, 1957). Il existe 3 types d'IFN classés en fonction de leur récepteur :

Les IFN de type I sont sécrétés par toutes les cellules nucléées. Ils regroupent l'IFN $\alpha$  (majoritairement produits par les pDC [Siegal et al., 1999]) et l'IFN $\beta$  (ainsi que les IFN $\epsilon$ , IFN $\kappa$ , IFN $\omega$  chez l'Homme). Chez l'Homme, un seul IFN $\beta$  et 13 membres d'IFN $\alpha$  sont décrits (Pestka et al., 2004) et sont considérés comme étant la cytokine antivirale par excellence (Samuel, 2001).

Les IFN de type II (IFN  $\gamma$ ) sont sécrétés par les cellules T et les cellules NK activées, et induisent une réponse contre d'autres pathogènes que les virus (Schroder et al., 2004).

Les IFN de type III (IFN  $\lambda$ ) présentent 4 membres limitant les infections virales et bactériennes (Negishi et al., 2017). Cependant, le récepteur des IFN  $\lambda$  n'est pas exprimé de façon ubiquitaire ce qui restreint son action à certaines cellules immunitaires (pDC, macrophages, lymphocytes B) (Syedbasha and Egli, 2017) et cellules épithéliales notamment pulmonaires (Lazear et al., 2015).

Les IFN $\alpha/\beta$  sont donc les acteurs majeurs de la réponse antivirale et leur mécanisme d'activation est détaillé ci-dessous.



### Figure 6 : Production d'IFN et expression des ISG

Le promoteur de l'IFN $\beta$  présente 4 domaines PRD (Positive Regualtory Domain) permettant l'interaction avec les différents facteurs de transcription qui induisent son expression et sa sécrétion. L'IFN se lie ensuite à son récepteur composé de deux sous-unités en interaction avec les kinases TYK2 et JAK1. Ces dernières une fois activées induisent la phosphorylation des facteurs de transcription STAT1 et STAT2 formant un hétérodimère. Ce complexe recrute alors IRF9 pour former ISGF3 qui transloque vers le noyau, et se lie aux séquences ISRE où il active l'expression des ISG.

L'expression d'IFN est favorisée par la formation d'un enhancéosome menant à l'activation de la transcription du gène (**Figure 6A**). Au niveau du promoteur de l'IFN se trouvent des séquences PRD (Positive Regulatory Domain) où les facteurs de transcription se lient de façon spécifique. Le promoteur de l'IFN $\alpha$  possède 2 PRD (PRDI et PRDIII) reconnus par les facteurs de transcription de la famille des IRF. En plus de ces 2 PRD, celui de l'IFN $\beta$  présente les PRDII et PRDIV qui permettent respectivement le recrutement de NF- $\kappa$ B et du facteur de transcription ATF-2/c-Jun (induit par la voie des MAP Kinases). C'est pourquoi l'activation de l'IFN $\beta$ , contrairement à l'IFN $\alpha$ , est induite par NF- $\kappa$ B (Honda et al., 2006).

Les IFN sont ensuite sécrétés par la cellule infectée afin d'alerter les cellules environnantes de la présence du pathogène (fonction paracrine) mais également de renforcer leur propre défense (fonction autocrine) (**Figure 6B**).

Le récepteur des IFN de type I (IFNAR) est exprimé de façon ubiquitaire à la surface des cellules et est composé de deux sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 liées respectivement par leur domaine cytosolique aux kinases TYK2 et JAK1. Ces kinases appartiennent à la famille des tyrosines kinases Janus (JAK : JAnus family of tyrosine Kinase), et sont activées par la liaison de l'IFN à son récepteur. Une fois activée par transautophosphorylation, ces kinases phosphorylent les facteurs de transcription STAT1 et STAT2 (Signal Transducer and Activator of Transcription). Les STAT s'assemblent en hétérodimères et se lient à IRF9 pour former le complexe ISGF3. Ce complexe transloque dans le noyau et se lie aux séquences ISRE pour induire l'expression des ISG. Les IFN vont également agir comme cytokines en activant les cellules de l'immunité adaptative (Le Bon et al., 2003) et en favorisant la présentation antigénique du pathogène (Epperson et al., 1992).

### C) Fonction antivirale des ISG

Il existe plus de 300 ISG induits par les IFN de type I, ayant diverses fonctions antivirales et pouvant limiter ou favoriser cette réponse (Der et al., 1998).

Certains de ces ISG amplifient la réponse IFN en induisant l'expression de facteurs déjà présents à un niveau basal dans les cellules (IRF, TLR, JAK/STAT [Sadler and Williams, 2008 ; Schneider et al., 2014]) ce qui permet d'amplifier la réponse IFN dans la cellule infectée et d'activer les cellules environnantes pour la détection rapide du pathogène au moment de leur entrée (Ivashkiv and Donlin, 2014).

D'autres ISG codent pour des protéines limitant directement la multiplication et la dissémination du pathogène. Ces facteurs peuvent être soit présents à un niveau basal latent

(et être activés au cours de l'infection) et leur expression est augmentée par les IFN (PKR, RNaseL, TRIM...), soit leur expression est induite par les IFN (MxGTPase, ISG20...). Ces facteurs ciblent différentes étapes du cycle de multiplication des pathogènes (entrée, réplication, sortie...).

Une des ISG décrites pour limiter l'entrée des virus est CH25H qui est une enzyme modifiant le cholestérol dans les membranes cellulaires ce qui inhibe la fusion entre ces membranes et les enveloppes virales. Elle limite ainsi l'infection par des virus enveloppés (HCMV, HSV-1), mais pas par l'Adénovirus qui est non enveloppé (Schneider et al., 2014).

Une fois le virus dans la cellule, d'autres ISG peuvent limiter sa multiplication tels que les MxGTPase qui séquestrent les nucléocapsides virales afin de limiter la réplication virale, notamment des virus à ARN négatif (Turan et al., 2004). Le génome viral peut également être ciblé pour dégradation, comme par exemple par ISG20 qui est une exonucléase limitant la multiplication de virus à ARN simple brin dont le VSV, le virus Influenza et le VIH-1, mais pas des virus à ADN comme l'Adénovirus (Espert et al., 2003 ; Espert et al., 2005). De même, la RNaseL induit la dégradation des ARN (Clemens and Williams, 1978) une fois activée par les 2'-5' adénylates produits par la OAS (2'-5' oligoadénylate synthase), elle-même activée par la détection d'ARN étranger.

L'étape de traduction des ARN viraux est également inhibée par la kinase PKR (Protein Kinase R) qui, une fois activée par l'ARN étranger, inhibe la traduction des ARN (cellulaires et viraux) en induisant la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  (Roberts et al., 1976).

La sortie des virus notamment enveloppés est quant à elle limitée par différents ISG tels que les vipérine et tétherine qui perturbent les membranes cellulaires (Szretter et al., 2011 ; Swiecki et al., 2013).

La famille des protéines TRIM comporte 60 membres chez l'Homme présentant tous une activité E3 ubiquitine ligase (Ikeda and Inoue, 2013). Ces TRIM agissent contre de nombreux virus et ciblent différentes étapes du cycle viral. Ainsi, TRIM5 $\alpha$  inhibe l'infection par VIH-1 en se liant à sa protéine de capsid afin d'en induire le désassemblage précoce (Campbell et al., 2008). D'autres TRIM peuvent également interagir avec les senseurs de l'immunité innée comme TRIM25 (Martín-Vicente et al., 2017) et TRIM56 (Tsuchida et al., 2010) qui induisent respectivement l'ubiquitination de RIG-1 et de STING pour augmenter leur activité antivirale. La localisation des TRIM module leur fonction, ainsi certains TRIM sont localisés

dans le noyau, comme TRIM19 qui détecte les génomes des virus à ADN afin d'induire leur chromatinisation et limiter la réplication virale (Geoffroy and Chelbi-Alix, 2011).

Finalement, d'autres ISG constituent des régulateurs négatifs de cette réponse immunitaire (voir **Tableau 1**). En effet, l'induction d'IFN doit être extrêmement régulée par la cellule afin de limiter une réponse excessive pouvant être néfaste pour l'hôte. Certaines maladies auto-immunes résultent ainsi d'une régulation inefficace de la réponse IFN (Crow, 2014), comme le syndrome de Sjörger et le lupus érythémateux systémique (Hall and Rosen, 2010). Ces pathologies mettent en évidence la nécessité d'un rétrocontrôle négatif efficace de la réponse IFN.

### III- Régulation de la réponse IFN

#### A) **Contrôle par la cellule**

Lorsque le pathogène est éliminé, la cellule inhibe la production d'IFN et ce, par différents moyens. Des exemples de ces différents mécanismes d'inhibition sont regroupés dans le **tableau 1**. La cellule peut ainsi limiter l'activation, par exemple en séquestrant les facteurs impliqués dans l'activation de l'immunité innée ou en inhibant leur fonction catalytique. Une autre stratégie est d'induire la dégradation de ces effecteurs. La cellule peut aussi exprimer des répresseurs qui entrent en compétition avec les facteurs activant la réponse immunitaire. Certains des éléments limitant la réponse IFN sont des ISG, transcrits en réponse à la production d'IFN afin de la limiter dans un mécanisme de rétrocontrôle négatif (Schoggins and Rice, 2011).

Cible de l'inhibition	Mécanisme d'inhibition	Référence
<b>Stratégie 1 : Limiter l'activation</b>		
TRAF6 TRAF3	Déubiquitinases cellulaires (USP4 et DUBA respectivement) qui suppriment les chaînes d'ubiquitine K63, nécessaires à l'activation	(Zhou et al., 2012) (Kayagaki et al., 2007)
NEMO	Déubiquitinase cellulaire (A20) qui se lie à NEMO afin d'empêcher l'activation des IKK et donc l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B	(Skaug et al., 2011)
IKK ( $\alpha$ et $\beta$ )	Protéine cellulaire NLRC5 qui se lie et limite leur phosphorylation	(Cui et al., 2010)
cGAS	Séquestré par Beclin1 pour ne pas se lier à l'ADN	(Liang et al., 2014)
IFNAR	Internalisation du récepteur	(Fuchs, 2013)
<b>Stratégie 2 : Induire la dégradation</b>		
STING	Ubiquitination de type K48 par les protéines TRIM30 $\alpha$ et RNF5 pour induire sa dégradation par le protéasome	(Wang et al., 2015) (Zhong et al., 2009)
TRAF6	Ubiquitination par TRIM38 pour dégradation par le protéasome	(Zhao et al., 2012)
IRF3	Dégradation des facteurs de transcription phosphorylés par le protéasome suite à leur ubiquitination	(Saitoh et al., 2006)
NF- $\kappa$ B	Dégradation de la sous-unité p65 par le protéasome après ubiquitination par PDLIM2	(Tanaka et al., 2007)
ARNm IL6	RNase induisant la dégradation de l'ARNm	(Matsushita et al., 2009)
<b>Stratégie 3 : Compétition par des répresseurs</b>		
Expression ISG inhibiteur	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling) supprime l'activité des kinases JAK en se liant à la forme phosphorylée pour empêcher son interaction avec STAT</li> <li>• FOXO3 : facteur de transcription répresseur qui entre en compétition avec IRF7</li> <li>• USP18 : activité isopeptidase qui induit la « deISGylation », et par conséquent l'inactivation de la voie JAK/STAT</li> <li>• I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math> : exprimé de nouveau après sa dégradation pour inhiber NF-<math>\kappa</math>B</li> </ul>	(Yoshimura et al., 2007) (Litvak et al., 2012) (Malakhova et al., 2003) (Arenzana-Seisdedos et al., 1995)
Myd88 (adaptateur TLR)	Compétition avec un variant d'épissage (nommé TAG) qui est un régulateur négatif inhibant l'activation du TLR4	(Palsson-McDermott et al., 2009)
IRF	Compétition entre les IRF pour limiter la production de cytokines	(Negishi et al., 2005)
Micro ARN	Régulation transcriptionnelle	(Forster et al., 2015)

**Tableau 1: Contrôle cellulaire de la réponse immunitaire innée**

## **B) Contremesures virales**

L'infection virale constitue une balance constante entre l'activation de la réponse immunitaire par l'hôte et les contremesures face à cette réponse par le pathogène. En effet, l'efficacité avec laquelle le virus contrôle la réponse immunitaire aura des conséquences sur sa pathogénicité (Young et al., 2003). Les mécanismes de contremesures du pathogène doivent donc être assez efficaces pour favoriser la multiplication du virus mais doivent en même temps être limités pour ne pas entraîner la mort des cellules hôtes avant la fin du cycle viral (Randall and Goodbourn, 2008). Le pathogène échappe à l'activation de la réponse immunitaire soit en camouflant efficacement les PAMP pouvant être reconnus soit en interférant avec l'activation des cascades de signalisation. Les pathogènes codent pour des protéines limitant la réponse IFN qui sont souvent des protéines multifonctionnelles capables d'inhiber cette réponse à différentes étapes de l'induction (García-Sastre, 2017). Ces facteurs sont parfois des protéines de structure, déjà disponibles dans le virion dès son entrée afin d'inhiber rapidement la réponse immunitaire innée. Le **tableau 2** regroupe les principales stratégies de contremesures virales, illustrées d'exemples pour différentes familles de virus.

Virus (Protéine)	Fonction	Référence
<b>Stratégie 1 : Limiter l'exposition de PAMP</b>		
Paramyxovirus	Coiffe virale pour protéger l'extrémité 5'ppp des ARN viraux	(Tawar et al., 2009)
Virus Influenza	Utilisation des coiffes des ARNm cellulaires pour les lier aux ARNm viraux	(Gu et al., 2015)
Picornavirus	Liaison covalente d'une protéine virale à l'extrémité 5' des ARN viraux	(Goodfellow, 2011)
Virus à ARN positif	Compartmentalisation dans le cytoplasme pour la réplication	(Miller and Krijnse-Locker, 2008)
Adénovirus (VIII)	Chromatinisation de l'ADN viral	(Karen and Hearing, 2011)
<b>Stratégie 2 : Séquestrer les activateurs de l'immunité innée</b>		
HCMV (UL82)	Inhibe translocation de STING du RE	(Fu et al., 2017)
HPV16 (E6)	Empêche l'activation d'IRF3	(Ronco et al., 1998)
KSHV	Code pour des IRF viraux interférant avec la dimérisation des IRF cellulaires	(Joo et al., 2007)
Adénovirus (E1A)	Interaction avec le co-activateur cellulaire CBP et le facteur de transcription STAT1	(Leonard and Sen, 1996) (Look et al., 1998)
Virus de la Vaccine (B18R)	Code pour des récepteurs solubles de l'IFN empêchant leur liaison aux récepteurs cellulaires	(Colamonici et al., 1995)
HPV (E7)	Séquestre IRF9 empêchant la formation ISGF3	(Barnard and McMillan, 1999)
HCMV (IE1)	Séquestre STAT1 et STAT2	(Paulus et al., 2006)
<b>Stratégie 3 : Inhiber les fonctions des activateurs de l'immunité innée</b>		
Flavivirus (NS4B)	Inhibe l'activité kinase de TBK1	(Dalrymple et al., 2015)
KSHV (ORF52)	Inhibe cGAS, empêchant la formation de cGAMP	(Wu et al., 2015)
AdV (E3)	Inhibe les kinases IKK et donc l'activation de NF- $\kappa$ B	(Friedman and Horwitz, 2002)
MARV (VP40)	Inhibe l'activité kinase de JAK1 et donc l'expression ISG	(Valmas et al., 2010)
JEV (NS5)	Active des phosphatases limitant l'activation de JAK/STAT	(Lin et al., 2006)
AdV (VA-I-ARN)	Inhibe la dimérisation de PKR, nécessaire à son activation	(Launer-Felty and Cole, 2014)
<b>Stratégie 4 : Dégrader les facteurs de l'immunité innée</b>		
HCV (NS3/4a)	Clive les adaptateurs TRIF et MAVS	(Li et al., 2005a) (Li et al., 2005b)
DENV (NS2B3)	Code pour une protéase qui clive STING	(Aguirre et al., 2012)
Rotavirus (NSP1)	Induit la dégradation IRF3 par le protéasome	(Graff et al., 2007)
HCMV	Induit la dégradation de JAK1	(Miller et al., 1998)

**Tableau 2: Exemples de contremesures virales de la réponse immunitaire innée**

L'activation de la réponse innée et la production d'IFN induisent une réponse antivirale limitant la multiplication et la dissémination du pathogène, tant que celui-ci ne la contourne pas. D'autres moyens de défense existent dans la cellule pour éliminer le pathogène, l'autophagie est un de ces mécanismes.



## CHAPITRE 2

### L'autophagie : une voie de dégradation limitant l'infection

L'autophagie est un mécanisme de dégradation impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires. La défense face aux infections, en induisant spécifiquement la séquestration et l'élimination du pathogène, est celle qui nous intéressera dans ce manuscrit. L'autophagie est un procédé en plusieurs étapes faisant intervenir de nombreux complexes protéiques, différentes voies d'activation et effecteurs. Ce mécanisme sera donc tout d'abord décrit afin d'introduire les facteurs cellulaires impliqués dans cette réponse puis la fonction de l'autophagie au cours de l'infection sera détaillée.

#### I- L'autophagie : un mécanisme de dégradation

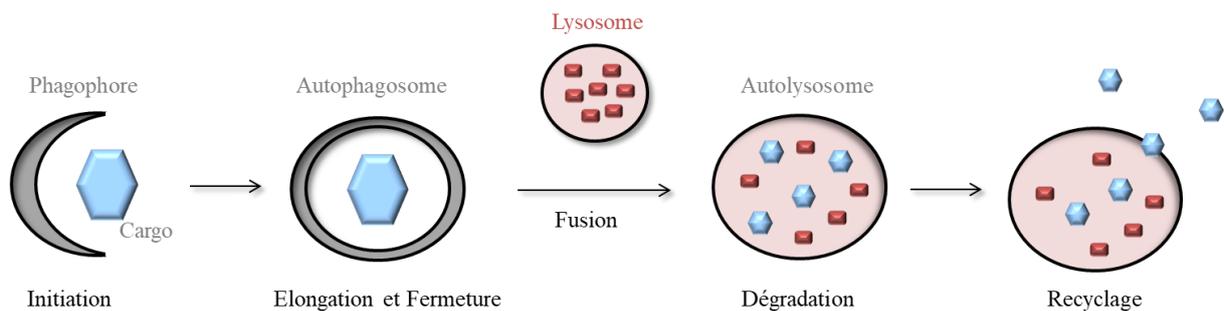
##### A) Généralités

L'autophagie est un mécanisme de dégradation cellulaire impliquant le lysosome (Jones, 2009). Ce processus a tout d'abord été observé dans les années 1960 quand Christian de Duve a mis en évidence la dégradation de mitochondries par le lysosome et a nommé ce mécanisme « autophagie », du grec « se manger soi-même » (Deter and de Duve, 1967). L'investigation des mécanismes moléculaires de l'autophagie chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* a permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans ce processus (Tsukada and Ohsumi, 1993), et ils furent par la suite regroupés dans la famille ATG (AuTophagy related Gene) (Klionsky et al., 2003). Actuellement, plus d'une trentaine de gènes a été identifiée et ils sont conservés de la levure aux mammifères (Glick et al., 2010). L'identification de ces gènes et des fonctions de leurs protéines correspondantes a été récompensé par le Prix Nobel de Médecine en 2016, attribué au Dr Yoshinori Ohsumi.

Il existe 3 types différents d'autophagie en fonction du mécanisme par lequel le cargo, c'est-à-dire l'élément à dégrader, est dirigé vers les lysosomes. La micro-autophagie qui s'appuie sur l'invagination de portions de la membrane du lysosome pour capturer le cargo (Mijaljica et al., 2011). L'autophagie dépendante des chaperonnes (ou CMA : Chaperone Mediated Autophagy) qui se base sur le recrutement de la chaperonne Hsc70 par le motif KFERQ exposé sur le cargo à dégrader. Cette chaperonne induit le dépliement du cargo afin de le transporter à travers la membrane du lysosome en interagissant avec le récepteur lysosomal LAMP2A (Tasset and Cuervo, 2016).

Finally, macro-autophagy (named by the suite « autophagy » in this manuscript), which is a process isolating the cargo in several steps (**Figure 7**). The first of them is the formation of a phagophore which elongates to sequester the cargo in a vesicle with a double membrane, the autophagosome. This vesicle fuses with the lysosome to form the autolysosome in which the cargo is degraded by the acidic pH and the presence of lytic enzymes. After degradation, lysosomal permeases allow the recycling of degradation products in the cytosol (Parzych and Klionsky, 2014).

This degradation mechanism is complex and many cellular factors are involved in its different activation steps.



### Figure 7: Etapes simplifiées de l'autophagie

During the initiation step, a vesicle with a double membrane, the phagophore, is formed around the cargo to be degraded. This vesicle elongates and closes to form the autophagosome. The latter fuses with lysosomes which contain hydrolases and present an acidic pH, to form the autolysosome allowing the degradation of the cargo. The degradation products are then recycled in the cytoplasm.

## **B) Les différentes étapes de l'autophagie et facteurs impliqués**

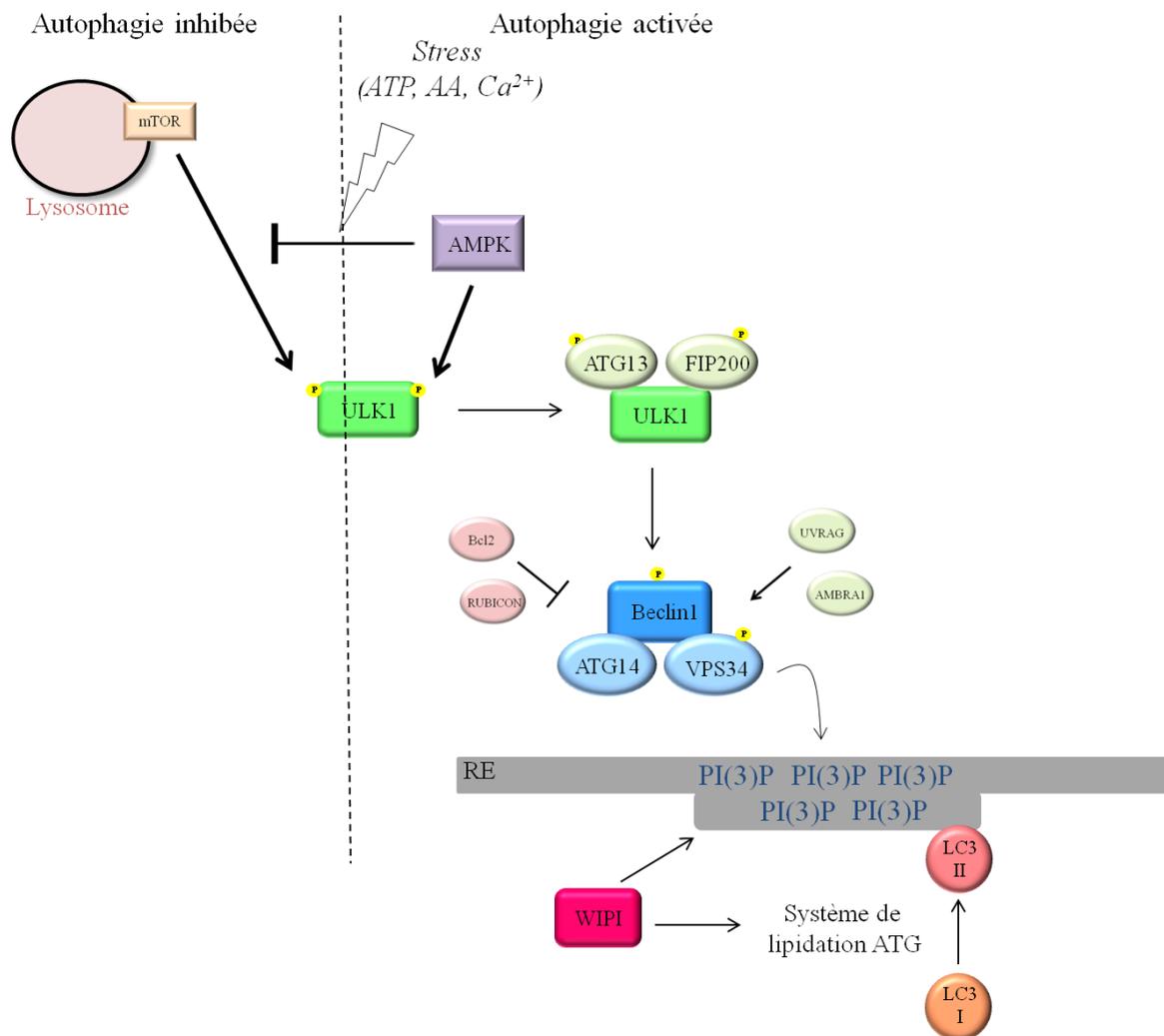
Les étapes successives d'activation de l'autophagie comprennent, l'activation après la détection du stress cellulaire, l'initiation de la formation du phagophore, l'élongation et la fermeture de l'autophagosome, puis finalement la dégradation du cargo par fusion avec le lysosome. Certaines étapes sont bien décrites, d'autres restent controversées, notamment la source de membrane formant le phagophore qui est encore débattue. Bien que le rôle du RE semble important (Ylä-Anttila et al., 2009), les membranes formant l'appareil de Golgi (Takahashi et al., 2011), la mitochondrie (Hailey et al., 2010) ou encore la membrane plasmique (Ravikumar et al., 2010) pourraient être impliquées.

Le processus d'activation décrit ci-après représente un exemple type de l'autophagie permettant de dégrader de façon non spécifique des portions du cytoplasme.

### *1- Activation*

Différents signaux peuvent induire l'activation de l'autophagie, dont les facteurs de croissance, le niveau d'ATP intracellulaire, les influx de calcium ou encore une carence en acides aminés (Pattingre et al., 2008). Le principal senseur impliqué dans la détection de ces signaux est la kinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycine) dont l'état d'activation régule celui de l'autophagie (Hay and Sonenberg, 2004). Ainsi lorsque mTOR est actif, l'autophagie est inhibée.

La localisation de mTOR est responsable de cette régulation (Korolchuk and Rubinsztein, 2011) (**Figure 8**). En conditions riches en acides aminés, le senseur mTOR est recruté sur la membrane des lysosomes et est activé afin d'induire une phosphorylation inhibitrice sur la sérine 757 de la kinase ULK1 et d'ATG13, empêchant l'activation de l'autophagie (Kim et al., 2011) (**Figure 8**). Au contraire, lorsque les acides aminés manquent, mTOR est relocalisé dans le cytoplasme, et est alors inactif (Sancak et al., 2010). Dans ce cas, ULK1 est dissocié de mTOR et est activé par la kinase AMPK (AMP activated protein Kinase) (Mao and Klionsky, 2011). Cette dernière est activée par différentes kinases (LKB1, CAMKK2) en fonction du stress cellulaire. Ces activations permettent la phosphorylation de la sérine 172 d'AMPK (Mihaylova and Shaw, 2011). Par la suite, AMPK active ULK1 d'une part, en inhibant le complexe mTOR (Kim and Guan, 2011) et d'une autre part, en induisant des phosphorylations activatrices sur différents résidus d'ULK1 tels que les sérines 317, 555 et 777 (Kim et al., 2011 ; Egan et al., 2011) (**Figure 8**).



### Figure 8: Etapes d'initiation de la formation de l'autophagosome

L'autophagie est inhibée par mTOR qui sous sa forme active est localisé sur les lysosomes et induit des phosphorylations inhibitrices de ULK1.

La détection de stress cellulaires comme le niveau d'ATP ou d'acides aminés induit l'activation d'AMPK et l'inhibition de mTOR.

AMPK induit alors des phosphorylations activatrices d'ULK1 qui s'associe avec ATG13 et FIP200.

La kinase ULK1 active ce complexe et induit le recrutement du complexe Beclin1.

Bcl2 et Rubicon inhibent ce complexe, et UVRAG et AMBRA1 favorisent son activation.

Le complexe Beclin1 est alors activé par ULK1, ce qui permet la formation de plateforme PI(3)P par l'activité de VPS34. Ces plateformes sont le site de formation du phagophore et induisent le recrutement des WIPI, elles-mêmes impliquées dans l'activation de la lipidation de LC3 (LC3-II).

## 2- *Initiation*

Suite à son activation, ULK1 se lie à et phosphoryle ATG13 et FIP200 (aussi nommé RB1CC1), (Jung et al., 2009). Le complexe ULK1 une fois activé s'associe à la membrane du RE (Karanasios et al., 2013) et induit le recrutement du complexe d'activation Beclin1/ ATG14 / VPS34 (Matsunaga et al., 2010) (**Figure 8**).

L'activation de ce complexe est régulée d'une part, par ULK1 qui induit la phosphorylation de Beclin1 et de VPS34 (Russell et al., 2013) et d'une autre part, par son interaction avec différents facteurs cellulaires (**Figure 8**).

Ainsi Beclin1 fait partie d'un complexe composé de différents partenaires pouvant induire son activation, comme AMBRA 1 et UVRAG qui favorisent l'interaction de Beclin1 avec VPS34 (Fimia et al., 2007 ; Liang et al., 2006). Mais des partenaires cellulaires permettent également d'inhiber Beclin1, tels que Bcl2 qui interfère avec l'interaction entre Beclin1 et VPS34 (Pattingre et al., 2005) ou encore Rubicon qui interfère avec la liaison d'UVRAG (Zhong et al., 2009). En fonction des facteurs interagissant avec Beclin1, le complexe présentera une fonction dans l'initiation ou la maturation des autophagosomes (détaillé plus tard dans ce chapitre).

Dans le cadre de l'initiation de l'autophagie, Beclin1 est associé à VPS34 qui présente une activité PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase) et génère des plateformes de Phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P). La concentration locale de ces PI(3)P forme un omégasome au niveau du RE. (Nazarko and Zhong, 2013 ; Nascimbeni et al., 2017) (**Figure 8**). ATG14 permet l'ancrage du complexe Beclin1 au niveau de ces structures (Obara et al., 2006).

Cet omégasome constitue le site à partir duquel va se former le phagophore et est également nommé PAS (Phagophore Assembly Site) (Lamb et al., 2013). Les plateformes de PI(3)P permettent de recruter directement les protéines WIPI (WIPI 1, 2, 3 et 4) qui sont impliquées dans l'élongation du phagophore (Proikas-Cezanne et al., 2015), et notamment WIPI2 qui permet le recrutement du complexe de lipudation de LC3, nécessaire à l'élongation (Dooley et al., 2014).

## 3- *Elongation*

MAP-LC3 (Microtubules Associated Protein light chain 3), nommé LC3 par la suite, est un orthologue d'ATG8. C'est une protéine clef de l'élongation de l'autophagosome et sa lipudation est nécessaire pour cette fonction. Cette protéine appartient à la famille

LC3/GABARAP regroupant 7 membres chez les mammifères (MAP-LC3A, MAP-LC3B, MAP-LC3B2, MAP-LC3C, GABARAP, GABARAP L1 et GABARAP L2) pouvant tous être modifiés par lipidação (Martens, 2016).

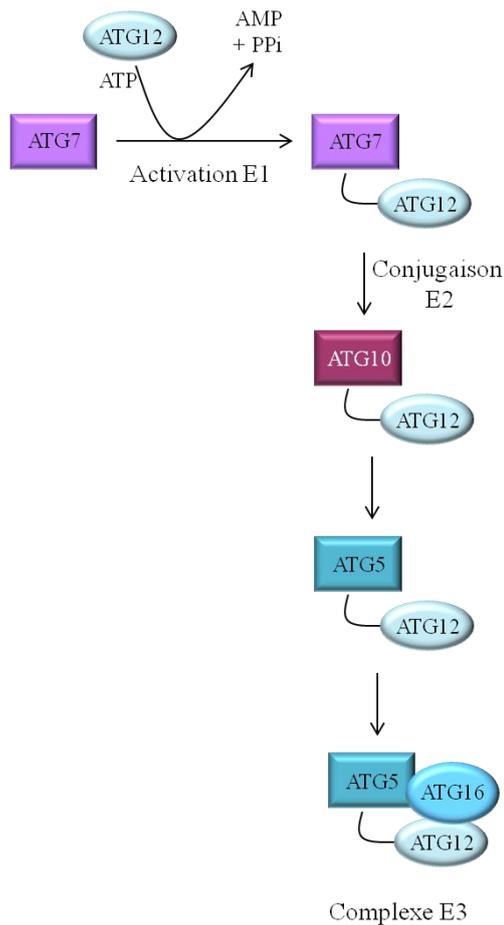
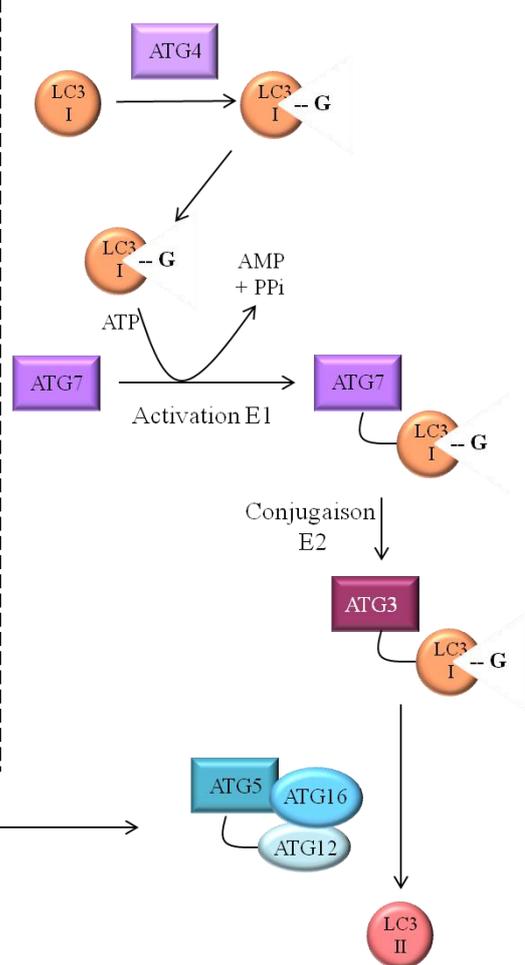
Il existe ainsi une forme non lipidée de LC3, LC3-I qui est localisée dans le cytoplasme et une forme lipidée de LC3, LC3-II qui est insérée dans les membranes (Tanida et al., 2004).

La lipidação de LC3 est un processus régulé en plusieurs étapes qui nécessite d'une part l'activation du complexe de lipidação comportant ATG5/ATG12/ATG16 et d'une autre part le clivage de LC3 par ATG4 (Ohsumi, 2001) (**Figure 9**). Ces activations fonctionnent de façon similaire à l'ubiquitination, avec ATG7 présentant une fonction activatrice similaire aux ubiquitine ligases E1 (Kim et al., 1999), ATG10 (Shintani et al., 1999) et ATG3 (Metlagel et al., 2014) étant similaire aux enzymes de conjugaison E2.

ATG7 et ATG10 permettent, suite à la cascade de réactions enzymatiques, la formation du complexe de lipidação de LC3 formé des facteurs ATG5, ATG12 et ATG16. Ce complexe, une fois formé, lie de façon covalente un groupement PE (Phosphatidyl-Ethanolamine) à l'extrémité C-terminale de LC3 (Ichimura et al., 2004). Cette étape finale requiert au préalable que LC3 soit clivé par la protéase ATG4 permettant d'exposer un résidu glycine à son extrémité C-terminale (Kirisako et al., 2000), site de conjugaison avec le PE. La forme lipidée de LC3 peut de nouveau être clivée par ATG4 afin de retirer le groupement PE et permettre le recyclage de LC3 (Yu et al., 2012).

L'élongation de l'autophagosome est favorisée par ATG9, unique ATG transmembranaire, qui circule entre l'omégasome et les structures en périphérie pour favoriser l'apport de lipides constituant les membranes (Feng and Klionsky, 2017 ; Karanasios et al., 2016).

Lors de l'élongation, les complexes ATG se dissocient des membranes, alors que LC3-II y reste associé. L'association de LC3 à la membrane de l'autophagosome n'étant pas un mécanisme transitoire, la détection de sa lipidação et de sa localisation sont classiquement suivies respectivement par des techniques de western blot et d'immunofluorescence afin de déterminer l'état d'activation de l'autophagie dans les cellules (Klionsky et al., 2016).

(i) Formation du complexe de lipitation de LC3(ii) Clivage et lipitation de LC3**Figure 9: Mécanisme de lipitation de LC3**

Deux étapes sont nécessaires pour induire la lipitation de LC3 :

(i) la formation du complexe de lipitation de LC3

ATG7 permet d'activer ATG12 en présence d'ATP et le transmet à l'enzyme de conjugaison ATG10, qui lie ATG12 à son substrat ATG5. Ce complexe interagit alors avec ATG16 pour former le complexe E3 nécessaire pour la lipitation de LC3.

(ii) le clivage et la lipitation de LC3

ATG4 est une protéase qui clive l'extrémité C-terminale de LC3 afin d'exposer un résidu glycine. LC3 ainsi clivé est activé par ATG7, puis conjugué à ATG3 qui en collaboration avec le complexe E3 précédemment formé, permet la lipitation de LC3 (LC3-II) sur le résidu glycine.

#### 4- Fermeture

Le mécanisme par lequel l'autophagosome est fermé est peu connu, mais semble impliquer des processus de scission de membrane (Knorr et al., 2015), parfois nommé mécanisme de fusion reverse (Noda et al., 2009). LC3 semble fortement impliqué dans cette étape (Noda et al., 2009).

#### 5- Fusion avec le lysosome

L'autophagosome une fois fermé est transporté jusqu'aux régions périnucléaires où sont localisés les lysosomes. Ce transport requiert les microtubules et dépend de la dynéine (Kimura et al., 2008). LC3 pourrait également jouer un rôle dans ce transport, car il a été initialement identifié comme protéine associée aux microtubules (Kuznetsov and Gelfand, 1987), et parce qu'il a été montré que la présence d'un LC3 non fonctionnel perturbe le transport des autophagosomes le long des microtubules (Kimura et al., 2008).

Par la suite, l'autophagosome fusionne avec le lysosome dans un mécanisme faisant coopérer de nombreux facteurs parmi lesquels Rab7 qui interagit avec le récepteur LAMP2A présent sur la membrane du lysosome (Jäger et al., 2004), mais également avec des composants du complexe Beclin1. L'activation de Rab7 est ainsi favorisée par UVRAG (Liang et al., 2008) alors que Rubicon inhibe cette étape de fusion (Sun et al., 2011).

Le complexe SNARE est également impliqué, ce dernier est responsable de la fusion entre 2 vésicules, avec la présence de v-SNARE et t-SNARE respectivement sur l'autophagosome (vésicule donneuse) et le lysosome (vésicule cible) (Itakura et al., 2012).

L'autolysosome ainsi formé induit la dégradation du cargo grâce au pH acide de la vésicule et à la présence d'hydrolases. Les composants dégradés sont alors recyclés dans le cytosol grâce aux perméases du lysosome (Parzych and Klionsky, 2014).

### C) Activation de l'autophagie et fonctions cellulaires

L'autophagie est un mécanisme nécessaire à diverses fonctions cellulaires. Le rôle essentiel de l'autophagie est mis en évidence par le développement de pathologies associées à des défauts de son activation. A un niveau basal, l'autophagie participe à l'homéostasie cellulaire (recyclage d'énergie, dégradation continu des composants du cytoplasme ...) mais elle peut également être activée en réponse à différents stress cellulaires (carence en nutriments, infections, agrégats protéiques...) (Glick et al., 2010). Ces différentes voies d'activation ainsi que les fonctions cellulaires associées sont présentées dans ce paragraphe (**Figure 10**).

### *1- Autophagie non sélective*

Lors d'une carence (en acides aminés, en nutriments, en ATP...) la cellule détecte ce stress cellulaire grâce à des senseurs spécifiques (mTOR, AMPK) et induit l'activation de l'autophagie (Glick et al., 2010). Elle s'effectue selon les mécanismes décrits précédemment afin de séquestrer des portions du cytoplasme dans des vésicules à double membrane marquées par LC3. Ces autophagosomes peuvent être détectés dès 15 à 30 min après la carence (Eskelinen and Saftig, 2009). Leur dégradation par autophagie permet de recycler des éléments du cytoplasme comme source d'énergie et de nutriments et est donc essentielle pour la survie de la cellule.

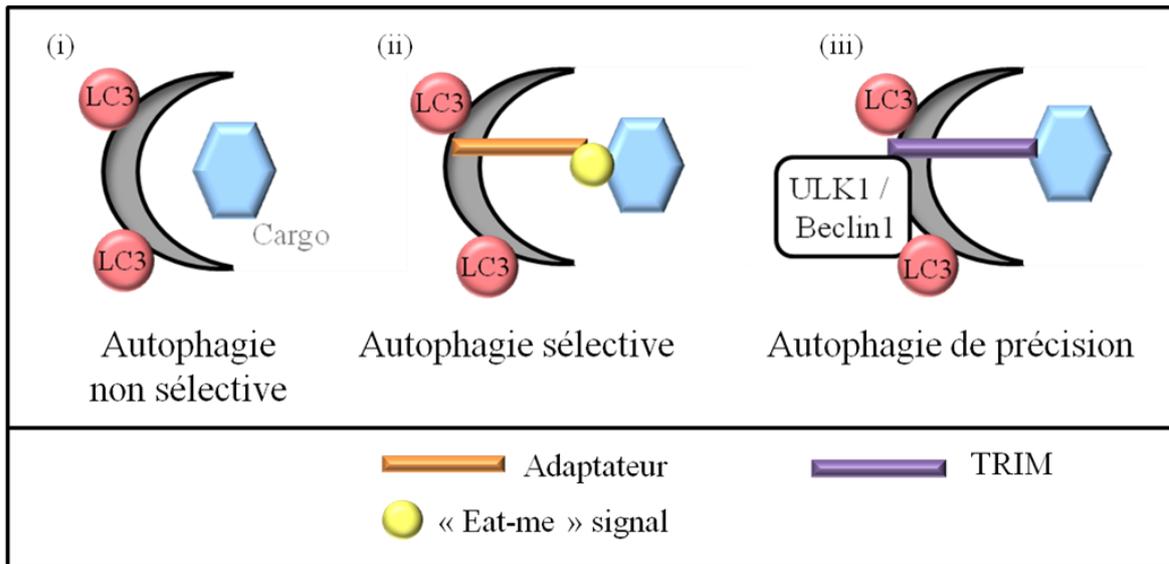
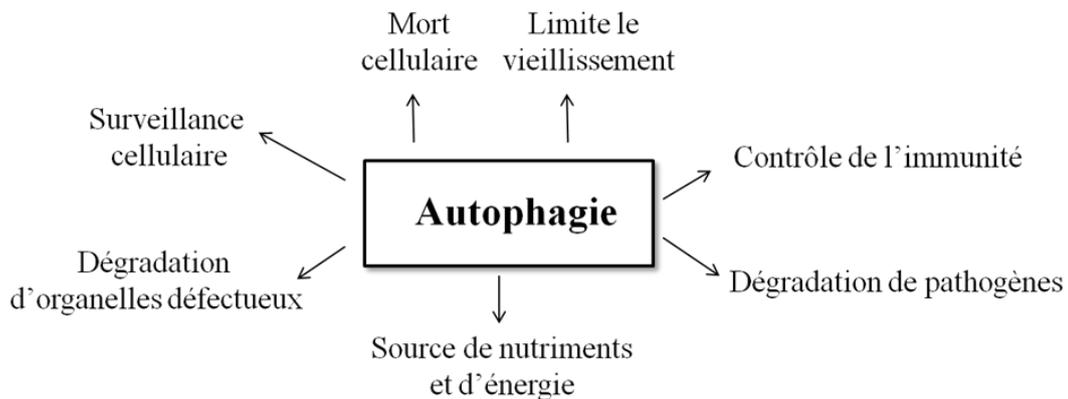
### *2- Autophagie sélective*

Une des principales fonctions de l'autophagie pour la survie cellulaire est le contrôle de la qualité intracellulaire. L'autophagie induit en continu la dégradation d'agrégats de protéines ou d'organelles endommagés (mitochondrie, peroxysome...) dont l'accumulation peut être délétère pour la cellule (Glick et al., 2010). Cette dégradation sélective nécessite de reconnaître spécifiquement le cargo à dégrader. Pour cela, le cargo est marqué par des signaux de dégradation ou « eat-me signal » qui sont reconnus par un adaptateur. Ce dernier permet d'induire la dégradation en interagissant avec LC3 et donc en activant l'autophagie. Cette fonction est essentielle pour le renouvellement des protéines et est active même à un niveau basal d'autophagie (Mizushima, 2009). Elle a un rôle notamment pour lutter contre le vieillissement (Bergamini et al., 2007).

L'autophagie sélective présente également une fonction dans la défense face aux infections, lorsque le cargo à dégrader est un pathogène (voir partie II de ce chapitre).

### *3- Autophagie de précision*

En plus de l'autophagie sélective, un mécanisme de dégradation encore plus spécifique a récemment été mis en évidence. Dans cette autophagie de précision, le cargo à dégrader est directement reconnu par une protéine faisant le lien avec le complexe d'activation de l'autophagie. Cette autophagie s'appuie sur les protéines TRIM, précédemment décrites pour leur rôle dans l'activation de l'immunité innée. Dans ce cas, ces TRIM reconnaissent d'une part le cargo à dégrader et d'une autre part, interagissent directement avec la machinerie Beclin1 / ULK1 (Kimura et al., 2016).

**A****B**

### Figure 10: Les différents types d'autophagie et leur fonction

(A) Les différents types d'autophagie (adapté de *Kimura et al, 2016*)

- (i) Autophagie non sélective qui induit la dégradation non spécifique d'un cargo enfermé dans un phagosome recrutant LC3.
- (ii) L'autophagie sélective, où le cargo à dégrader est marqué par des signaux « eat-me » eux même reconnus par des adaptateurs qui font le lien entre le cargo à dégrader et LC3 permettant le recrutement de ce dernier sur le phagosome en formation.
- (iii) Autophagie de précision, où le cargo à dégrader est reconnu directement (sans signaux « eat-me ») par une protéine, ici TRIM. Cette protéine interagit également directement avec les complexes d'activation de l'autophagie (ULK1/Beclin1) permettant la lipodation de LC3.

(B) Les différentes fonctions cellulaires de l'autophagie.

Les études sur l'autophagie de précision étant récentes, sa fonction n'est pas totalement élucidée pour le moment. Mais des exemples mettent en évidence son rôle dans la dégradation spécifique de pathogène (notamment VIH-1 [Mandell et al., 2014]) et dans la régulation de l'immunité innée (par exemple la dégradation spécifique d'IRF3 activé [Kimura et al., 2015]).

#### *4- Pathologies associées à l'autophagie*

Les fonctions de l'autophagie étant multiples, de nombreuses pathologies sont associées à un défaut d'autophagie, notamment les maladies neurodégénératives caractérisées par une accumulation d'agrégats de protéines. Parmi elles, on retrouve les maladies d'Alzheimer (Boland et al., 2008), de Parkinson (Anglade et al., 1997) et de Huntington (Sarkar et al., 2007).

L'autophagie est également décrite pour son rôle anti-tumoral grâce à la protéine Beclin1. Ainsi, la surexpression de Beclin1 diminue la croissance de tumeurs (Liang et al., 1999). Des composants du complexe Beclin1 comme UVRAG (Liang et al., 2006) et AMBRA1 (Fimia et al., 2007) sont également décrits comme suppresseurs de tumeur. Cependant ce rôle de l'autophagie est controversé et des études suggèrent qu'au contraire elle favorise le développement de tumeurs en fournissant les nutriments nécessaires à leur croissance (Amaravadi et al., 2007). Il est ainsi suggéré que l'implication de l'autophagie dans le cancer soit dépendante du type de tumeur et de son stade de développement (Glick et al., 2010)

Finalement, l'autophagie peut limiter la réponse induite lors de l'infection et ainsi éviter un excès de réponse inflammatoire pouvant être délétère pour la cellule. Ainsi, une dérégulation de cette activité est liée au développement de maladies inflammatoires telles que la maladie de Crohn (Deretic et al., 2013) et de maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux systémique (Liu et al., 2016). Ce contrôle réciproque entre autophagie et réponse immunitaire sera détaillé plus tard dans ce manuscrit.

#### *5- Rôle de l'autophagie dans l'infection*

L'autophagie sélective peut induire la dégradation spécifique de pathogènes. Ceci permet d'une part, de limiter la multiplication du pathogène et d'une autre part, d'activer l'immunité en réponse à l'infection. En effet, les produits de dégradation peuvent être reconnus par des PRR afin d'induire des cascades de signalisation menant à l'activation des IFN notamment, mais peuvent également être exposés par les molécules du complexe majeur

d'histocompatibilité (CMH). L'exposition des peptides par le CMH-II permet ainsi d'activer les lymphocytes T CD4+ (Paludan et al., 2005). Cependant, l'autophagie semble peu impliquée dans la voie de présentation par le CMH-I (Münz, 2016).

Pour la suite de ce manuscrit, le rôle de l'autophagie sélective dans la défense face aux infections est détaillé.

## II- Autophagie sélective : la xénophagie

Le processus d'autophagie permettant de dégrader les pathogènes est impliqué dans l'immunité en réponse à l'infection et est nommé « xénophagie », du grec « manger un élément étranger ». Différents pathogènes sont ainsi la cible de la xénophagie comme les bactéries intracellulaires (Jo et al., 2013), les virus (Dreux and Chisari, 2010), les champignons (Kanayama and Shinohara, 2016) et les parasites (Latré de Laté et al., 2017). Ce mécanisme nécessite la détection spécifique du pathogène et la présence d'adaptateurs (ou récepteurs) qui connectent le pathogène à dégrader avec les complexes de l'autophagie.

### A) Signaux de reconnaissance et adaptateurs

Deux motifs sont reconnus pour détecter le pathogène et activer l'autophagie. Ce sont les « eat-me signal » et ils sont reconnus par des adaptateurs permettant le recrutement de LC3 et l'activation de l'autophagie sélective (Boyle and Randow, 2013) (**Figure 11**).

#### 1- Signaux « Eat-me »

##### Ubiquitine

Le premier signal « eat-me » décrit est l'ubiquitine. En effet, lors de leur entrée dans le cytoplasme de nombreux pathogènes dont les bactéries intracellulaires sont ubiquitinés (Collins et al., 2009 ; van Wijk et al., 2012). Ceci implique des E3 ubiquitine ligases cellulaires. Cependant, les enzymes activées et les types d'ubiquitination ajoutés diffèrent en fonction du pathogène (Casanova, 2017). Il est ainsi suggéré lors d'une infection bactérienne par *Salmonella typhimurium* que l'ubiquitine ligase LRSAM1 soit impliquée (Huett et al., 2012), mais les mécanismes de recrutement et d'activation de LRSAM1 ainsi que le substrat de cette ubiquitination restent mal connus (Kohler and Roy, 2017). D'autres ubiquitine ligases sont également décrites pour leur rôle dans l'autophagie sélective dirigée contre les

pathogènes telles que SMURF1 (Orvedahl et al., 2011), Parkin (Manzanillo et al., 2013) et la famille des TRIM (Sparrer and Gack, 2018). Les mécanismes d'activation et substrats de ces ligases restent également peu connus (protéines de surface du pathogène ? protéines cellulaires associées aux pathogènes ?) (Boyle and Randow, 2013) mais l'ubiquitination est une étape clef, nécessaire pour restreindre la prolifération des pathogènes (Celli, 2012). Différentes chaînes d'ubiquitine peuvent être associées aux pathogènes, notamment de type K48 et K63 (Grumati and Dikic, 2018).

### Galectine

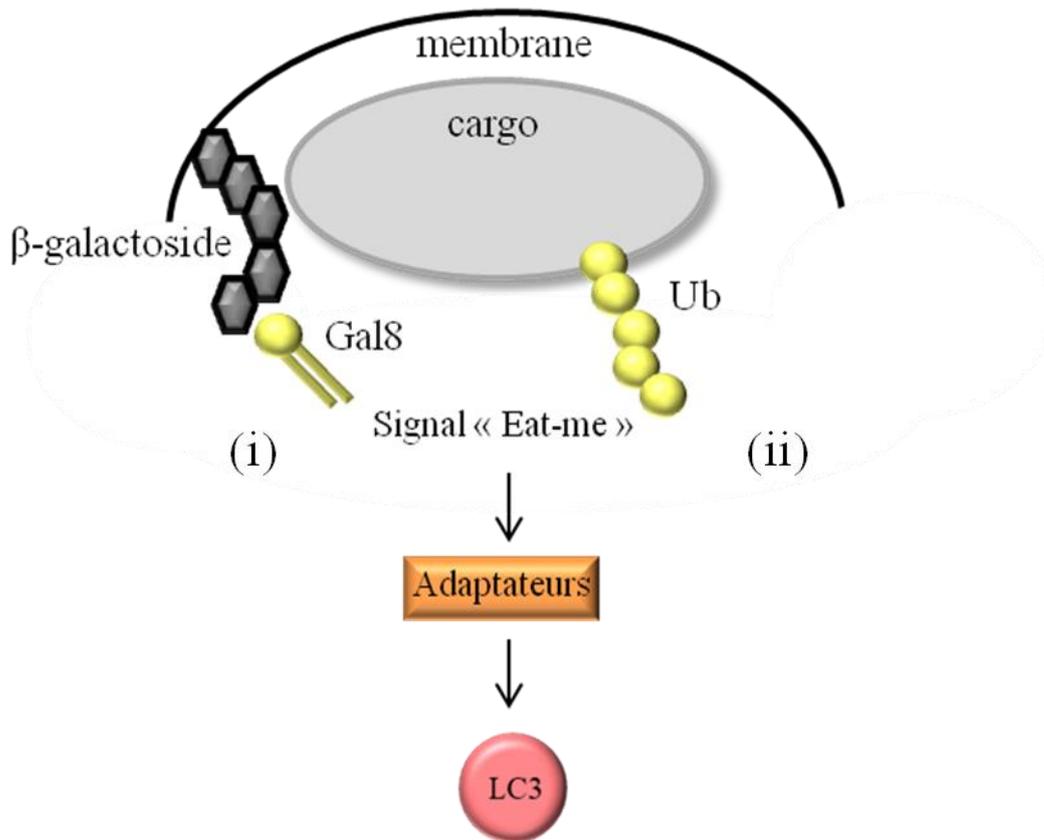
Le second signal « eat-me » est le recrutement des galectines (Gal). Les Gal sont des senseurs présents dans le cytosol qui détectent les  $\beta$ -galactosides (Varki et al., 1999). Ces sucres sont principalement présents dans les régions intra-luminales et sont donc normalement absents du cytosol (Randow and Youle, 2014). Or, le cycle infectieux de la plupart des pathogènes induit une étape de rupture membranaire afin d'atteindre le cytosol, ce qui entraîne l'exposition de ces galactosides (Dupont et al., 2009). Ils sont alors reconnus comme un signal de danger par les Gal1, Gal3, Gal8 et Gal9 (Thurston et al., 2012). A l'heure actuelle, seule la Gal8 a été impliquée dans l'activation de l'autophagie en réponse aux pathogènes bactériens (Thurston et al., 2012) et viraux (Montespan et al., 2017). L'implication des autres Gal dans ce processus reste à être déterminée (Boyle and Randow, 2013).

Ces deux signaux « eat-me » sont reconnus par les adaptateurs afin d'activer l'autophagie pour dégrader le cargo ainsi marqué.

### *2- Adaptateurs*

Différents adaptateurs sont ainsi décrits dans l'autophagie sélective et sont regroupés sous le terme SLR (Sequestosome Like Receptor), ils comprennent : p62 (aussi nommé sequestosome 1) et son paralogue NBR1, NDP52 et son paralogue Tax1BP1, et l'optineurine (Randow and Youle, 2014).

Tous ces adaptateurs contiennent un motif LIR (LC3 Interacting Region) qui permet de recruter tous les membres de la famille LC3 ainsi qu'un motif de liaison à l'ubiquitine (UBA) (Zaffagnini and Martens, 2016). Parmi ces adaptateurs, NDP52 fait figure d'exception car c'est le seul à présenter un motif de reconnaissance des galectines (Kim et al., 2013) (**Figure 12**).



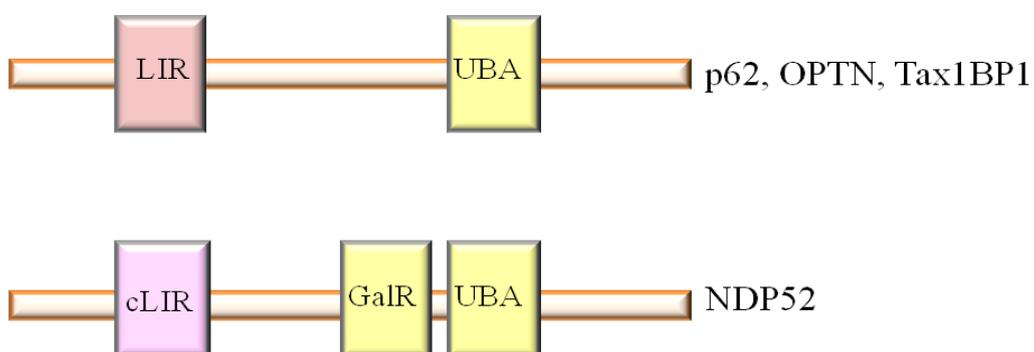
de

### Figure 11: L'autophagie sélective

Le cargo à dégrader est reconnu selon deux signaux, nommés signaux « eat-me » :

- (i) la rupture de membrane qui expose des  $\beta$ -galactosides, menant au recrutement de Gal8.
- (ii) l'ubiquitination du cargo

Ces signaux induisent le recrutement d'adaptateurs permettant l'interaction avec LC3.



### Figure 12: Les différents domaines des adaptateurs de l'autophagie sélective

Les adaptateurs présentent des motifs d'interactions avec LC3 (LIR), ainsi qu'un domaine d'interaction avec l'ubiquitine (UBA).

NDP52 a un LIR particulier (cLIR) qui lui permet d'interagir spécifiquement avec LC3-C. NDP52 possède également un domaine UBA et un domaine d'interaction avec Gal8 (GalR).

### p62 et NBR1

p62 est le premier adaptateur de l'autophagie identifié chez les mammifères et a d'abord été décrit pour son rôle dans la dégradation d'agrégats protéiques (Pankiv et al., 2007). Depuis, son rôle dans l'autophagie dirigée contre les pathogènes a été mis en évidence pour les bactéries (Zheng et al., 2009) et les virus (Sumpter and Levine, 2011). Le domaine UBA de p62 interagit préférentiellement avec les chaînes d'ubiquitine de type K63 (Gomes and Dikic, 2014) et son interaction avec l'ubiquitine est favorisée par sa phosphorylation (Pilli et al., 2012). En plus des domaines UBA et LIR conservés entre tous les adaptateurs, p62 présente des domaines permettant son interaction avec des partenaires cellulaires tels que TRAF6 ou les protéine kinase C atypiques, connectant p62 à l'activation de l'immunité innée et notamment celle du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Trocoli and Djavaheri-Mergny, 2011).

Quant à NBR1, son rôle dans l'autophagie dirigée contre les pathogènes est controversé. Ainsi, NBR1 est recruté lors d'infection par *Salmonella typhimurium* mais n'est pas indispensable pour l'activation de l'autophagie (Zheng et al., 2009). NBR1 peut interagir directement avec p62 (Lamark et al., 2003) et participe à la dégradation des agrégats protéiques (Odagiri et al., 2012) et des peroxysomes (Deosaran et al., 2013).

NBR1 et p62 sont eux même substrats de l'autophagie (Leyva-Paredes et al., 2016) et le niveau de p62 dans la cellule peut être suivi comme marqueur de la dégradation par autophagie (Klionsky et al., 2016).

### Optineurine (OPTN)

Cet adaptateur reconnaît spécifiquement l'ubiquitine et présente également une différence d'affinité pour l'ubiquitine en se liant aux chaînes de type K63 mais pas aux chaînes K48 (Gleason et al., 2011). Le rôle de l'OPTN dans l'autophagie sélective est notamment décrit dans le contexte de la dégradation de mitochondries (Wong and Holzbaur, 2014) mais il présente également une fonction dans la dégradation de bactéries (Wild et al., 2011). L'affinité de l'OPTN pour LC3 est faible mais elle est augmentée par sa phosphorylation (Wild et al., 2011). La kinase impliquée dans cette modification post-traductionnelle est TBK1, et le rôle de cette kinase sera détaillé plus tard dans ce chapitre.

### NDP52 et Tax1BP1

NDP52 est le seul adaptateur à reconnaître Gal8 et donc à répondre aux signaux de danger induits par les ruptures de membrane (Boyle and Randow, 2013). Cet adaptateur présente également un domaine d'interaction avec LC3 non canonique (cLIR) permettant son interaction spécifique avec la forme LC3-C (von Muhlinen et al., 2012) (**Figure 12**). NDP52 présente une fonction essentielle dans la dégradation de bactéries comme *Salmonella typhimurium*, notamment en recrutant la kinase TBK1 (Thurston et al., 2009) qui est nécessaire pour l'activation de l'autophagie en réponse à l'infection bactérienne.

Le rôle de Tax1BP1 dans l'activation de l'autophagie sélective est peu décrit et semble surtout impliqué dans les étapes de maturation de l'autophagosome. Ceci se fait par l'interaction de Tax1BP1 avec la myosine VI (Tumbarello et al., 2012). La myosine VI permet de lier les autophagosomes à la voie d'endocytose, via le système ESCRT, afin de favoriser leur fusion avec les lysosomes (Tumbarello et al., 2013). NDP52 et l'OPTN sont également décrits pour avoir cette fonction (Tumbarello et al., 2012). Cette étape est essentielle pour la maturation des autophagosomes et l'élimination de pathogènes dont *Salmonella typhimurium* (Verlhac et al., 2015 ; Tumbarello et al., 2015).

Tous ces adaptateurs en se liant spécifiquement aux signaux « eat-me » permettent de recruter LC3 et d'activer l'autophagie. Cependant les mécanismes par lesquels les adaptateurs transmettent le signal de dégradation aux facteurs de l'autophagie (ULK1, Beclin1) sont encore en cours d'étude notamment chez la levure (Vlahakis and Debnath, 2016).

### **B) Mécanismes d'activation de l'autophagie**

Afin d'activer l'autophagie ciblant spécifiquement le cargo, les adaptateurs recrutent les facteurs essentiels de l'autophagie au site de dégradation. Les adaptateurs p62, OPTN et NDP52 interagissent directement avec ATG5 et le recrutent au niveau du pathogène afin d'induire la lipodation de LC3 (Fracchiolla et al., 2016). Le mécanisme d'activation par l'OPTN a été décrit plus en détails. Cet adaptateur interagit avec ATG5 et avec le complexe ATG5/ATG12 (responsable de la lipodation de LC3) afin d'induire leur recrutement sur des structures positives pour WIPI2. La phosphorylation de l'OPTN ainsi que sa liaison à l'ubiquitine sont nécessaires pour assurer cette liaison entre complexe de lipodation et autophagosome (Bansal et al., 2018).

En parallèle, les Gal ont récemment été impliquées, indépendamment de leur liaison aux adaptateurs, dans l'activation de l'autophagie induite par les dommages membranaires (Jia et al., 2018). Ainsi, lors de dommage membranaire du lysosome, Gal8 est recruté et induit une relocalisation inhibitrice de mTOR du lysosome vers le cytoplasme. En parallèle, Gal9 interagit avec AMPK et l'active permettant ainsi d'activer ULK1 et de renforcer l'autophagie. Par leur localisation et leur action sur l'autophagie, les Gal peuvent ainsi détecter les dommages membranaires et induire une réponse adaptée.

### C) Implication des TRIM dans l'autophagie sélective

De nombreuses études décrivent actuellement l'implication des TRIM dans l'activation de l'autophagie sélective. Ainsi parmi 61 TRIM testés, l'expression de 31 TRIM induit l'activation de LC3, et certains de ces TRIM sont essentiels pour induire l'autophagie en réponse à différents virus. Lors d'infection par HSV-1, TRIM23 en coopération avec p62 recrute et active TBK1. Cette kinase en phosphorylant p62 augmente son affinité pour LC3 et favorise l'activation de l'autophagie (Sparrer et al., 2017).

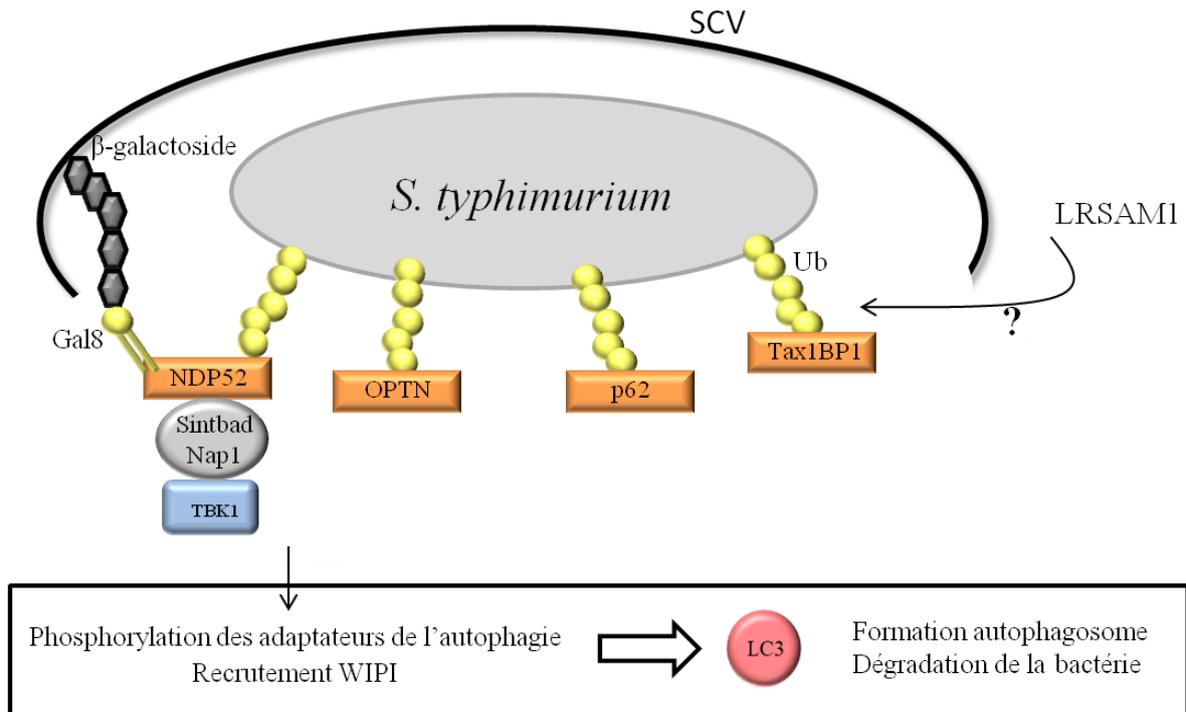
L'implication des TRIM dans l'autophagie sélective a également été mise en évidence pour TRIM16. Cette protéine interagit avec Gal3 sur les sites de dommage membranaire de façon dépendante d'ULK1 afin d'activer Beclin1 et induire la dégradation de *Mycobacterium tuberculosis* (Chauhan et al., 2016). Les TRIM sont donc des acteurs fondamentaux dans l'activation de l'autophagie de précision mais sont également impliqués dans l'autophagie sélective en favorisant l'activité des adaptateurs et des signaux « eat-me ».

### D) Fonctions de l'autophagie sélective contre les pathogènes

#### 1- L'autophagie sélective lors d'infections bactériennes

La première observation de l'autophagie antibactérienne fut décrite pour *Streptococcus pyogenes* dont la multiplication est favorisée dans des cellules déficientes pour ATG5 (Nakagawa et al., 2004). L'autophagie limite l'infection par de nombreuses bactéries telles que *Shigella flexneri* (Ogawa et al., 2005), *Listeria monocytogenes* (Py et al., 2007) ou encore *Mycobacterium tuberculosis* (Gutierrez et al., 2004).

Cependant, *Salmonella enterica* serovar *thyphimurium* est le modèle d'étude pour lequel l'autophagie a été le mieux détaillée (Wang et al., 2018) (**Figure 13**).



### Figure 13: L'autophagie sélective dirigée contre la Salmonelle

La bactérie est présente dans une vacuole (SCV) qu'elle rompt pour être libérée dans le cytosol. Deux signaux de danger sont ainsi induits :

- l'ubiquitine qui recrute les adaptateurs NDP52, Optineurine, p62 et Tax1BP1. LRSAM1 semble être l'ubiquitine ligase impliquée dans cette modification.
- les dommages membranaires qui induisent l'exposition de β-galactosides reconnus par Gal8 menant au recrutement de NDP52.

TBK1 est recruté par Sintbad et Nap1 qui interagissent avec NDP52, et TBK1 induit la phosphorylation des adaptateurs de l'autophagie, ce qui favorise le recrutement de LC3. TBK1 induit également le recrutement des protéines WIPI.

Ce système permet alors de former un autophagosome menant à la dégradation de la Salmonelle.

Lors de son entrée dans la cellule hôte, cette bactérie est localisée dans une vacuole nommée SCV (Salmonella Containing Vacuole). La multiplication de la salmonelle dans cette vacuole est dépendante du système de sécrétion de type 3 bactérien (T3SS) qui permet de délivrer des effecteurs bactériens dans le cytoplasme de l'hôte afin de le manipuler (Steele-Mortimer, 2008). Certaines bactéries induisent, par leur T3SS, des dommages membranaires au niveau de cette vacuole (Owen and Casanova, 2015). La bactérie est alors exposée dans le cytosol et est détectée par le système d'ubiquitination (Perrin et al., 2004), notamment par l'ubiquitine ligase LRSAM1 (Huett et al., 2012). Ces motifs ubiquitine sont reconnus par les adaptateurs OPTN, p62 et NDP52 qui sont ainsi recrutés via leur domaine UBA (Wild et al., 2011 ; Cemama et al., 2011).

Les dommages membranaires provoqués par le T3SS induisent un second signal « eat-me » en recrutant les Gal3, Gal8 et Gal9. Cependant, seule la Gal8 est impliquée dans la réponse autophagique et permet le recrutement spécifique de l'adaptateur NDP52 (Thurston et al., 2012) (**Figure 13**).

NDP52 interagit par la suite avec Sintbad et Nap1 qui sont des adaptateurs de TBK1 et permettent son recrutement. TBK1 est alors présent aux sites de dommage membranaire induits par la bactérie et peut induire la phosphorylation des différents adaptateurs afin de favoriser la dégradation du pathogène. En effet, comme détaillé précédemment, l'affinité de l'OPTN pour LC3 est faible et la phosphorylation de son domaine LIR par TBK1 (sur la sérine 177) permet alors d'augmenter cette affinité (Wild et al., 2011).

Les adaptateurs NDP52 et Tax1BP1 sont également phosphorylés par TBK1, mais le rôle de cette modification reste inconnu (Richter et al., 2016). L'adaptateur p62, quant à lui, est phosphorylé par TBK1 sur son domaine UBA (sérine 403), ce qui augmente son affinité pour les chaînes d'ubiquitine (Matsumoto et al., 2015).

En plus de favoriser le recrutement des adaptateurs, TBK1 permet également de diriger les protéines WIPI sur les membranes rompues, étape nécessaire pour l'élongation du phagosome (Thurston et al., 2016). En effet, la déplétion de TBK1 augmente fortement la survie de la bactérie. Le rôle essentiel de TBK1 dans l'autophagie a été décrit pour de nombreuses autres bactéries telles que *Listeria monocytogenes* (Mitchell et al., 2018) ou encore *Mycobacterium tuberculosis* (Pilli et al., 2012).

Au cours de leur cycle infectieux, les bactéries induisent d'autres perturbations de l'homéostasie cellulaire activant l'autophagie telles que la production de diacylglycérol (Shahnazari et al., 2010) ou la diminution du niveau d'acides aminés activant la voie mTOR (Tattoli et al., 2012), mais ces mécanismes d'activation indépendants des signaux « eat-me » ne seront pas détaillés.

## 2- *L'autophagie sélective dans les infections virales*

Le rôle de l'autophagie lors d'infections virales a été décrit pour la première fois pour le virus Sindbis, où la surexpression de Beclin1 dans les souris infectées diminue le titre viral, suggérant que Beclin1 est impliqué dans le contrôle du virus (Liang et al., 1998). Plus tard, il a été montré que la déplétion d'ATG5 favorise l'infectiosité de ce virus, indiquant un rôle essentiel de l'autophagie dans le contrôle de l'infection (Orvedahl et al., 2010).

L'activation de l'autophagie lors d'infections virales peut se faire dans un mécanisme impliquant ou non les signaux « eat-me » (**Figure 14**).

### Dépendant des signaux « eat-me »

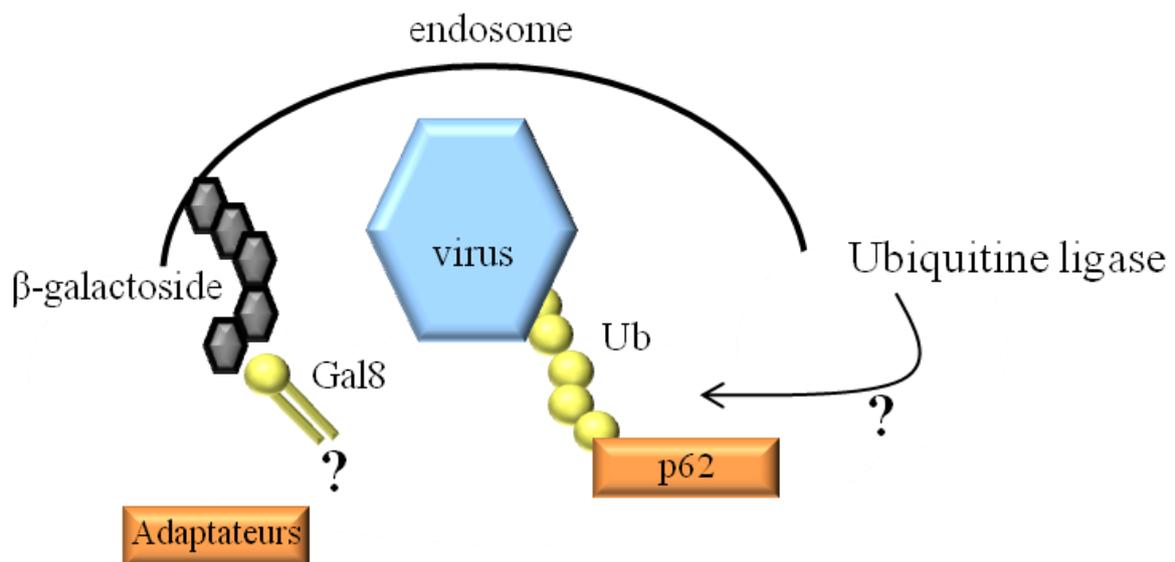
Dans le cas du virus Sindbis, sa capsid est la cible de l'ubiquitination (Orvedahl et al., 2011), ce qui permet le recrutement de p62 et induit la dégradation du virus (Orvedahl et al., 2010). Ce mécanisme de dégradation est également décrit dans le cas d'infection par le virus Chikungunya (Judith et al., 2013) ou encore le coxsackievirus (Mohamud et al., 2018), mais ni les enzymes responsables de l'ubiquitination, ni la cible de cette modification ne sont identifiées (Sparrer and Gack, 2018).

Les ruptures de membrane sont également un signal de danger impliqué dans l'activation de l'autophagie. Leur détection par Gal8 permet d'induire l'autophagie dirigée contre les Adénovirus (Montespan et al., 2017) et les Picornavirus (Staring et al., 2017) mais les mécanismes impliqués ne sont pas connus.

### Indépendant des signaux « eat-me »

D'autres mécanismes d'activation de l'autophagie indépendants des signaux « eat-me » sont également décrits lors d'infections virales. Ainsi, dans les cellules T CD4<sup>+</sup> infectées par le VIH, l'autophagie est activée ce qui induit la dégradation de la protéine transactivatrice Tat. Cette dégradation bien qu'impliquant p62 est indépendante de la reconnaissance de motifs ubiquitine (Sagnier et al., 2015).

Le virus de la rougeole, quant à lui, active l'autophagie en se liant à son récepteur CD46 (Joubert et al., 2009), ce qui provoque la formation du complexe Beclin1/VPS34 (Meiffren et al., 2010). Cependant, ce mécanisme est spécifique au virus de la rougeole atténué (vaccinal) et n'est pas engagé par le virus sauvage qui active l'autophagie plus tard au cours de l'infection.



**Figure 14: Signaux « eat-me » décrits pour l'autophagie antivirale**

Les virus, présents dans l'endosome, peuvent induire des ruptures membranaires exposant des β-galactosides. Ces signaux de danger sont reconnus par Gal8. Cependant le mécanisme par lequel ce signal induit l'autophagie dirigée contre le virus n'est pas connu, ni même les adaptateurs recrutés (s'il y en a).

D'une autre part, la capsid virale peut être ubiquitinée, mais l'ubiquitine ligase n'est pas identifiée, ce qui induit le recrutement de l'adaptateur p62 qui active l'autophagie.

## E) Contrôle de l'autophagie par les pathogènes

Si la xénophagie cible les pathogènes pour induire leur dégradation, ces derniers ont en contrepartie développé de nombreuses stratégies afin de la limiter, voire même de la détourner pour leur propre bénéfice.

### 1- Contremesures limitant l'autophagie

Les deux stratégies principales développées par les pathogènes sont soit de se « camoufler » afin d'empêcher leur détection, soit d'interférer directement avec l'activation de l'autophagie en inhibant ou dégradant les facteurs qui l'activent (Kwon and Song, 2018).

#### Protection vis-à-vis de la dégradation

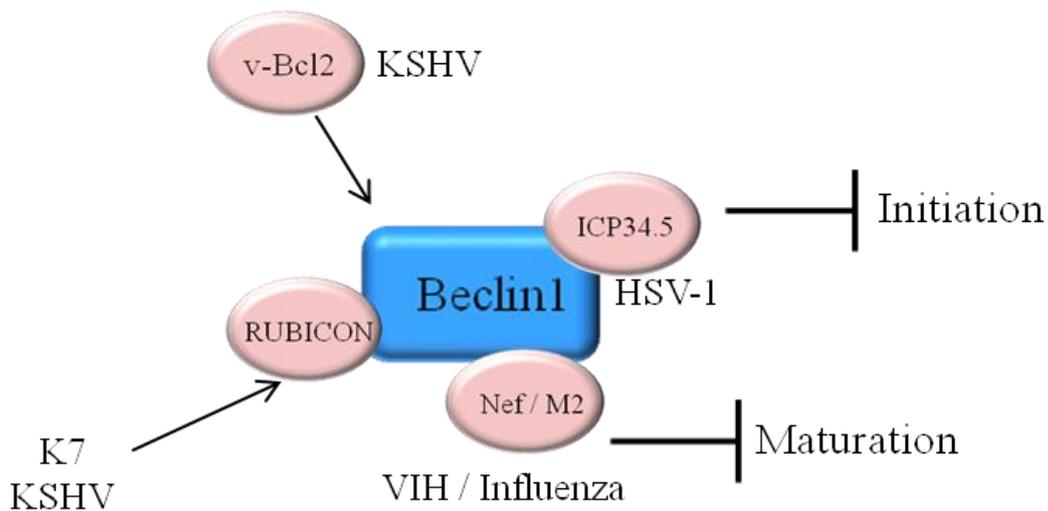
La première stratégie pour éviter la détection est de masquer les signaux d'activation. Par exemple, *Listeria monocytogenes* via sa protéine ActA favorise la formation d'une « cage d'actine » inhibant son ubiquitination, et sa détection par les adaptateurs de l'autophagie (Yoshikawa et al., 2009). *Shigella flexneri* elle, sécrète un effecteur IcSB qui se lie à la protéine bactérienne VirG, ce qui empêche son interaction avec ATG5 et donc protège la bactérie de la dégradation (Ogawa et al., 2005).

Une autre stratégie est de s'extraire efficacement de l'autophagosome avant sa fusion avec les lysosomes. Par exemple, les picornavirus induisent des ruptures de membrane reconnus par Gal8 et recrutent une phospholipase cellulaire, PLA2G16, qui favorise la libération du génome viral et donc empêche sa dégradation par autophagie (Staring et al., 2017). De même, l'AdV s'échappe de l'endosome détecté par Gal8 afin d'inhiber sa dégradation par autophagie (Montespan et al., 2017).

#### Inhibition de l'autophagie

Pour inhiber l'autophagie, le VIH-1 active mTOR dans les cellules dendritiques, ce qui inhibe l'activation de l'autophagie et permet au virus d'échapper à la dégradation par cette voie (Blanchet et al., 2010). La protéine K7 du KSHV induit également l'inhibition de l'autophagie, en favorisant l'interaction entre Beclin1 et son inhibiteur Rubicon, ce qui empêche alors la maturation des autophagosomes (Liang et al., 2013). Ce pathogène peut également coder pour des homologues viraux d'inhibiteurs de l'autophagie, comme un homologue de Bcl2, inhibiteur de Beclin1, permettant de séquestrer Beclin1 en dehors de l'autophagosome (Sinha et al., 2008).

Les pathogènes peuvent au contraire inhiber les activateurs de l'autophagie, comme KSHV qui code pour vFLIP qui interagit avec ATG3 afin d'empêcher l'activation de LC3 (Lee et al., 2009). La protéine ICP34.5, du HSV-1, interagit avec la protéine Beclin1 afin d'inhiber la formation des autophagosomes (Orvedahl et al., 2007). La protéine Nef du VIH (Kyei et al., 2009) et la protéine M2 du virus Influenza (Gannagé et al., 2009) se lient également à Beclin1 et inhibent la maturation des autophagosomes. La protéine Beclin1 est ainsi une cible commune des virus pour contourner les étapes d'initiation et de maturation de l'autophagie (**Figure 15**) (Münz, 2011).



**Figure 15: Beclin1, une cible de contremesure virale**

Beclin1 est ciblé par différents virus afin de limiter l'autophagie.

Le KSHV code pour des protéines similaires aux inhibiteurs (v-Bcl2) qui mène à l'inhibition du complexe. La protéine K7 du KSHV maintient l'interaction entre Beclin1 et son inhibiteur Rubicon.

Les protéines ICP34.5 du HSV-1, Nef du VIH et M2 de l'Influenza se lient à Beclin1 pour inhiber les étapes d'initiation et de maturation des autophagosomes.

Une autre stratégie développée par les pathogènes est d'induire la dégradation des facteurs de l'autophagie, comme *Legionella pneumophila* qui, via son effecteur RavZ, clive LC3, empêchant irréversiblement sa lipodation et donc son recrutement sur les membranes des autophagosomes (Choy et al., 2012). Le coxsackievirus B3, quant à lui, induit la dégradation de p62 par sa protéase 2C (Shi et al., 2013).

La stratégie d'inhibition la plus fréquente chez les pathogènes est d'interférer avec la fusion entre l'autophagosome et le lysosome. Les mécanismes restent peu connus mais semblent impliquer une inhibition des protéines de fusion telles que les SNARE (Casanova, 2017).

## 2- Détournement de l'autophagie

Au contraire, l'autophagie peut être provirale et favoriser la multiplication du pathogène et ce à différentes étapes de son cycle. Par exemple, les bactéries intracellulaires (*Salmonella*, *Mycobacterium*, *Legionella*, *Staphylococcus aureus* [Schnaith et al., 2007]) et les virus à ARN (HCV, Influenza virus, Picornavirus) utilisent l'autophagosome comme site de réplication. La protéine NS4B du HCV favorise l'expression de Rubicon afin d'inhiber la maturation des autophagosomes faisant ainsi de l'autophagosome un site privilégié pour la réplication (Wang et al., 2015). L'autophagie peut également être utilisée pour favoriser la sortie et la dissémination du pathogène. Les protéines 2BC et 3A du poliovirus activent directement l'autophagie, ce qui est nécessaire pour sa réplication mais également pour la libération des particules virales (Taylor and Kirkegaard, 2008). La protéine M2 du virus influenza interagit avec LC3 et le relocalise au niveau de la membrane plasmique pour son bourgeonnement (Beale et al., 2014).

Les pathogènes peuvent également indirectement favoriser leur multiplication en utilisant l'autophagie pour limiter l'activation de la réponse immunitaire innée. Par exemple, la protéine M45 du cytomégalovirus murin interagit avec la plateforme NEMO, nécessaire pour l'activation de NF- $\kappa$ B, et induit sa dégradation par autophagie (Fliss et al., 2012). Ainsi en activant l'autophagie pour dégrader des facteurs de l'immunité, les pathogènes limitent la production d'IFN, favorisant leur dissémination.

## CHAPITRE 3

### Réponse immunitaire et autophagie

L'autophagie est un ancien mécanisme de défense conservé chez les eucaryotes qui a évolué en parallèle avec l'immunité innée et adaptative (Deretic, 2011). Les signaux d'activation de ces voies de défense peuvent donc s'entrecroiser et coopérer pour favoriser l'élimination du pathogène. Le terme « immunophagie » est ainsi évoqué pour définir ces interactions entre l'autophagie et la réponse immunitaire (Deretic, 2006).

#### I- Interaction entre réponse immunitaire et autophagie

Plutôt que deux systèmes de défense séparés, l'autophagie et l'immunité innée sont deux réponses cellulaires qui collaborent face à l'infection. Ainsi, les adaptateurs de l'autophagie eux-mêmes sont reconnus comme faisant partie des PRR cellulaires activant l'immunité innée. Ces derniers sont nommés SLR (sequestosome-1 like receptor), en référence à p62 (aussi nommé sequestosome-1) (Deretic, 2006). Le rôle de ces SLR dans l'activation de la réponse immunitaire a été mis en évidence avec p62 qui présente un domaine d'interaction avec TRAF6 (Seibold and Ehrenschwender, 2015). TRAF6 est une ubiquitine ligase impliquée dans la cascade d'activation de NF- $\kappa$ B et permet à p62 d'activer ce facteur de transcription (Moscat and Diaz-Meco, 2009). Les adaptateurs peuvent donc être directement impliqués dans l'activation de la production de cytokines.

Les voies d'activation de la réponse immunitaire et de l'autophagie se croisent, par d'autres facteurs, menant soit à leur activation, soit à leur suppression. Ainsi, les PRR cellulaires tels que les TLR peuvent activer des facteurs impliqués dans l'activation de l'autophagie. De plus, l'autophagie en induisant la dégradation du pathogène favorise l'exposition de PAMP reconnus par les PRR cellulaires. Ces deux mécanismes s'activent donc mutuellement (Deretic et al., 2013).

Cependant, afin de limiter une réponse inflammatoire trop soutenue, l'autophagie exerce également un rétrocontrôle négatif, limitant l'activation de l'immunité innée (Gough, 2014).

Des exemples de ces interactions entre autophagie et immunité innée sont présentés dans la suite de ce chapitre, et ce pour deux voies d'activation distinctes : celle des TLR (**Figure 16**) et celle de la voie cGAS-STING (**Figure 17**).

## A) Modulation de l'activité des TLR par autophagie

### 1- Activation

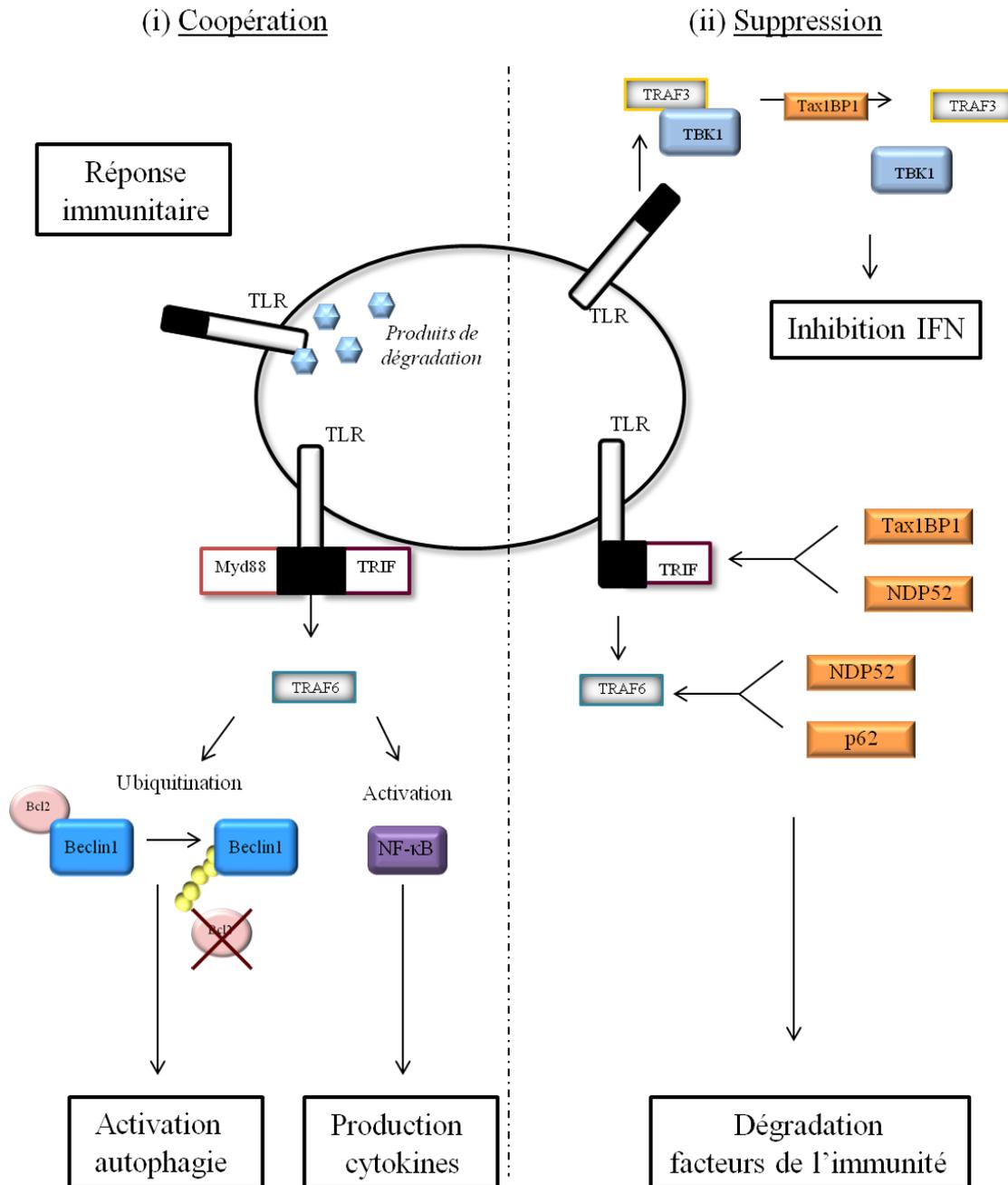
L'autophagie étant une voie de dégradation lysosomale, les produits de dégradation peuvent être exposés aux PRR cellulaires et être détectés comme des PAMP afin d'activer la réponse immunitaire (**Figure 16**). Différents exemples concernant les virus sont décrits dans la littérature, tels que l'exposition du génome viral du SeV au TLR7 qui dépend de l'autophagie (Lee et al., 2007), ou encore le rôle d'ATG5 dans la détection de HSV-1 par le TLR9 (Yordy et al., 2013).

De plus, de nombreux TLR sont décrits pour activer l'autophagie. Parmi eux, les TLR3, TLR4 et TLR7 dont l'activation induit le recrutement de LC3 (Delgado et al., 2008), mais également l'hétérodimère TLR1/2 après activation par les lipoprotéines des mycobactéries (Shin et al., 2010), ou encore le TLR4 quand il est activé par le LPS (Xu et al., 2007). Le mécanisme d'activation de l'autophagie par le TLR4 a été étudié en détails et implique Beclin1 (**Figure 16**). En effet, lorsque le TLR4 est activé, les adaptateurs Myd88 et TRIF sont recrutés, ainsi que l'ubiquitine ligase TRAF6 impliquée dans l'activation de NF- $\kappa$ B. TRAF6 permet également l'ubiquitination de Beclin1 (Shi and Kehrl, 2010). Cette modification empêche l'interaction de Beclin1 avec l'inhibiteur Bcl2, menant donc à son activation (Shi and Kehrl, 2008). Cette activation étant dépendante de l'ubiquitination, elle est contrée par la déubiquitinase cellulaire A20 (Shi and Kehrl, 2010).

### 2- Suppression

Les adaptateurs de l'autophagie sélective peuvent cependant être impliqués dans des mécanismes spécifiques de dégradation ou d'inhibition des facteurs de l'immunité (**Figure 16**). Tax1BP1 empêche l'interaction entre TBK1 et TRAF3 bloquant ainsi l'activation de TBK1 par cette ubiquitine ligase et donc l'expression d'IFN (Parvatiyar et al., 2010).

Tax1BP1 et NDP52 induisent la dégradation de l'adaptateur TRIF (Yang et al., 2017) (Inomata et al., 2012). NDP52 et p62 ciblent TRAF6 pour la dégradation par autophagie (Inomata et al., 2012 ; Kim and Ozato, 2009). Ainsi, plusieurs adaptateurs de l'autophagie ciblent différentes étapes des cascades d'activation afin de limiter efficacement la réponse immunitaire suite à l'infection par de nombreux pathogènes.



**Figure 16: L'autophagie et les TLR**

(i) Coopération.

L'autophagie induit la dégradation de pathogènes et expose les produits de dégradation aux TLR qui reconnaissent ainsi des PAMP activant la réponse immunitaire associée. L'autophagie peut également être directement activée par les cascades de signalisation des TLR. Par exemple, TRAF6 est impliqué dans la production de cytokines en activant le facteur de transcription NF-κB. Mais TRAF6 peut également favoriser l'activation de l'autophagie en induisant l'ubiquitination de Beclin1 ce qui empêche son interaction avec l'inhibiteur Bcl2.

(ii) Suppression

L'autophagie peut également limiter l'activation des voies de signalisation, soit en interférant avec les interactions, comme Tax1BP1 qui empêche l'interaction entre TRAF3 et TBK1, soit en induisant la dégradation des facteurs de l'immunité comme l'adaptateur TRIF ou TRAF6.

## B) Modulation de l'activité cGAS-STING par autophagie

### 1- Activation

En présence d'ADN cytoplasmique, la voie cGAS-STING est activée. Cette dernière induit l'autophagie qui provoque la dégradation de cet ADN étranger (**Figure 17**). Ceci a été démontré en détails lors d'infections par *M. tuberculosis*. Dans ce cas, l'ADN bactérien est détecté par cGAS ce qui induit l'activation de STING menant au recrutement des adaptateurs p62 et NDP52 (Watson et al., 2012). L'ADN bactérien colocalise alors avec LC3 et la kinase TBK1, activant sa dégradation par autophagie (Watson et al., 2015). La détection de l'ADN cytoplasmique lors d'infection par HSV-1 induit également l'activation de l'autophagie (Rasmussen et al., 2011).

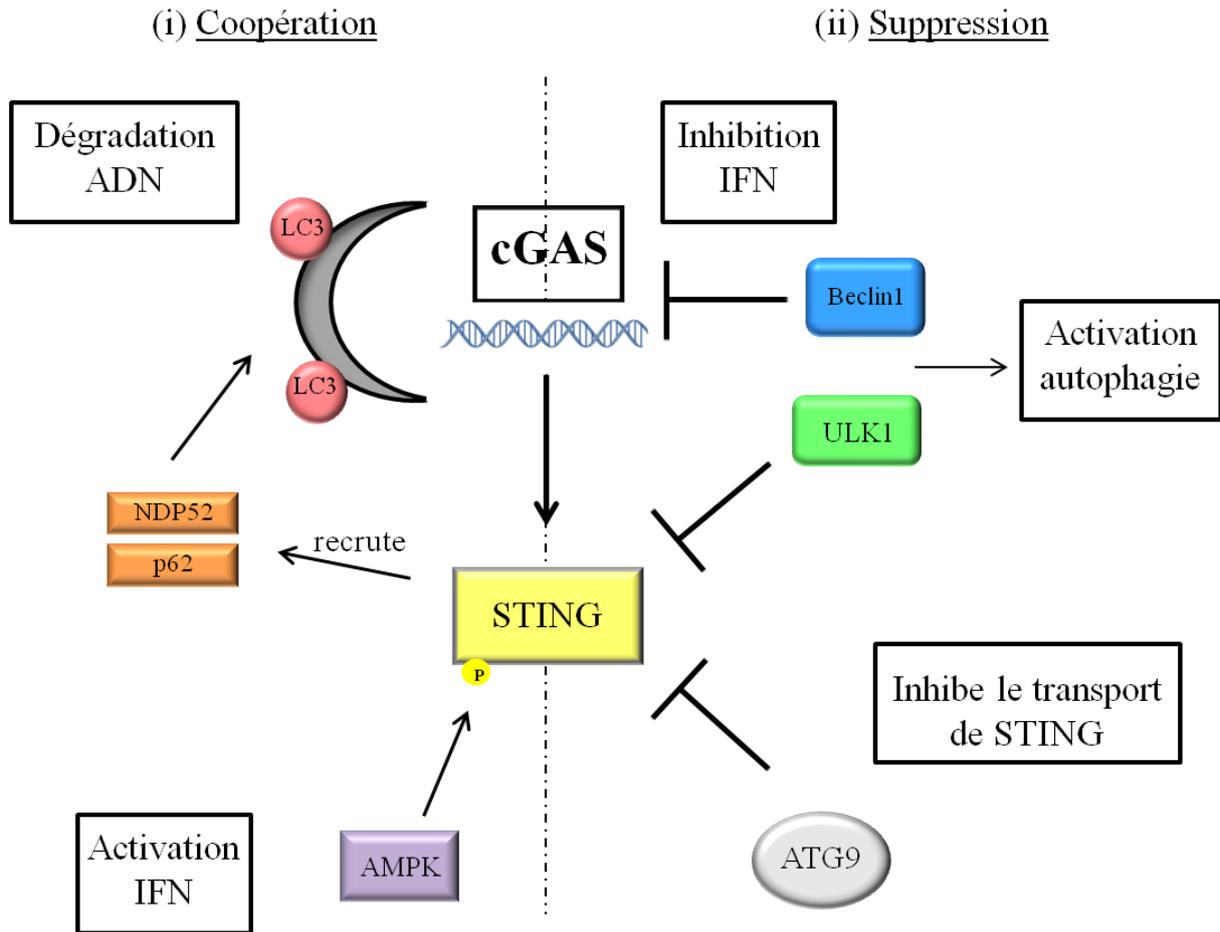
La kinase AMPK, quant à elle, favorise l'activation de STING en réponse à différents stimuli dont l'infection par le VSV (**Figure 17**). Ce mécanisme d'activation reste inconnu mais semblerait être dépendant d'un influx de calcium (Prantner et al., 2017).

### 2- Suppression

L'autophagie activée après détection de l'ADN étranger permet de le dégrader mais induit également un rétrocontrôle négatif afin de limiter l'activation des facteurs de la réponse IFN une fois le pathogène éliminé (Choi et al., 2018).

En effet, lors de l'infection par le HSV-1, Beclin1 se lie à cGAS et l'inhibe empêchant donc l'initiation de la réponse IFN (Liang et al., 2014). En parallèle, l'interaction de Beclin1 à cGAS entre en compétition avec sa liaison à Rubicon, inhibiteur de Beclin1, ce qui active l'autophagie afin d'induire la dégradation du pathogène (Liang et al., 2014). De même, cGAMP (produit par l'activation de cGAS) provoque l'activation d'ULK1 qui va induire des phosphorylations inhibitrices de STING induisant sa dégradation afin de limiter la réponse immunitaire en réponse à l'ADN étranger (Konno et al., 2013).

Ainsi, Beclin1 et ULK1 limitent la production d'IFN, et favorisent l'activation de l'autophagie (**Figure 17**).



**Figure 17: La voie cGAS-STING et l'autophagie**

cGAS reconnaît l'ADN étranger et active STING pour la production d'IFN.

(i) Coopération

L'activation de STING induit le recrutement des adaptateurs NDP52 et p62, qui en collaboration avec TBK1, induisent la dégradation de l'ADN étranger par autophagie.

STING peut également être directement activé par AMPK, ce qui favorise la production d'IFN.

(ii) Suppression

La reconnaissance de l'ADN étranger par cGAS peut être inhibée par Beclin1 qui va limiter l'activation de la production d'IFN, en faveur de celle de l'autophagie. De même pour ULK1 qui induit des phosphorylations inhibitrices de STING.

Le transport de STING du RE vers des structures cytoplasmiques est un prérequis pour son activation et est contrôlé par ATG9, qui, en limitant le transport de STING, limite son activation.

Une autre stratégie de contrôle de cette voie est d'interférer avec la translocation de STING du RE vers des structures cytoplasmiques, qui est un prérequis pour son activation. L'autophagie régule donc la localisation de STING *via* ATG9. En effet, sa déplétion induit l'accumulation de STING sur le Golgi ce qui favorise la production d'IFN. ATG9 en régulant la localisation de STING limite donc la réponse immunitaire (Saitoh et al., 2009).

Ces interactions croisées entre la réponse IFN et l'autophagie impliquent que des protéines soient activées par ces 2 voies et donc régulées par ces différents signaux, c'est le cas par exemple de TBK1.

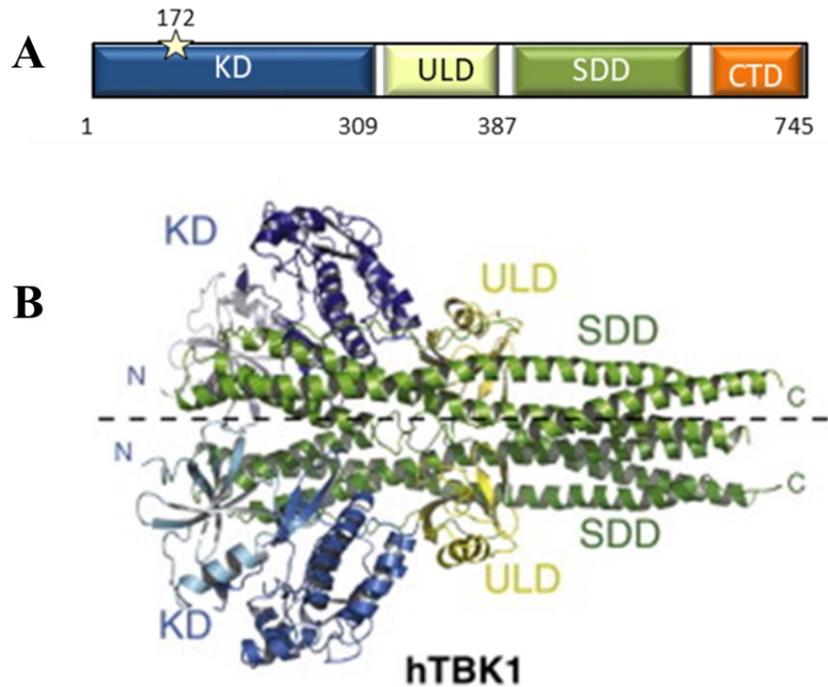
## II- TBK1 une kinase multifonctionnelle

### A) Généralités et mécanisme d'activation

TBK1 est une sérine thréonine kinase exprimée de façon constitutive dans tous les tissus (*Human Protein Atlas*). Cette kinase, aussi nommée NAK ou T2K, est composée de 4 domaines distincts (**Figure 18**) : un domaine catalytique (KD : kinase Domain), un domaine similaire à l'ubiquitine (ULD : Ubiquitin Like Domain), un domaine de dimérisation (SDD : Scaffold Dimerization Domain) et un domaine C-terminal impliqué dans les interactions entre protéines (Larabi et al., 2013).

TBK1 interagit par ce dernier domaine avec des adaptateurs ayant un rôle dans son activation. En effet, la délétion du domaine C-terminal inhibe l'activité catalytique de TBK1 (Goncalves et al., 2011). Différents adaptateurs sont ainsi décrits pour activer TBK1, tels que Sintbad (Ryzhakov and Randow, 2007), Nap1 (Fujita et al., 2003) et TANK (Pomerantz and Baltimore, 1999). Ces derniers présentent tous un domaine de liaison avec TBK1 (TBD : TBK1 Binding Domain) permettant l'interaction avec l'extrémité C-terminale de cette protéine (Goncalves et al., 2011). La liaison de ces adaptateurs à TBK1 étant mutuellement exclusive, ils sont impliqués dans différentes fonctions de la kinase (Helgason et al., 2013). Ainsi, la liaison de TBK1 à TANK est impliquée dans l'activation de la réponse IFN alors que la liaison de TBK1 à Sintbad et Nap1 est liée à l'autophagie.

Ces adaptateurs contrôlent l'activation de TBK1 en induisant son recrutement (Helgason et al., 2013). Cette activation de TBK1 se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord TBK1 est recruté par les adaptateurs sous forme de monomères qui se dimérisent lors du recrutement. Cette étape de dimérisation de TBK1 est nécessaire pour son activation et s'effectue sur le



**Figure 18: Domaines et structure de TBK1**

(A) TBK1 est composé de 4 domaines. En bleu, le domaine présentant l'activité kinase (KD : Kinase domaine) des résidus 1 à 309. En jaune, le domaine de liaison à l'ubiquitine (ULD : Ubiquitin Like domain) des résidus 309 à 387. En vert, le domaine de dimérisation (SDD : Scaffold dimerization domain) et en orange l'extrémité C-terminale (CTD : C-terminal domain).

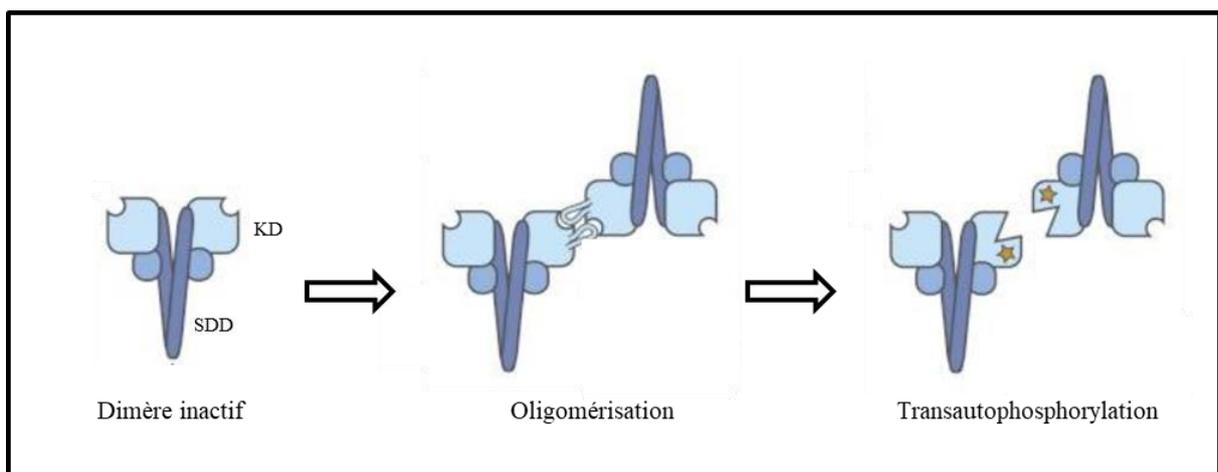
L'étoile représente le site de phosphorylation sur la sérine 172.

(B) Structure du dimère de TBK1 humain, (modifié d'après *Larabi, 2013*).

domaine SDD (**Figure 18**) (Larabi et al., 2013). Suite à ce recrutement, les domaines KD de différents TBK1 se retrouvent à proximité (**Figure 19**). TBK1 s'active alors par transautophosphorylation sur la sérine 172 (Ma et al., 2012). Ainsi, des mutations sur ce résidu impactent l'activation de TBK1. Par exemple, la substitution de la sérine par une alanine (S172A), résidu non phosphorylable abolit l'activité de TBK1 ; au contraire sa substitution par l'acide glutamique (S172E), mimant une phosphorylation constitutive restaure l'activité de la kinase (Kishore et al., 2002).

Des modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitination sont également impliquées dans l'activation de TBK1. Cette kinase est ubiquitinée sur les lysines 30 et 401 (Tu et al., 2013) et la présence d'une déubiquitinase cellulaire (CYLD) diminue l'activation de TBK1 (Friedman et al., 2008). Cependant, l'ubiquitine ligase responsable de cette modification n'est pas identifiée et plusieurs sont proposées comme TRAF3 (Oganesyan et al., 2006) ou encore MIB-1 (Li et al., 2011) et MIB-2 (Ye et al., 2014).

Des études récentes suggèrent que TBK1 pourrait également être activé par des kinases comme la tyrosine kinase Src (Li et al., 2017) ou encore AMPK et ULK1 (Zhao et al., 2018).



**Figure 19: Modèle d'activation de TBK1 par transautophosphorylation**

(Modifié d'après *Ma, 2012*)

TBK1 est présent sous forme de dimère inactif, relié par les domaines SDD. Le recrutement de TBK1 induit son oligomérisation, rapprochant alors différents domaines catalytiques (KD). TBK1 est alors activé par transautophosphorylation (représenté par une étoile) sur le résidu 172 de son domaine KD.

## B) TBK1 : immunité et autophagie

Les différents rôles de TBK1 déjà évoqués sont rappelés (**Figure 20**) et sont synthétisés brièvement dans les paragraphes suivants.

### 1- Rôle de TBK1 dans l'immunité innée

TBK1 est une kinase appartenant à la famille des IKK non canoniques, par opposition aux IKK canoniques (IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ ) qui activent la voie NF- $\kappa$ B (Häcker and Karin, 2006).

Le rôle de TBK1 dans l'activation de NF- $\kappa$ B a longtemps été sujet de débats (Abe and Barber, 2014), mais il semble que cette kinase soit principalement impliquée dans la cascade de signalisation menant à l'activation d'IRF3 (Fitzgerald et al., 2003). En effet, en absence de TBK1 (MEF TBK1 $^{-/-}$ ) l'activation d'IRF3 est totalement inhibée et par conséquent les IFN ne sont plus exprimés (McWhirter et al., 2004). TBK1 est donc une kinase clef dans la réponse IFN, et est activée par différentes voies comme par exemple les TLR3, TLR4, TLR9 (Perry et al., 2004 ; Chau et al., 2008 ; Clark et al., 2011), la voie cGAS-STING (Cai et al., 2014) et la voie RIG-1 (Loo and Gale, 2011).

### 2- Rôle de TBK1 dans l'autophagie

TBK1 est également impliquée dans l'activation de l'autophagie. Par exemple, lors d'infections par *Listeria monocytogenes*, sa déplétion restaure l'infectiosité de la bactérie qui n'est alors plus dégradée par autophagie (Mitchell et al., 2018).

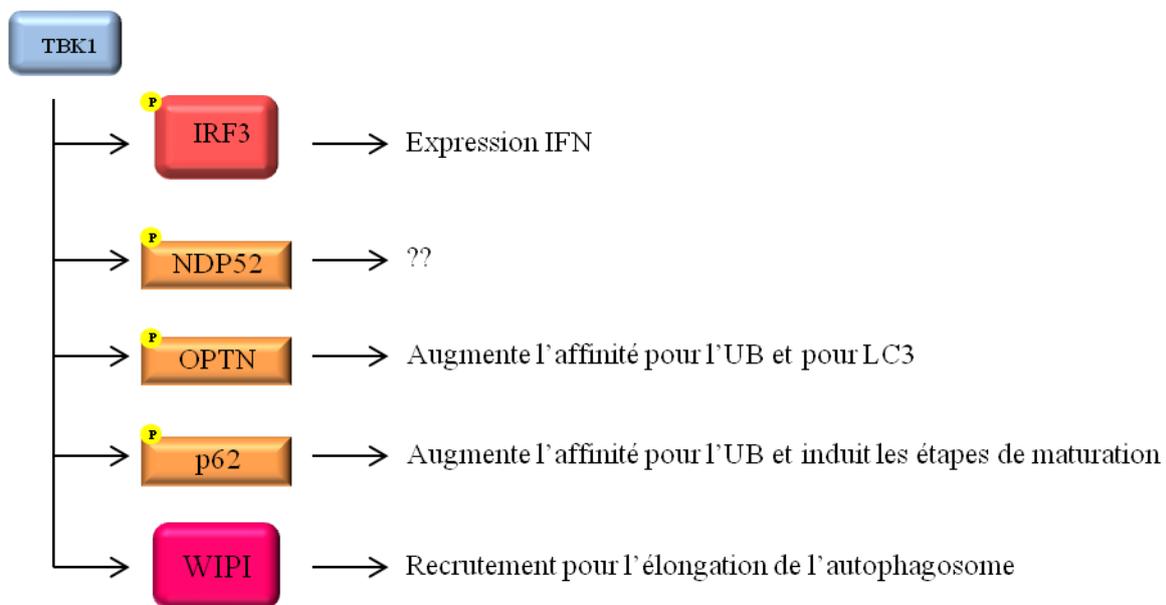
Mais, c'est avec le modèle *Salmonella typhimurium* que le rôle de TBK1 a été mis en évidence avec précision par l'équipe de Félix Randow (Thurston et al., 2009 ; Thurston et al., 2016).

Cette équipe a démontré le rôle des adaptateurs de l'autophagie dans le recrutement spécifique de TBK1 en utilisant un mutant de délétion du domaine C-terminal de TBK1, impliqué dans les interactions avec les adaptateurs. Ce mutant, n'étant plus recruté au site d'infection, est incapable de restreindre la multiplication de la bactérie. Ces données indiquent donc que le recrutement de TBK1 est essentiel pour induire la dégradation du pathogène par autophagie (Thurston et al., 2016). De même, un mutant sans activité catalytique (K38M) ne restreint plus la prolifération bactérienne. L'activité kinase de TBK1 est donc requise, en plus de sa localisation, pour contrôler l'infection par *Salmonella typhimurium* (Thurston et al., 2016). Cette activité kinase permet d'induire la phosphorylation des adaptateurs de l'autophagie (voir chapitre précédent) mais est également nécessaire pour le recrutement des protéines WIPI. Cependant, il reste à déterminer le mécanisme par lequel les protéines WIPI sont

recrutées (interaction directe avec TBK1 ?) et si elles constituent un substrat direct de la phosphorylation par TBK1 (Boyle et al., 2016).

Le rôle de TBK1 dans l'activation de l'autophagie dirigée contre des pathogènes a également été mis en évidence pour le virus HSV-1. Dans ce cas, TBK1 est recruté et activé par TRIM23 dont la présence est essentielle pour l'activation de l'autophagie. TRIM23 est recruté sur la membrane de l'autophagosome, de façon dépendante de son ubiquitination et interagit également avec p62. Ainsi, TBK1 une fois recruté et activé, induit la phosphorylation de p62 (Sparrer et al., 2017).

Le recrutement de TBK1 pour activer les adaptateurs est donc un mécanisme conservé dans la xénophagie afin de limiter efficacement l'infection par divers pathogènes.



### Figure 20: Rôles de TBK1

TBK1 induit la phosphorylation d'IRF3, ce qui est essentiel pour induire l'expression d'IFN.

TBK1 est également impliqué dans l'autophagie et induit la phosphorylation des adaptateurs NDP52, OPTN et p62 ce qui augmente leur affinité pour l'ubiquitine.

TBK1 induit également le recrutement des protéines WIPI impliquées dans l'élongation de l'autophagosome.

### 3- Implication de TBK1 dans les interactions entre immunité innée et autophagie

TBK1 en étant impliqué à la fois dans l'immunité innée et dans l'autophagie permet de faire la connexion entre ces 2 voies en interagissant avec les différents facteurs les activant (**Figure 21**).

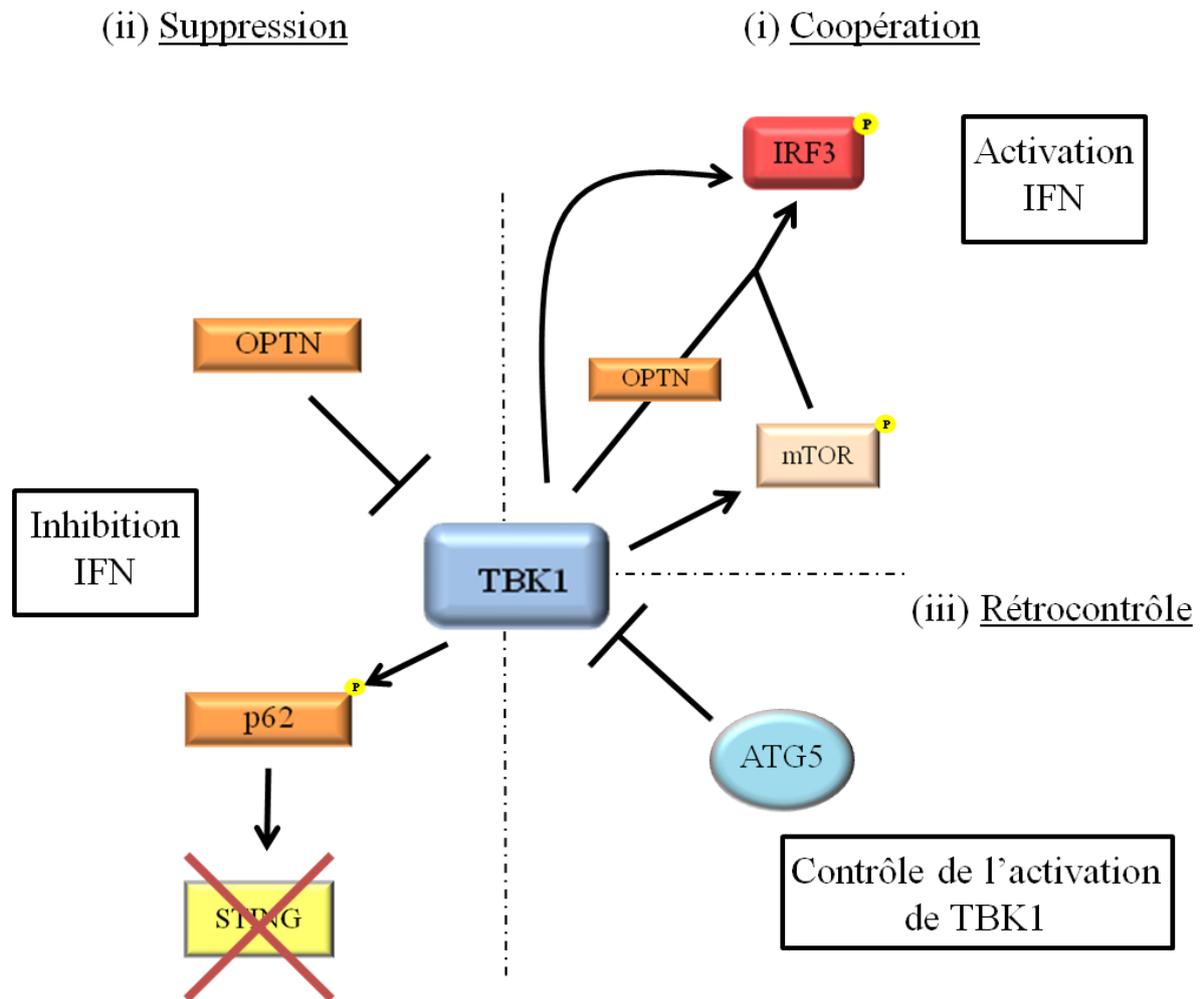
Par exemple, TBK1 induit la production d'IFN en interagissant directement avec l'OPTN. Il est ainsi suggéré, que l'OPTN détecte la forme ubiquitinée de TBK1 et induit son recrutement sur l'appareil de Golgi permettant alors son activation par transautophosphorylation (Pourcelot et al., 2016). En effet, l'activation de TBK1 est majoritairement dépendante de sa localisation et surtout de sa multimérisation (Ma et al., 2012). TBK1 ainsi recruté et activé par l'OPTN, induit la phosphorylation d'IRF3 et par conséquent l'expression d'IFN en réponse à la stimulation par l'ARN étranger (Pourcelot et al., 2016). Cependant le rôle activateur de l'OPTN est controversé. Des études suggèrent, au contraire que l'OPTN limite l'activation de TBK1 et agit donc plutôt comme régulateur négatif de cette kinase en l'associant avec des déubiquitinasés cellulaires (A20, CYLD) (Mankouri et al., 2010 ; Génin et al., 2015 ; Weil et al., 2016).

L'activation d'IFN par TBK1 pourrait également impliquer mTOR (**Figure 21**). En effet, récemment, il a été montré que TBK1 phosphoryle mTOR, en réponse à certains facteurs de croissance et à l'activation des PRR, notamment les TLR3 et TLR4 (Bodur et al., 2018). L'activation de mTOR induit alors la translocation nucléaire d'IRF3 et donc l'activation d'IFN.

Ces études suggèrent que TBK1, en plus de phosphoryler directement IRF3, semble utiliser des voies de signalisation dépendantes de l'autophagie pour renforcer cette activation.

TBK1 peut aussi exercer un contrôle négatif sur la production d'IFN en utilisant l'autophagie pour limiter l'activation des voies de signalisation (**Figure 21**). Par exemple, TBK1 induit la phosphorylation de p62 qui, une fois activé, est responsable de la dégradation de STING (Prabakaran et al., 2018).

De plus, TBK1 et l'autophagie se contrôlent mutuellement par un mécanisme de rétrocontrôle négatif (Yang et al., 2016). Il a ainsi été démontré que, dans des conditions d'inhibition fonctionnelle de TBK1, l'autophagie est limitée. De la même façon, la déplétion d'ATG5 augmente la phosphorylation de TBK1. Cette étude suggère que TBK1 est nécessaire à l'activation de l'autophagie, et que l'autophagie limite l'activation de TBK1. Ce contrôle



**Figure 21: TBK1, une kinase clef connectant l'immunité innée et l'autophagie**

(i) Coopération

TBK1 induit directement la phosphorylation d'IRF3 pour activer l'expression d'IFN. Cette activation peut aussi se faire via des facteurs de l'autophagie dont l'OPTN et mTOR.

(ii) Suppression

L'OPTN peut également être impliqué dans la dégradation de TBK1, limitant alors la production d'IFN. De même pour STING qui est dégradé par autophagie, suite à sa détection par p62 lui-même activé par TBK1.

(iii) Rétrocontrôle

L'activation de TBK1 est contrôlée par l'autophagie qui limite sa phosphorylation. Et l'activation de TBK1 est nécessaire pour l'activation de l'autophagie.

coopératif permet de limiter l'activation excessive de la réponse immunitaire et l'activation de l'autophagie.

Par son rôle dans l'autophagie mais également dans la production d'IFN, TBK1 est donc une kinase clef limitant efficacement l'infection par divers pathogènes (bactéries, virus...). Elle est également impliquée dans un mécanisme de contrôle de la réponse inflammatoire, nécessaire pour limiter l'activation de ces réponses. Les études sur cette kinase permettent donc de mieux comprendre les interactions croisées entre activation de la réponse immunitaire innée et l'autophagie, nécessaire pour limiter efficacement l'infection.

Le rôle de TBK1 dans l'autophagie induite lors d'infections bactériennes a été étudié en détails, mais il reste peu décrit dans le cas d'infection virale. Or, l'Adénovirus a été récemment décrit pour induire l'autophagie (Montespan et al., 2017) dans un mécanisme présentant des similitudes avec la Salmonelle et a constitué le modèle viral de ce travail pour, notamment, étudier l'activation de TBK1 dans l'autophagie antivirale.



## CHAPITRE 4

### Les Adénovirus

#### I- Généralités

##### A) Histoire

En 1953, un agent pathogène nommé AD (Adenoid Degenerating agent) est isolé à partir d'adénoïdes d'enfants atteints d'infections respiratoires (Rowe et al., 1953). Au même moment, un virus nommé RI-67 (Respiratory Illness agent) est retrouvé dans des sécrétions respiratoires de recrues de l'armée américaine (Hilleman and Werner, 1954). Ces deux virus isolés de façon indépendante appartiennent à la même famille et c'est en 1956 que le terme « Adénovirus » (AdV) a été universellement utilisé pour nommer cet agent pathogène, en référence aux glandes adénoïdes (Enders et al., 1956).

L'AdV constitue un des modèles d'étude pour les virus à ADN mais permet également d'identifier et de décrire des processus cellulaires. C'est d'ailleurs l'étude du génome de l'AdV qui a permis en 1977 de mettre en évidence le mécanisme d'épissage de l'ARNm cellulaire (Berget et al., 1977 ; Chow et al., 1977), Philip A Sharp et Richard J Roberts sont récompensés du prix Nobel en 1993 pour ces travaux. Les recherches sur l'AdV ont également été relancées par le développement de la thérapie génique basée sur l'utilisation de ces virus comme vecteur de gènes.

##### B) Classification

Les AdV appartiennent à la famille des *Adenoviridae* qui est divisée en 5 genres selon les espèces infectées par le virus et la séquence des protéines virales hexon et protéase (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses) : les *Aviadenovirus*, les *Atadenovirus*, les *Siadenovirus*, les *Ichtyadenovirus* et les *Mastadenovirus*. Ce dernier genre regroupe les virus infectant l'Homme qui sont divisés en 7 espèces classées de A à G (**Tableau 3**). Chaque espèce contient différents types, plus de 60 au total sont décrits chez l'Homme (Kremer and Nemerow, 2015). Cette classification est effectuée en fonction de la séquence de la région E3, de la capacité d'hémagglutination et du pouvoir oncogène chez les rongeurs. En effet, le type 12 de l'AdV a été décrit comme oncogène chez les hamsters nouveaux nés (Trentin et al., 1962). Cependant, cet effet n'a pas été démontré chez l'Homme, pour qui l'AdV ne semble donc pas oncogène (Mackey et al., 1976 ; Green et al., 1979).

Les types infectant l'Homme sont décrits dans le **tableau 3**, qui indique le récepteur utilisé pour la reconnaissance entre le virus et la cellule hôte, ce qui influence le tropisme du virus et la pathologie associée (Cupelli and Stehle, 2011).

Espèce	Type	Tropisme	Récepteur	Commentaire
A	12, 18 et 31	Intestinal	CAR	Oncogène chez les hamsters
B	<b>B1</b> : 3, 7, 16, 21 et 50 <b>B2</b> : 11, 14, 34 et 35	Respiratoire et oculaire	CD46 / DSG-2	B2 tropisme rénal à risque pour immunodéprimés
C	2, 5, 1 et 6	Respiratoire	CAR	AdV2 et AdV5 les plus étudiés
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49	Oculaire et intestinal	CAR	8, 19 et 37 se lient aux acides sialiques
E	4	Respiratoire et oculaire	CAR	Fortement pathogène Recombinaison des espèces B et C
F	40, 41	Intestinal	CAR	2 tailles de fibre sur le même virion
G	52	Intestinal	CAR / acide sialique	Récepteur récemment identifié (Lenman et al., 2015)

**Tableau 3 : Classification des AdV**

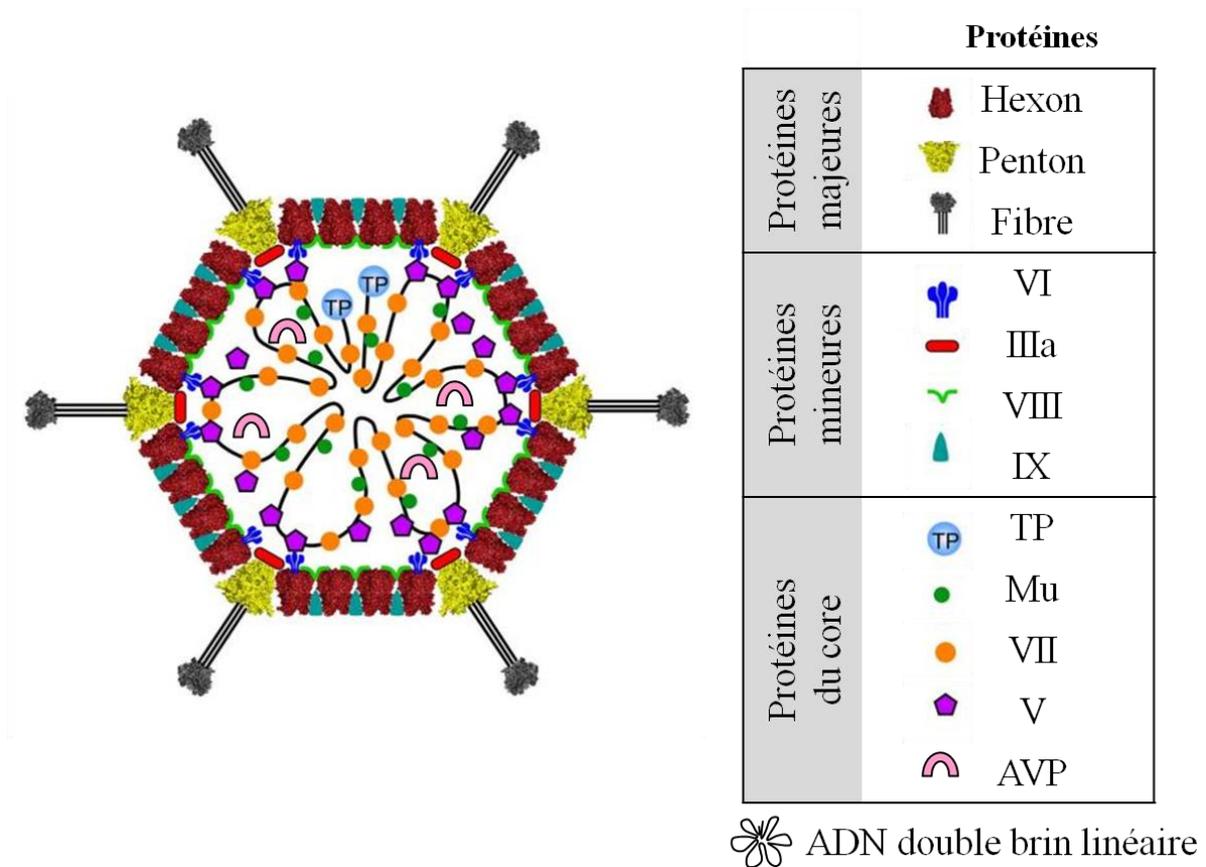
## II- Structure

Les AdV appartenant à l'espèce C sont les plus étudiés en recherche fondamentale, et constituent donc le modèle utilisé comme référence pour la suite des descriptions.

L'AdV se présente sous la forme d'une capsidie icosaédrique de 90 nm présentant 20 faces triangulaires et 12 sommets. Elle enferme un génome viral constitué d'un ADN double brin linéaire de 36 kpb (El Bakkouri et al., 2008). C'est en 1991 que la première structure du virus a été décrite avec une résolution de 35 Å (Stewart et al., 1991). Depuis, l'amélioration des techniques de microscopie a permis d'obtenir la structure du virus par cristallographie aux rayons X à 3,5 Å (Reddy et al., 2010) et par cryo-microscopie électronique (Cryo-EM) à 3,6 Å (Liu et al., 2010).

Le génome de l'AdV code pour 45 protéines (Cusack, 2005) dont 13 sont des protéines de structure. Ces dernières sont nommées en fonction de leur profil de migration sur gel d'acrylamide dénaturant et réducteur (SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) (Maizel et al., 1968).

Elles sont divisées en protéines majeures qui forment la capside, en protéines mineures qui ont principalement une fonction stabilisatrice de la capside et en protéines core (ou de cœur) associées à l'ADN viral (**Figure 22**).



**Figure 22: Représentation schématique de l'AdV**

(Modifié d'après Nemerow, 2008)

La capside est composée de protéines mineures, majeures et de core, listées dans le tableau. Cette capside contient un ADN double brin linéaire de 36 kpb.

### A) Protéines majeures

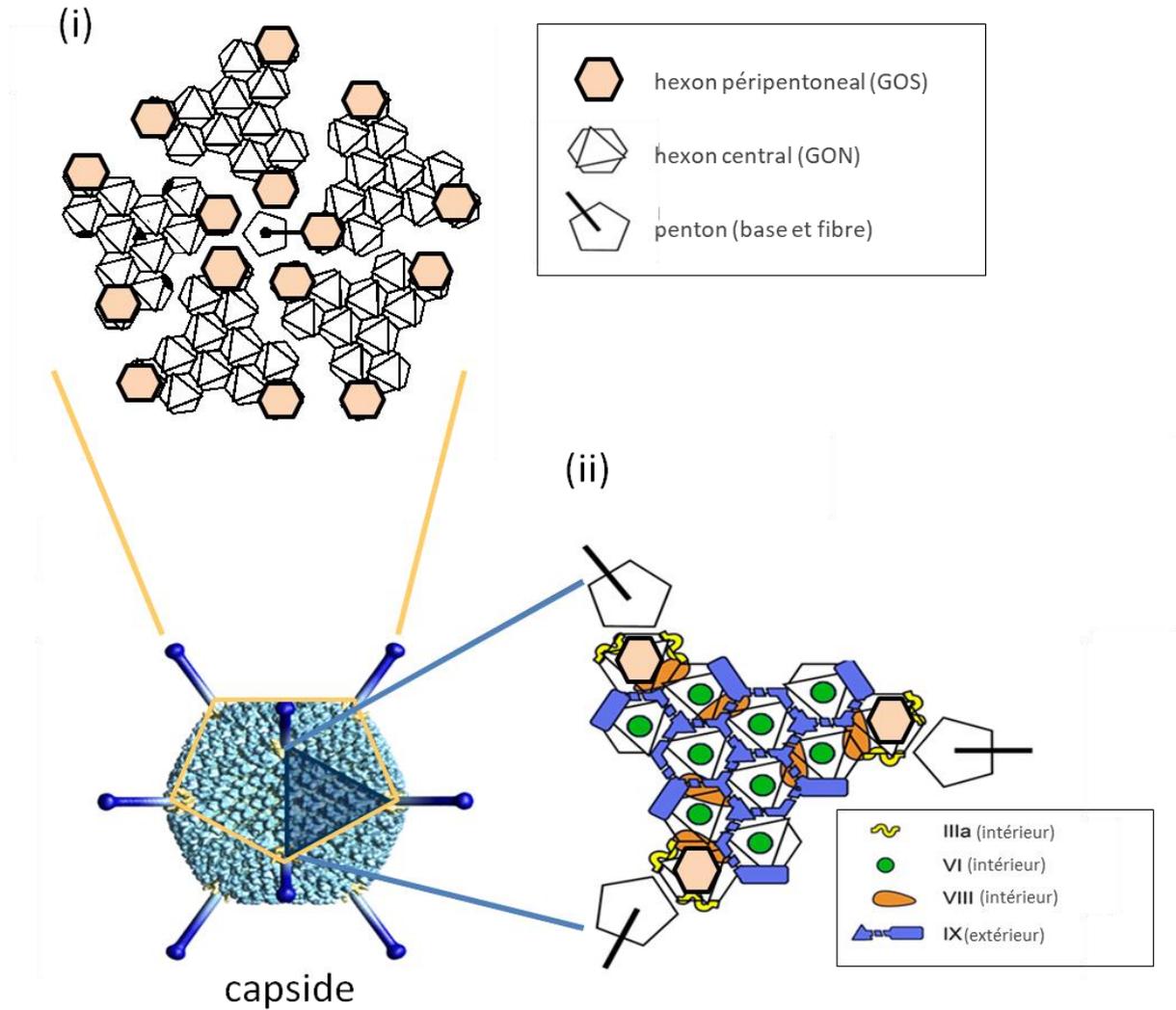
Trois protéines majeures composent la capsid. La principale est la protéine hexon (ou protéine II). Cette protéine est présente en 720 copies qui s'associent en trimères pour former la structure de base de la capsid. Les hexons sont soit organisés en groupes de 9, composant les motifs GON (Group Of Nine) retrouvés sur les 20 faces triangulaires (**Figure 23B**), ou soit regroupés autour d'une protéine penton, formant ainsi un GOS (Group of Six) situé sur les 12 sommets de la capsid (**Figure 23A**). Les hexons composants ces différents groupes sont nommés respectivement hexon central et hexon péripentonal (San Martín, 2012). L'AdV possède ainsi un nombre de triangulation pseudo T25.

Les sommets de la capsid sont composés d'une base de protéines pentons (protéine III), associées en pentamère, sur laquelle reposent les spicules ou fibres du virus.

La fibre (ou protéine IV) est retrouvée sous forme de trimères à chacun des 12 sommets. Cette protéine est constituée de 3 domaines :

- la tête exposant une extrémité globulaire, responsable de la première interaction avec la cellule hôte, et une région dont la flexibilité varie en fonction des types. Cette flexibilité favorise les interactions entre le virus et la cellule hôte (Wu et al., 2003).
- une tige rigide constituée d'un motif de 15 acides aminés dont le nombre de répétition varie en fonction du type, modifiant la taille de la fibre. Ainsi, l'AdV2 présente une fibre de 37 nm (22 répétitions), par comparaison avec l'AdV bovin de type 3 qui présente la plus longue fibre avec 77,2 nm (Ruigrok et al., 1990 ; Chroboczek et al., 1995).
- la queue N-terminale permettant une liaison hydrophobe avec le penton et son maintien au sommet de la particule virale.

Au sommet de la capsid, la protéine penton est impliquée dans l'internalisation du virus. Sa structure est stabilisée par des interactions hydrophobes au sein du pentamère. On estime ainsi que 26 % de la surface de chaque monomère sont enfouis dans le pentamère (El Bakkouri et al., 2008). Cependant, cette protéine est sensible au changement de pH, de température et au traitement à la trypsine (Russell, 2009), c'est pourquoi la structure est stabilisée grâce aux protéines mineures (Reddy and Nemerow, 2014)



**Figure 23: Structure de l'AdV**  
(modifié d'après San Martin, 2012).

(i) La capside est composée de GOS où le penton (représenté avec la fibre) est indiqué au centre, encadré par 5 hexons, nommés hexons péripentoneaux (en rose). La capside est également composée de GON formés de 9 hexons centraux (en blanc). Ces hexons sont encadrés par l'hexon péripentoneal formant le GOS (en rose). (ii) La protéine externe IX, ainsi que les protéines internes VI, VIII et IIIa sont également représentées sur une face de la capside.

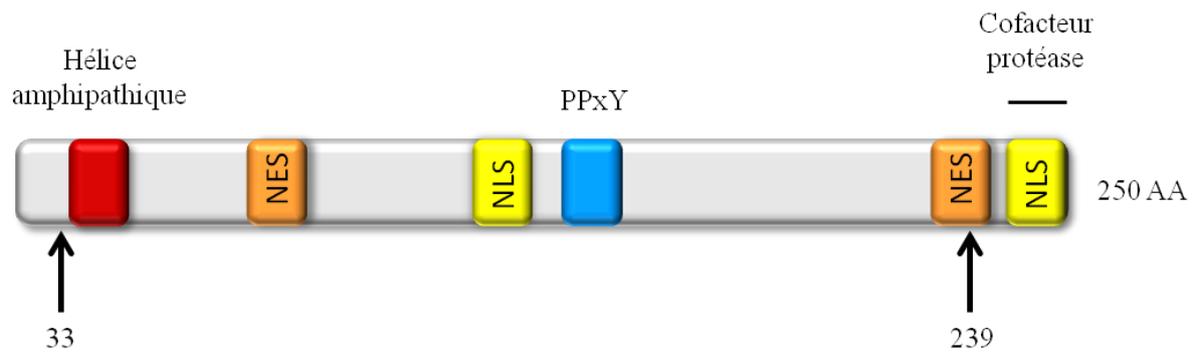
## B) Protéines mineures

La protéine IIIa présente en 60 copies est organisée en pentamères qui forment un anneau en dessous du penton. Son rôle est de stabiliser les interactions entre les hexons péripentonéaux et le penton (GOS). En liant sa partie N-terminale aux hexons, IIIa stabilise les sommets de la capsid (San Martín et al., 2008).

Les GON sont quant à eux stabilisés par la protéine IX (Furcinitti et al., 1989). Cette protéine, qui constitue le ciment principal de la capsid, est unique au genre des *Mastadenovirus* et c'est la seule protéine mineure à être exposée à l'extérieur de la capsid. L'incorporation de cette protéine dans la capsid est coopérative, c'est-à-dire que le virus possède soit toutes les 240 copies de la protéine, soit aucune (Scheres et al., 2005). Cette protéine étant facultative pour l'assemblage, il est possible de produire des virus sans protéine IX (Colby and Shenk, 1981). Une étude à partir des virus délétés pour la protéine IX a montré que cette protéine est impliquée dans le tropisme cellulaire du virus et la régulation de la réponse immunitaire (de Vrij et al., 2011).

Les protéines IIIa et IX, sont elles-mêmes stabilisées par la protéine VIII qui les lient respectivement aux GOS et aux GON (San Martín, 2012).

Finalement, la protéine VI présente une fonction stabilisatrice de l'hexon, bien que sa localisation dans la capsid ne soit pas définie avec précision. La protéine VI est présente en 360 copies qui semblent être disposées de façon hétérogène dans la capsid (San Martín, 2012). En plus de sa fonction stabilisatrice, cette protéine contient plusieurs domaines fonctionnels (**Figure 24**), dont le rôle sera détaillé dans le cycle viral. Brièvement, cette protéine est clivée par la protéase virale et la partie C-terminale clivée permet d'activer la protéase du virus (Mangel et al., 1993). Cette protéine présente en N-terminal une hélice amphipathique et un motif PPxY (où x représente n'importe quel acide aminé) permettant respectivement l'échappement endosomal (Wiethoff et al., 2005) et le transport du virus vers le noyau (Wodrich et al., 2010). Elle présente aussi des séquences d'import (NLS) et d'export (NES) nucléaires qui ont un rôle dans l'assemblage du virus (Wodrich et al., 2003).



**Figure 24: Les différents domaines de la protéine VI de l'AdV**

(modifié d'après San Martin, 2012)

La protéine VI de l'AdV compte 250 acides aminés. Elle contient des NES (orange) et NLS (jaune), une hélice amphipathique (rouge) et un motif PPxY (bleu). Les flèches représentent les sites de clivage de la protéine VI par la protéase virale.

### C) Protéines core

Les protéines composant le core sont liées à l'ADN viral et sont impliquées dans la structure de la capsid, mais également dans la protection du génome.

La protéine V permet de maintenir l'ADN dans la capsid en interagissant d'une part avec la protéine VI liée à la capsid (Russell, 2009) et d'une autre part avec la protéine VII liée à l'ADN (Chatterjee et al., 1985). La protéine V est également décrite pour lier l'ADN de façon indépendante de la séquence (Pérez-Vargas et al., 2014). Cette protéine est unique au genre des *Mastadenovirus* (Gorman et al., 2005) et présente des redondances de fonction avec la protéine Mu (Ugai et al., 2007).

Cette dernière également nommée protéine X, permet sous sa forme de précurseur, de compacter le génome viral (Anderson et al., 1989) et, une fois clivée par la protéase virale, aide à la libération du génome viral (Pérez-Berná et al., 2009).

L'ADN est compacté majoritairement par la protéine VII (Russell and Precious, 1982). Cette protéine fortement basique recouvre entièrement l'ADN viral et forme des structures similaires aux histones cellulaires (Sung et al., 1983). Cette protéine joue également un rôle dans la protection du génome, empêchant sa détection par le système immunitaire (Karen and Hearing, 2011). La protéine VII est la protéine liée au génome viral la plus abondante. Elle est utilisée pour détecter le génome viral par immunofluorescence une fois ce dernier libéré dans le noyau (Komatsu et al., 2015).

Les extrémités 5' de l'ADN viral sont associées de façon covalente à la protéine TP qui protège le génome viral mais qui sert également d'amorce pour initier la réplication de l'ADN au cours du cycle viral (de Jong et al., 2003)

Finalement, la protéine IVa2 se lie aussi à l'ADN (Russell and Precious, 1982). Elle joue un rôle dans l'encapsidation du génome viral et dans la régulation de la transcription des protéines tardives (Pardo-Mateos and Young, 2004).

### D) Maturation de la capsid

La plupart des protéines de la capsid sont produites sous forme de précurseurs. Ainsi, les protéines IIIa, VI, VII, VIII, IX, TP et Mu sont clivées par la protéase virale présente dans la capsid (San Martín, 2012).

Cette protéase utilise l'ADN comme cofacteur qu'elle va lier de façon non spécifique (Gupta et al., 2004) afin de cliver dans un premier temps le précurseur de la protéine VI (McGrath et al., 2003). La partie C-terminale de la protéine VI sert par la suite de cofacteur pour

augmenter l'efficacité de l'enzyme et cliver les autres précurseurs viraux. La protéase virale pourrait également cibler des protéines cellulaires telles que l'actine qui est alors clivée pour favoriser la lyse cellulaire et la libération des particules virales (Mangel et al., 2003).

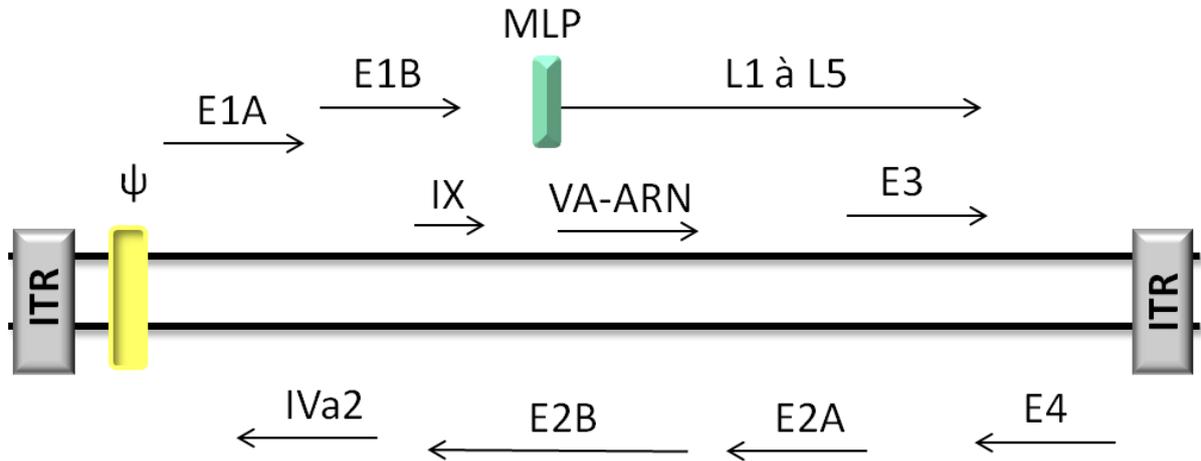
Cette étape de maturation des précurseurs viraux est indispensable à l'infectiosité du virus et permet de former des particules matures (Cotten and Weber, 1995 et Pérez-Berná et al., 2009). Le rôle de la protéase a été identifié grâce à l'étude d'un mutant thermosensible de l'AdV de type 2 (Proline 137 – Leucine 137), nommé Ts1, qui présente un défaut d'encapsidation de la protéase à la température non permissive de 39°C (Weber, 1976). Ce mutant n'a donc pas la capacité de cliver les précurseurs des protéines virales et présente une capsid immature (non clivée) plus stable (San Martín, 2012) mais n'est pas infectieux (Cotten and Weber, 1995). De façon intéressante, ce virus immature, bien qu'internalisé dans la cellule hôte, n'est pas capable de s'échapper de l'endosome (Greber et al., 1996) et est dégradé par les lysosomes (Martinez et al., 2015).

### **E) Structure du génome**

Le génome de l'AdV est un ADN linéaire double brin de 36 kpb présentant à chaque extrémité des séquences terminales répétées inversées (ITR) de 100 nucléotides, comprenant l'origine de réplication du génome. Une séquence d'encapsidation ( $\psi$ ) est également présente sur le génome viral (Harrach, 2014). Le génome contient des gènes précoces (E, early) et des gènes tardifs (L, late), selon s'ils sont exprimés avant ou après la réplication du génome viral (**Figure 25**).

Il y a ainsi 5 unités de transcription (E1A, E1B, E2, E3 et E4) pour les gènes précoces, chacun ayant leur propre promoteur. La transcription commence avec l'expression du gène E1A qui présente un promoteur constitutionnellement actif. Les produits du gène E1A une fois exprimés transactivent l'expression des autres gènes viraux mais également des gènes cellulaires impliqués dans la synthèse d'ADN (Nevins, 1981). E1A présente également un rôle dans la transition du cycle cellulaire vers la phase S (car l'AdV infecte les cellules en phases G0/G1). La région E1 contient également le gène E1B qui code pour des protéines ayant des activités anti-apoptotiques (Molinier-Frenkel and Boulanger, 2003).

La région E2 code pour les facteurs nécessaires à la réplication du génome viral (polymérase virale, DBP [DNA Binding Protein]...) (Saha and Parks, 2017).



**Figure 25: Schéma simplifié de l'organisation du génome de l'AdV**

Le génome de l'AdV est un ADN double brin linéaire. Il est encadré par deux séquences répétées inversées (ITR) et présente une séquence d'encapsidation ( $\psi$ ). L'organisation génomique des différentes régions est représentée, avec les gènes précoces (E1A, A1B, E2A, E2B, E3 et E4) et les gènes tardifs (L1 à L5) sous le contrôle du promoteur unique MLP.

La région E3 présente la fonction immunomodulatrice en codant pour des protéines qui inhibent les réponses immunitaires de l'hôte (Windheim et al., 2004).

Finalement, la région E4 code pour des protéines régulatrices qui interagissent avec des protéines cellulaires impliquées dans différentes fonctions dont l'apoptose, le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (Weitzman, 2005).

Les gènes tardifs (L1 à L5) sont sous le contrôle d'un promoteur unique, le promoteur de la région tardive MLP (Major Late Promotor) (Molinier-Frenkel and Boulanger, 2003) et codent pour les protéines de structure et des protéines facilitant l'assemblage du virus.

Les protéines de structure IX et Iva2 sont quant à elles exprimées à un temps intermédiaire de l'infection, avant l'activation du MLP (Fessler and Young, 1998).

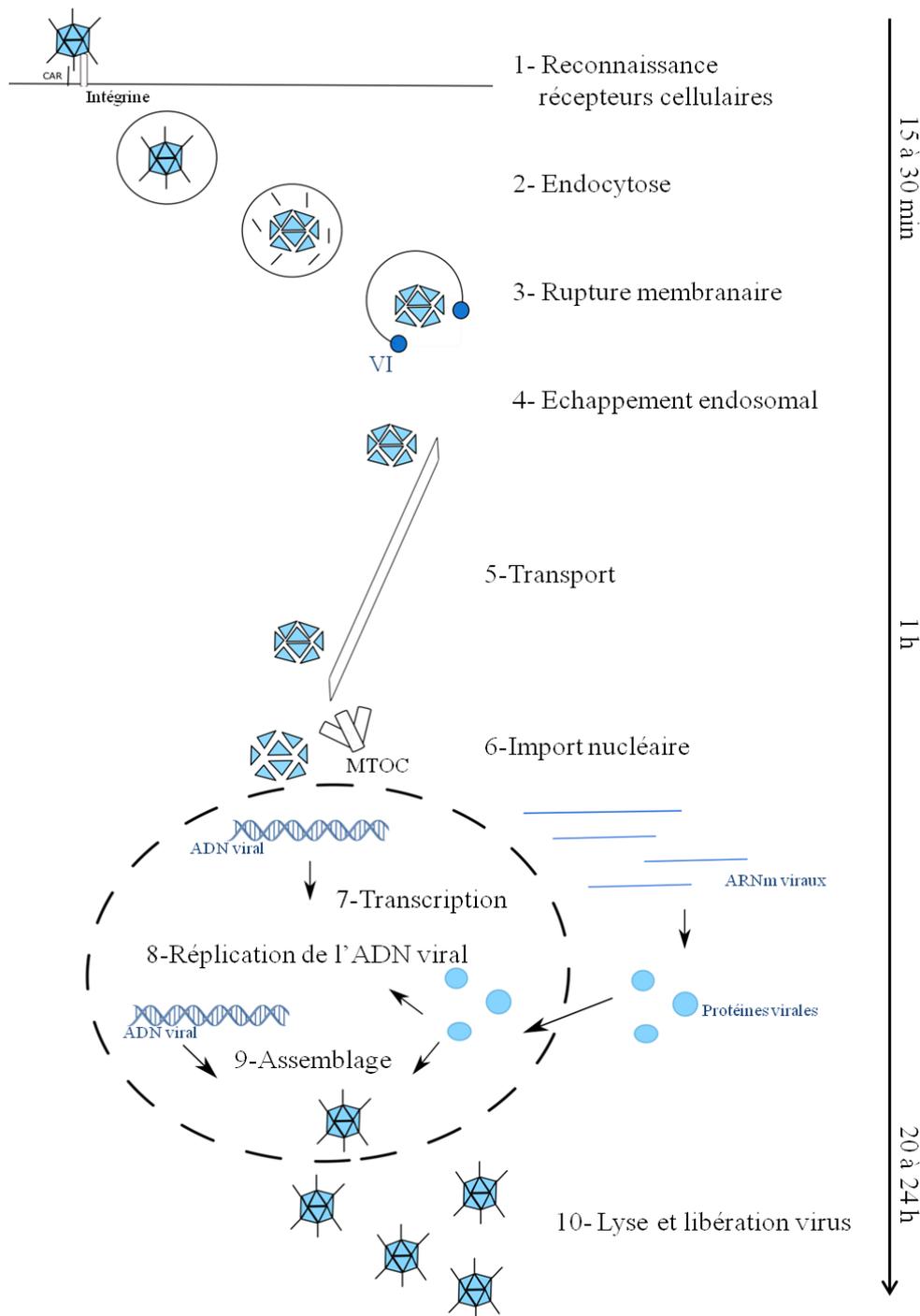
Le génome présente également des structures particulières nommées VA-ARN, ce sont des ARN non codants qui ont un rôle proviral notamment en contrôlant la réponse immunitaire dirigée contre le virus (Vachon and Conn, 2016).

### III- Cycle viral

L'AdV doit atteindre le noyau pour se répliquer et produire de nouvelles particules virales. Ce cycle viral dure de 20 à 24 h en fonction du type cellulaire infecté et commence par la reconnaissance de la cellule hôte par le virus. L'AdV est ensuite internalisé dans la cellule et est transporté le long des microtubules jusqu'au noyau. Une heure après l'infection, la majorité des virus est localisée au niveau du pore nucléaire. Le virus libère son génome qui est transcrit et répliqué. De nouvelles particules virales sont ensuite assemblées dans le noyau et libérées par lyse de la cellule. Les virions sont ainsi disséminés vers les cellules environnantes (**Figure 26**).

#### A) **Interaction entre le virus et sa cellule hôte**

La fibre de l'AdV est responsable de l'interaction primaire entre le virus et son récepteur cellulaire. Cette interaction varie en fonction de la taille et de la flexibilité de la fibre ainsi que du domaine présent au niveau de la tête de la fibre (Cupelli and Stehle, 2011). Ainsi, tous les types d'AdV ne se lient pas au même récepteur primaire (voir **Tableau 3**). En 1976, il est décrit que l'AdV d'espèce C et le Coxsackievirus B partagent le même récepteur (Lonberg-Holm et al., 1976). Ce dernier a été identifié en 1997 et a été nommé CAR (Coxsackievirus Adenovirus Receptor) (Bergelson et al., 1997). Par la suite, il a été démontré que les espèces



**Figure 26: Cycle viral de l'AdV**

Le virus se lie aux récepteurs cellulaires (1) puis pénètre dans la cellule par endocytose dépendante de la clathrine (2). L'AdV s'échappe par rupture de l'endosome grâce à la protéine VI (3 et 4) et est transporté le long des microtubules (5) jusqu'au centre organisateur des microtubules (MTOC). Une fois au pore nucléaire, un désassemblage partiel de la capsidie permet l'import du génome viral dans le noyau (6). Ce génome est alors transcrit, les ARN messagers viraux sont exprimés et les protéines traduites (7). Le génome viral est répliqué (8) et les nouvelles particules virales sont assemblées (9). Les virions sont libérés par lyse de la cellule (10). Le cycle viral entier dure de 20 à 24 h en fonction du type cellulaire infecté. L'échappement endosomal a lieu 15 à 30 min après l'infection, et en 1 h d'infection, la majorité des virus est accumulée autour du noyau.

A, D, E et F utilisent également ce récepteur (Roelvink et al., 1998), bien que certains virus de l'espèce D peuvent également interagir avec les acide sialiques (Arnberg et al., 2000). L'espèce B quant à elle se lie à un récepteur différent identifié en 2003, le CD46 (Gaggar et al., 2003). Cependant, certains types de cette espèce (type 3 et type 7) se lient à d'autres récepteurs (Marttila et al., 2005).

Le récepteur CAR est exprimé de façon ubiquitaire à la surface des tissus humains. CAR a une fonction dans la formation des jonctions intercellulaires au niveau des pôles basolatéraux des cellules épithéliales (Coyne and Bergelson, 2005). Des études stochiométriques montrent qu'une fibre se lie à 3 récepteurs CAR (Lortat-Jacob et al., 2001). En se liant à CAR, l'AdV perturbe l'adhésion des jonctions cellulaires ce qui permet d'augmenter la perméabilité des épithéliums et donc de favoriser l'infection (Walters et al., 2002).

Cette interaction entre la fibre et son récepteur entraîne un changement de conformation de la capsid menant à l'exposition d'un motif RGD du penton (Arginine – Glycine – Acide aspartique) (Lindert et al., 2009). Ce motif se lie aux intégrines de type  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  (Wickham et al., 1993). Cette liaison active des voies de signalisation cellulaires qui induisent la réorganisation du cytosquelette d'actine favorisant l'endocytose du virus (Li et al., 1998).

### **B) Endocytose du virus**

Le virus pénètre dans la cellule par endocytose dépendante de la clathrine (Wang et al., 1998). Dans l'endosome, la capsid est partiellement désassemblée. Cependant le mécanisme de ce désassemblage reste controversé. Des études suggèrent que ce désassemblage a lieu avant l'endocytose et que la fibre n'est pas internalisée (Nakano et al., 2000). D'autres prétendent que c'est la force mécanique exercée sur le virus après sa liaison aux récepteurs qui induit ce désassemblage partiel de la capsid (Burckhardt et al., 2011). Le rôle du pH des endosomes est également débattu, certains suggérant qu'il est nécessaire au désassemblage de la capsid et d'autres que le désassemblage s'effectue indépendamment du pH dans lequel se trouve la capsid (Wiethoff et al., 2005 ; Suomalainen et al., 2013).

Une fois internalisé, le virus doit s'échapper de l'endosome pour ne pas être dégradé par les lysosomes. Ce rôle est associé à la protéine VI, qui se retrouve exposée lors du désassemblage partiel de la capsid.

### C) Rupture et échappement endosomal

La protéine VI contrôle deux étapes distinctes du cycle viral : la rupture de la membrane de l'endosome et l'échappement endosomal du virus (Martinez et al., 2013), impliquant différents domaines de cette protéine (**Figure 24**).

L'hélice amphipathique à l'extrémité N-terminale de la protéine VI a la propriété de s'associer aux membranes de l'endosome, ce qui induit leur courbure menant à leur rupture (Wiethoff et al., 2005 ; Maier et al., 2010). La rupture membranaire nécessite le clivage de la protéine VI par la protéase virale. En effet, le mutant hyperstable Ts1, décrit auparavant ne peut pas se désassembler pour libérer la protéine VI. Par conséquent, il ne parvient pas à rompre les membranes endosomales et est donc dégradé par les lysosomes (Martinez et al., 2015).

Cette étape de lyse membranaire entraîne l'exposition de motifs intra-luminaux, reconnus par la cellule comme des signaux de danger (Martinez et al., 2013). La détection de ces ruptures membranaires active l'autophagie qui est également contrée par la protéine VI de façon dépendante de son motif PPxY (Montespan et al., 2017). Ce motif est donc nécessaire pour l'échappement endosomal de l'AdV. En fonction des espèces d'AdV, cette étape s'effectue à différents stades du cycle viral, ainsi les virus de l'espèce C s'échappent de l'endosome précoce, alors que les virus de l'espèce B s'échappent uniquement des endosomes tardifs voire des lysosomes (Gastaldelli et al., 2008). Pour l'AdV de type 5, cet échappement endosomal a lieu environ 15 à 30 min après l'infection et sera détaillé plus tard dans ce chapitre (Montespan et al., 2017).

Le virus, une fois dans le cytosol doit être transporté jusqu'au noyau pour libérer son génome.

### D) Transport du virus vers le noyau

Le transport du virus jusqu'au noyau se fait par un processus actif le long des microtubules faisant intervenir la dynéine, un des moteurs moléculaires cellulaires impliqué dans le transport rétrograde du virus (Suomalainen et al., 1999). La protéine hexon est nécessaire pour ce transport. En effet l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'hexon ne bloquent pas l'entrée du virus, ni son échappement de l'endosome, mais le virus n'est plus transporté jusqu'au noyau (Smith et al., 2008). Ces données ont été confirmées lorsqu'une interaction entre la dynéine et l'hexon a été mise en évidence (Bremner et al., 2009). La protéine VI qui reste partiellement associée à la capsid suite à l'échappement endosomal semble également

faciliter ce transport, de façon dépendante du motif PPxY exposé par cette protéine (Wodrich et al., 2010).

Le virus est alors concentré au centre organisateur des microtubules (MTOC) pour se diriger vers le noyau (Bailey et al., 2003).

### **E) Import nucléaire et libération du génome viral**

La translocation du virus du MTOC vers le noyau nécessite le facteur d'export nucléaire CRM1, sans que les mécanismes impliqués ne soient élucidés. En effet, lorsque des cellules infectées sont traitées avec la leptomycine B, un inhibiteur de CRM1, alors le virus reste accumulé au niveau du MTOC (Strunze et al., 2005).

Une fois à proximité du noyau, le virus, se lie au complexe du pore nucléaire (NPC), et plus particulièrement à des nucléoporines (Nup) qui constituent ce pore. La Nup214 se lie à la protéine hexon des AdV de type 2 et 5 et sert d'ancrage pour le virus au NPC (Trotman et al., 2001 ; Cassany et al., 2015). Le virus serait alors partiellement désassemblé afin de libérer le génome viral. Cependant, le mécanisme de ce désassemblage reste controversé. Un modèle suggère que la protéine IX du virus se lie à la kinésine, elle-même maintenue par la Nup358 au NPC. Les forces mécaniques opposées entre le transport rétrograde de l'hexon et le transport antérograde de la protéine IX provoqueraient le désassemblage de la capsid (Strunze et al., 2011). Ce modèle propose un rôle essentiel de Nup358. Or, d'autres études indiquent au contraire que la Nup358 n'est pas ou peu impliquée dans la libération du génome viral (Thèse Irene Carlon-Andres ; Cassany et al., 2015).

Suite au désassemblage de la capsid, le génome est importé dans le noyau. Ceci implique les transportines, facteurs de transport cellulaire (Hindley et al., 2007). Cependant, le mécanisme d'import reste peu connu et différents modèles sont décrits en fonction du type de virus étudié, et semblent impliquer des facteurs cellulaires tels que les histones (Trotman et al., 2001) ou des protéines liées au génome viral comme la protéine VII (Wodrich et al., 2006).

### **F) Réplication et production de nouvelles particules virales**

Le génome viral importé dans le noyau est condensé par la protéine VII. Cette protéine induit le recrutement de facteurs cellulaires tels que TAF-1 afin de remodeler la chromatine virale et favoriser la transcription des gènes viraux (Gyurcsik et al., 2006 ; Haruki et al., 2006 ; Komatsu et al., 2011). Les gènes viraux précoces sont d'abord transcrits et ont divers rôle comme détaillé dans la section précédente, puis l'ADN viral est libéré de la protéine VII permettant ainsi la réplication (Chen et al., 2007).

L'étape de réplication nécessite l'expression par la région E2 de préTP, de l'ADN polymérase virale et de DBP. A la fin de la réplication, le précurseur préTP est clivé par la protéase virale, l'ADN répliqué est ainsi prêt à être encapsidé. Les protéines de structure sont alors exprimées à partir du promoteur tardif (MLP), ce qui nécessite la présence de la protéine Iva2 (Pardo-Mateos and Young, 2004). Des protéines virales non structurales sont également exprimées et servent de chaperonnes pour l'assemblage de la capsid.

Cet assemblage a lieu dans le noyau (Weber et al., 1985). La protéine VI joue un rôle fondamental dans la formation des capsides car elle permet l'import de la protéine hexon dans le noyau (Wodrich et al., 2003). La protéine hexon une fois transportée dans le noyau est prise en charge par la chaperonne virale 100K qui favorise sa trimérisation (Hong et al., 2005). L'encapsidation du génome dans la particule virale implique le signal d'encapsidation porté par l'ADN mais aussi des protéines virales structurales (IIIa, VII) et non structurales (L1 52-55k, L4-33k) (Ma and Hearing, 2011 ; Zhang and Arcos, 2005; Gustin and Imperiale, 1998 ; Wu et al., 2013).

Une fois les nouvelles particules virales formées, une protéine codée par la région E3 est exprimée de façon tardive (E3-11,6k) pour induire la lyse cellulaire afin de favoriser la libération de nouvelles particules virales (Tollefson et al., 1996).

Ces particules virales vont alors infecter de nouvelles cellules et propager l'infection.

#### IV- Pathologies et traitement

Chez les patients immunocompétents, l'infection par l'AdV, bien que fréquente (85 % de la population possède des anticorps contre plusieurs types [Molinier-Frenkel and Boulanger, 2003]), est en général asymptomatique (Venard et al., 2001). Les infections symptomatiques, chez les personnes immunocompétentes, sont le plus souvent respiratoires et oculaires (Radke and Cook, 2018). Les symptômes apparaissent entre 2 à 14 jours après l'infection en fonction du type de pathologie associée à cette infection (Kojaoghlanian et al., 2003), mais ne nécessitent pas de traitement. Aux Etats-Unis, depuis 2003 la prévalence de l'AdV est suivie par la NATRS (National Adenovirus Type Reporting System) auprès de laquelle 362 infections par AdV ont été rapportées en 2016 (Binder et al., 2017). Ce suivi s'effectue sur la base du volontariat des hôpitaux souhaitant participer à l'étude, le nombre d'infections peut donc être sous-estimé.

Chez les enfants de moins de 5 ans, l'infection par l'AdV est responsable en France de 5 % des infections respiratoires et de 10 % des pneumonies, ces dernières pouvant évoluer vers un diagnostic plus grave voire fatal (Venard et al., 2001). Les AdV de type 40 et 41 sont chez les enfants le 2<sup>ème</sup> agent responsable de gastro-entérites après le Rotavirus (Osborne et al., 2015). Une autre population sensible à l'AdV est constituée par les groupes en proximité étroite, tels que les militaires, qui sont surtout infectés par les AdV de type 4 et 7 (Top, 1975 ; Hendrix et al., 1999). C'est pourquoi actuellement, et ce depuis 2011, un vaccin oral est disponible contre ces types d'AdV et est obligatoire pour les recrues militaires américaines de 17 à 50 ans. Ceci a permis de diviser le nombre d'infections par 100 (Radin et al., 2014).

Mais c'est surtout chez les patients immunodéprimés que l'AdV est à craindre. En effet, ces infections peuvent être fatales avec une mortalité pouvant aller jusqu'à 60 % des cas (Bordigoni et al., 2001). Ces infections sont parfois dues à des types rares, tels que l'AdV35 (Hierholzer, 1992).

Plusieurs études décrivent la persistance de l'AdV dans les tissus lymphoïdes, où l'immunité empêche sa réactivation (Horvath et al., 1986 ; Humar et al., 2005 ; Garnett et al., 2002). Le mécanisme par lequel l'AdV entre en latence est inconnu, puisque ce virus ne s'intègre pas dans le génome cellulaire, mais une étude suggère que l'AdV forme des épisomes dans les lymphocytes (Zhang et al., 2010). Ainsi lorsque le patient est immunodéprimé le virus pourrait se réactiver. Les infections par AdV lors de greffes sont donc surtout dues à une réactivation du virus plutôt qu'à une infection *de novo* (Khanal et al., 2018).

L'AdV peut alors se disséminer et entraîner des cystites hémorragiques, des pneumonies, des encéphalites, et dans certains cas, l'infection peut engendrer une défaillance de plusieurs organes avec une issue fatale pour le patient (Chakrabarti et al., 2002 ; Leen and Rooney, 2005). Les AdV ne sont cependant pas recherchés en diagnostic de routine chez les patients immunodéprimés, et de nombreuses études suggèrent de les inclure dans les virus à suivre régulièrement notamment lors de greffes de cellules souches hématopoïétiques chez les enfants (Khanal et al., 2018).

Il n'existe pas de traitement spécifique contre les AdV. Actuellement, le Cidofovir est utilisé chez les patients immunodéprimés (Ganapathi et al., 2016). Cet antiviral est un analogue de nucléoside qui fonctionne comme inhibiteur compétitif de la polymérase virale. Il est également efficace contre les infections par HCMV (Wilkins and Sester, 2016) et BKV (Momper et al., 2013). Cependant, ce traitement, peu efficace dans le cas de l'AdV, présente

de forts risques de néphrotoxicité. Des recherches sont donc en cours pour développer de nouveaux traitements anti-adénoviraux (Lenaerts and Naesens, 2006), tels que l'analogue du Cidofovir, le Brincidofovir (Wold and Toth, 2015).

#### V- Utilisation thérapeutique

Les AdV, sont de puissants outils pour le transfert efficace de gènes dans le noyau. Ainsi, leur utilisation en thérapie génique a été développée car ils présentent de nombreux avantages. En effet, les AdV (i) sont produits facilement à hauts titres ( $10^{12}$  particules virales par mL), (ii) infectent de nombreux types cellulaires grâce à leur large tropisme, (iii) ils sont capables d'infecter les cellules quiescentes, (iv) ils ont un faible risque d'intégration dans le génome cellulaire, (v) ils présentent une capsidie facilement modifiable et avec une large capacité de contenance de l'ADN (Molinier-Frenkel and Boulanger, 2003). Cependant, une des principales limites à leur utilisation est la forte réponse immunitaire induite lors de l'injection (Sharon and Kamen, 2018).

#### Thérapie génique

Depuis le début des années 1990, différentes générations de vecteurs ont été développées à partir des AdV (Crystal, 2014). Actuellement, les vecteurs appartiennent à la 3<sup>ème</sup> génération et ne possèdent plus aucun gène viral à l'exception des séquences ITR et de la séquence d'encapsidation (Schiedner et al., 1998). Le gène d'intérêt inséré peut donc atteindre 32 kpb ce qui est un avantage considérable pour la thérapie génique.

Cependant, la thérapie génique basée sur l'AdV est confrontée à la réponse immunitaire de l'hôte qui induit la perte du vecteur, mais limite également sa ré-administration (Imperiale, 2008). Cette forte réponse immunitaire induite par l'injection peut même être fatale. En effet, dans les années 2000, des études utilisant des doses croissantes de vecteurs d'AdV ont mené à la mort d'un patient. Jess Gelsinger participait à cet essai clinique et il reçut la plus forte dose de vecteur ( $6 \times 10^{11}$  particules virales par kg) et développa une forte réponse immunitaire menant à son décès 98 h après l'injection (Raper et al., 2003). Depuis, aucun accident de ce genre n'a été rapporté dans les essais cliniques utilisant l'AdV.

### Vaccination

La réponse immunitaire induite par l'AdV limite son utilisation en thérapie génique mais présente un avantage pour le développement de vaccin. En effet, l'utilisation de l'AdV dans la vaccination limite l'utilisation d'adjuvants. Ces vaccins s'appuient sur la possibilité de modifier la capsid de l'AdV, notamment en remplaçant la région la plus immunogène de l'hexon par l'épitope d'intérêt pour la vaccination. D'autres protéines majeures de la capsid, telles que la fibre, le penton et la protéine IX, peuvent également être utilisées pour exposer des épitopes (Vujadinovic and Vellinga, 2018).

### Vecteurs oncolytiques

Les AdV sont facilement modifiables et cette caractéristique a permis de développer une autre visée thérapeutique : l'utilisation d'AdV comme vecteur oncolytique. Dans ce cas, le virus est modifié pour se répliquer uniquement dans les cellules tumorales, où il pourra également exprimer un transgène entraînant leur mort, puis entraînera la lyse des cellules tumorales.

Un exemple de vecteur oncolytique est le ONYX-015 qui est commercialisé en Chine depuis 2006 (sous le nom H101) pour le traitement clinique de certains cancers (Garber, 2006). Ce vecteur est caractérisé par la délétion de la région codant pour E1B-55k. Cette protéine est nécessaire pour que le virus inhibe p53 et permet d'assurer sa répllication. Ainsi ce vecteur ONYX-015 ne peut plus inhiber p53 et ne se développera que dans les cellules où p53 est inactif c'est-à-dire dans certaines cellules tumorales.

Les AdV sont donc à l'origine de nombreuses stratégies à visées thérapeutiques et sont utilisés dans de nombreux essais cliniques. En 2017, on estime que 547 essais cliniques en cours dans le monde sont basés sur l'utilisation d'AdV, soit 20,5 % des essais (Ginn et al., 2018). Ce pourcentage indique l'intérêt majeur porté pour les AdV qui est le vecteur le plus utilisé. Il est donc important de bien connaître la réponse induite par le virus lors de l'infection, notamment la réponse immunitaire afin d'améliorer la sécurité d'utilisation de ces vecteurs.

## VI- Activation de l'immunité innée par l'AdV

### **A) L'AdV induit l'activation d'IFN**

Dès 1967, il a été montré que l'infection par l'AdV induit l'expression d'IFN (Ho and Köhler, 1967) et qu'elle est indépendante de la synthèse de nouvelles protéines par l'AdV (Béládi and

Pusztai, 1967). Plusieurs études ont ainsi mis en évidence le rôle essentiel de la capsidie dans l'activation de la réponse immunitaire, soit en utilisant des virus inactivés par les UV (Borgland et al., 2000), soit par l'étude des vecteurs de 3<sup>ème</sup> génération dépourvus de tout gène viral (Muruve et al., 2004). Cependant, des études suggèrent que l'expression du génome viral pourrait être impliquée plus tardivement dans cette activation (Liu et al., 2003). Pour la suite de ce chapitre, seules les réponses associées à la détection de la capsidie seront présentées. Les PAMP exposés par le virus et les réponses cellulaires associées sont décrits dans les paragraphes suivants, en fonction du cheminement du virus au cours de son entrée dans la cellule hôte (**Figure 27**).

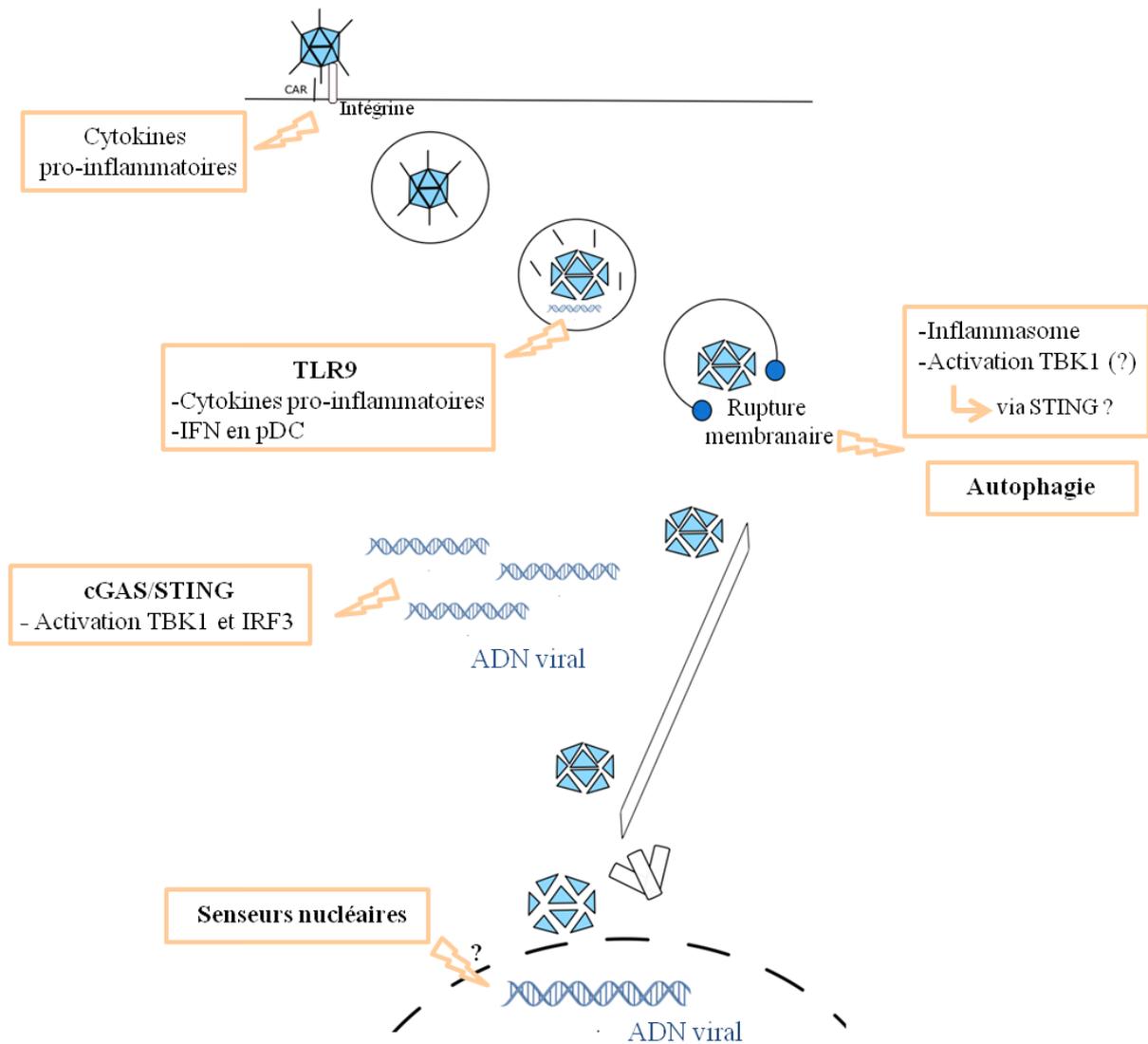
Dans un premier temps, le virus interagit avec les récepteurs présents sur la membrane plasmique de l'hôte. L'interaction entre la fibre viral et le récepteur cellulaire CAR induit la production de cytokines (IL8, RANTES), dépendante de l'activation de NF- $\kappa$ B (Tamanini et al., 2006).

Le virus interagit également via sa protéine penton avec les intégrines cellulaires. Une étude dans des macrophages issus de souris infectées avec  $10^{10}$  pp (particules physiques) de virus a montré que cette liaison induit une signalisation menant à l'expression de l'IL1 $\alpha$ , et qu'un virus sans motif RGD (nécessaire pour la liaison à l'intégrine) est incapable d'induire cette activation (Di Paolo et al., 2009).

Par la suite, dans l'endosome, le TLR9 est décrit pour reconnaître l'ADN de l'AdV et induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN en réponse à l'infection.

Par exemple, lorsque des macrophages de souris déficientes pour le TLR9 sont infectées avec l'AdV (10 000 pp/c), l'activation de NF- $\kappa$ B et la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF $\alpha$ ...) sont limitées par rapport aux conditions contrôles (Cerullo et al., 2007).

La production d'IFN en réponse à l'infection a été démontrée par la mesure du taux d'IFN $\alpha/\beta$  dans le sérum de souris infectées par l'AdV ( $1,2 \times 10^{13}$  pp) qui montre un pic de production d'IFN $\alpha/\beta$  8 h après l'infection (Fejer et al., 2008). Pour identifier le type cellulaire responsable de cette réponse, des cellules immunitaires murines ont été isolées (mDC, pDC, macrophages...) et infectées à une MOI (Multiplicity Of Infection) de 250 pfu/c (plaque forming units par cellule). Dix huit heures après l'infection, cette étude montre que la production d'IFN est largement supérieure dans les pDC, et qu'elle dépend strictement du TLR9.



### Figure 27: Signaux potentiels détectés par la cellule au cours de l'entrée de l'AdV

La liaison du virus à ses récepteurs cellulaires induit la production de cytokines pro-inflammatoires par l'activation des intégrines.

Une fois dans l'endosome l'ADN viral est reconnu par le TLR9 ce qui induit l'activation de cytokines pro-inflammatoires mais également d'IFN dans les pDC. L'ADN viral est également détecté dans le cytoplasme et active la voie cGAS-STING.

Cependant, l'ADN de l'AdV ne semble pas détecté par les senseurs nucléaires car il est compacté par la protéine VII qui semble le protéger.

La rupture de la membrane endosomale est un signal de danger qui active l'inflammasome et TBK1, bien que ce mécanisme d'activation semble impliquer STING. Ces dommages membranaires activent également l'autophagie dirigée contre le virus.

Cependant, en absence de TLR9, les IFN $\alpha/\beta$  sont tout de même détectés dans le sérum de souris infectées, suggérant que d'autres cellules sont impliquées dans cette activation (Zhu et al., 2007).

Lorsque des souris déplétées pour le TLR9 sont infectées avec  $1,2 \times 10^{13}$  pp d'AdV et que les cellules pDC et mDC sont isolées, il a été montré que les cellules mDC induisent la production d'IFN et que celle-ci est indépendante du TLR9. Ce sont donc ces cellules qui sont majoritairement responsables de la production d'IFN $\beta$  et cela de façon indépendante du TLR9 (Fejer et al., 2008).

Deux voies d'activation de la réponse IFN semblent donc induites au cours de l'infection par l'AdV, une voie strictement dépendante du TLR9 impliquant les pDC et une autre voie indépendante du TLR9 induite dans d'autres cellules dont les mDC.

Dans une autre étude visant à identifier cette voie d'activation indépendante du TLR9, des cellules endothéliales murines (Ms1) ont été délétées pour différents senseurs dont cGAS et STING et infectées par l'AdV ( $2 \times 10^4$  pp/c). Six heures après l'infection les résultats montrent un défaut d'activation d'IRF3 lorsque les senseurs de la voie cGAS-STING sont absents. Ces données ont été confirmées dans des cellules HeLa infectées avec 5 000 pp/c et suivies 6 h après l'infection (Lam et al., 2014). L'infection par l'AdV induit donc l'activation de la voie cGAS-STING décrite pour répondre à l'ADN cytoplasmique. Cette voie expliquerait ainsi la production d'IFN indépendante du TLR9, après détection de l'ADN viral.

Des études suggèrent cependant que la présence d'ADN n'est pas l'unique responsable de l'activation de la réponse immunitaire. En effet, des études avec le mutant Ts1, construit à partir du type 2, ont montré le rôle des ruptures de membrane dans cette réponse.

Tout d'abord, le rôle de ces dommages membranaires dans l'activation de l'inflammasome a été démontré. Des cellules THP-1 (monocytes humains) infectées avec les virus WT et Ts1 montrent que l'infection avec le mutant Ts1 n'induit pas l'activation de l'inflammasome NLRP3 et par conséquent l'IL1 $\beta$  n'est pas produit, contrairement à l'infection par le virus WT. La rupture membranaire est donc nécessaire pour activer l'inflammasome NLRP3 (Barlan et al., 2011).

D'autres études ont mis en évidence le rôle de la rupture de la membrane endosomale pour induire l'expression d'IFN en induisant l'activation de TBK1 et par conséquent d'IRF3. Cette observation a été effectuée dans différentes lignées cellulaires, comme les BMMO

(macrophages murins issus de la moelle osseuse) et des macrophages murins infectés respectivement avec 25 000 pp/c et 20 000 pp/c d'AdV WT ou Ts1. Le niveau d'activation d'IRF3 a été suivi 4 h ou 6 h après l'infection (Nociari et al., 2009 ; Stein and Falck-Pedersen, 2012). Ces deux études mettent en évidence que l'infection par le virus Ts1 n'induit pas l'activation de TBK1, ni d'IRF3 contrairement au virus WT. Cette activation dépend donc de la rupture membranaire, étudiée ici à des temps tardifs de l'infection. Cependant, pour les cellules infectées avec le virus WT, cette activation d'IRF3 dépend également de la présence de TBK1 et de STING dans les macrophages murins. En effet, leur déplétion induit un défaut d'activation d'IRF3, suggérant un rôle de la détection de l'ADN cytoplasmique plutôt qu'un rôle direct de la rupture membranaire (Stein and Falck-Pedersen, 2012).

Les mécanismes d'activation induits par les ruptures membranaires ne sont donc pas complètement élucidés et il reste à savoir si la rupture membranaire induit cette activation car elle permet à la cellule de détecter le virus (par exemple exposé l'ADN viral dans le cytoplasme) ou bien si la rupture de la membrane est reconnue par la cellule hôte comme un DAMP.

Des études chez des virus enveloppés mettent en évidence le rôle direct des perturbations membranaires dans l'activation directe de la réponse antivirale (Hare and Mossman, 2013 ; Collins and Mossman, 2014), suggérant que cette étape du cycle viral constitue un DAMP. Cependant, le rôle de ce DAMP dans la réponse dirigée directement contre l'AdV n'a pas été étudié.

Ces dommages membranaires sont également impliqués dans l'activation de l'autophagie en réponse à l'AdV (Montespan et al., 2017). Ce mécanisme d'activation sera détaillé dans la partie suivante.

Finalement, dans le noyau, le génome viral est exposé aux senseurs nucléaires (corps nucléaire PML, famille PYHIN...) qui détectent des virus à ADN (Everett, 2001 ; Diner et al., 2015). Cependant, le génome de l'AdV, étant compacté par la protéine VII, limite son exposition et ne semble pas détecté dans le noyau (Karen and Hearing, 2011 ; Komatsu et al., 2016).

Ainsi tout au long de son trajet, l'AdV est soumis à la détection par la cellule hôte, mais il a également développé des mécanismes de contremesure afin de limiter l'activation de la réponse immunitaire, notamment grâce aux protéines codées par sa région

immunomodulatrice E3 qui peuvent limiter l'activation de NF- $\kappa$ B par exemple (Friedman and Horwitz, 2002). La région E1 code également pour des protéines impliquées dans l'inactivation de STAT1 (Sohn and Hearing, 2011), de la voie d'activation JAK (Shi et al., 2007), mais aussi de STING (Lau et al., 2015). Les VA-ARN limitent également la réponse antivirale en inhibant des facteurs induits par les IFN (Launer-Felty and Cole, 2014).

### **B) Limites des modèles d'études et controverses**

Les études d'activation de la réponse immunitaire *in vitro* présentent des limites car elles ne permettent pas de prendre en compte les interactions entre le virus et l'environnement de l'hôte tels que les facteurs sanguins ou encore les cellules de l'immunité adaptative (activation monocytes [Mistchenko et al., 1994], lymphocytes CD4+ [Onion et al., 2007] et CD8+ [Leen et al., 2004]).

Les études *in vivo* dans des modèles murins permettent donc d'appréhender en général l'évolution de l'infection par l'AdV dans un contexte plus global. Cependant, la limite du modèle murin est que l'AdV ne s'y réplique pas (Blair et al., 1989). Ainsi l'utilisation des souris et des cellules murines ne permet pas de conclure quant à l'effet du virus sur l'activation de l'immunité. De plus, l'utilisation dans de nombreuses études de cellules immunitaires est une limite car certaines cellules telles que les pDC présentent des mécanismes de réponses spécialisées qui ne sont pas efficacement activées dans les cellules épithéliales ou fibroblastes qui représentent pourtant les cibles de l'infection. Le choix du modèle cellulaire utilisé a donc un impact sur la réponse observée. Ainsi une étude comparant 3 lignées cellulaires murines (macrophages, cellules endothéliales et hépatocytes) a montré des différences d'activation de la réponse immunitaire par l'AdV en fonction des cellules infectées et cela dépend de la capacité des cellules à exprimer les éléments nécessaires à la détection du virus (MAVS, STING...) (Stein et al., 2012).

La réponse innée induite dépend également de la quantité de particules virales utilisées pour les expériences (Paladino et al., 2006). Or, la plupart des études utilisent de fortes doses virales afin de détecter une réponse cellulaire significative (jusqu'à 25 000 pp/c).

Finalement, des variations de réponse sont observables en fonction du type d'AdV utilisé pour l'étude. En effet, la nature de la réponse innée dépend du récepteur et du type cellulaire cible de l'infection (Russell, 2009). Les virus de l'espèce B, qui s'échappent de l'endosome tardif (Gastaldelli et al., 2008), contrairement au virus de l'espèce C, induisent une production de cytokines pro-inflammatoires plus importante (Teigler et al., 2014) ainsi qu'une activation plus soutenue de la voie cGAS-STING (Lam and Falck-Pedersen, 2014). Cette différence

d'activation de la réponse immunitaire innée entre les différents types impacte l'efficacité d'activation de la réponse adaptative (Pahl et al., 2012)

Ainsi, en fonction des conditions expérimentales, les AdV n'induisent pas d'activation de la réponse IFN. Une étude dans des fibroblastes HEL infectés par des virus enveloppés (SeV et HCMV) ou avec moins de 500 pp/c d'AdV a comparé la réponse induite au cours de l'entrée des virus. Il a ainsi été montré que l'entrée des virus enveloppés induit un influx de calcium contrairement à l'entrée de l'AdV. Or, cet influx de calcium est nécessaire pour l'activation de STING et d'IRF3 lors d'infections avec de faibles quantités de ces virus enveloppés. L'influx de calcium joue donc le rôle de DAMP lors de l'infection. Par conséquent, l'AdV n'activerait pas cette réponse antivirale lors de l'infection (Hare et al., 2015).

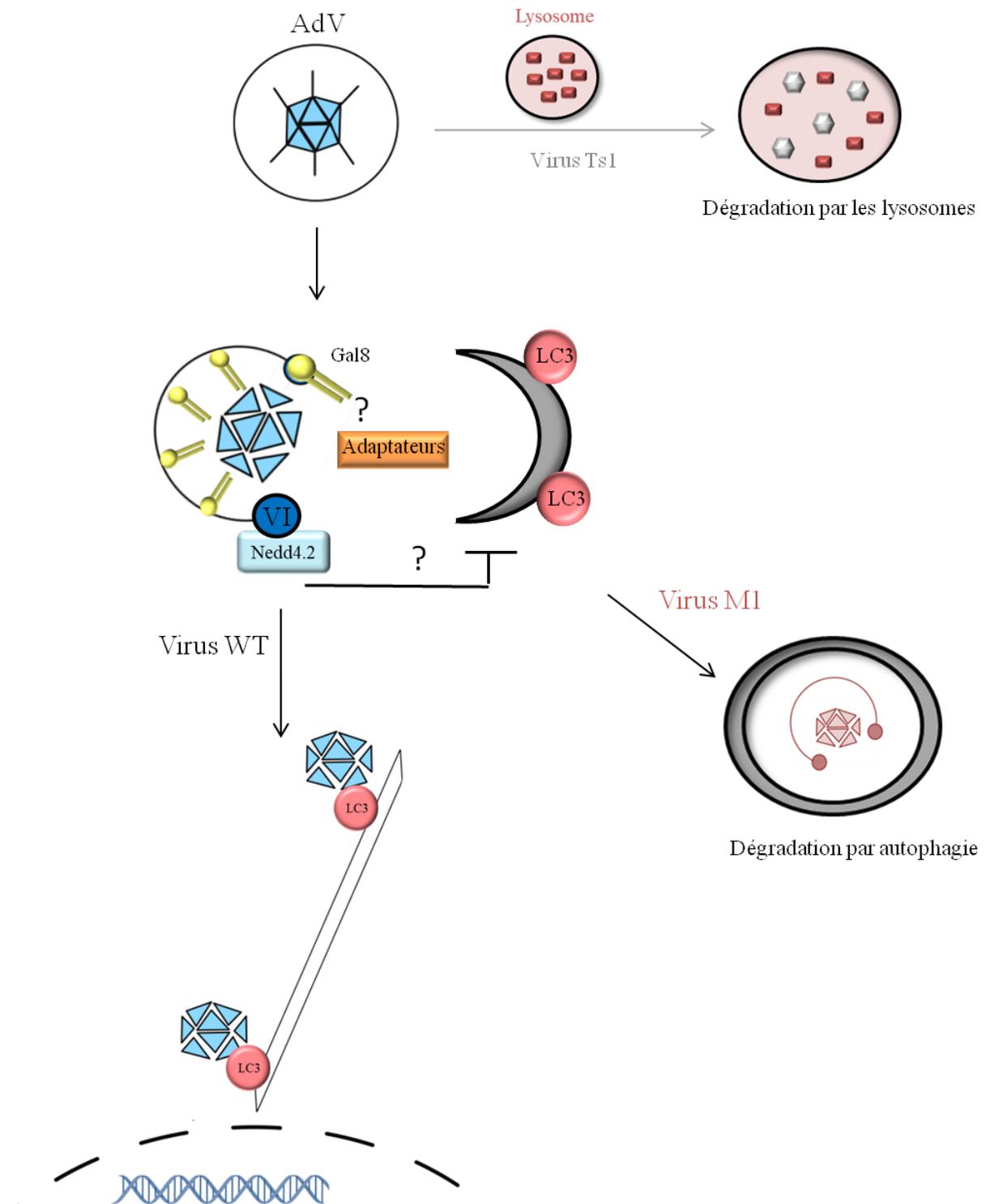
Ce défaut d'activation de la réponse immunitaire par l'AdV a été confirmé dans une seconde étude où des cellules THP-1 sont infectées à une MOI de 1200 pendant 2 jours. Dans ces conditions, l'infection par l'AdV n'induit pas l'activation de STING résultant dans un défaut de production d'IFN (Liu et al., 2017).

La réponse immunitaire, induite dans la cellule hôte lors de l'infection par l'AdV est donc complexe car d'une part, le virus présente des mécanismes efficaces de contournement de cette réponse et d'une autre part, parce que l'activation d'IFN varie en fonction des conditions expérimentales (modèle cellulaire, quantité de virus...).

De plus, il a récemment été mis en évidence, qu'en plus d'induire l'activation de l'immunité innée, l'entrée du virus dans la cellule active l'autophagie (Montespan et al., 2017).

## VII- Autophagie ciblant l'AdV

Au cours de son cycle infectieux, l'AdV induit des ruptures de la membrane endosomale afin d'être libéré dans le cytosol et éviter sa dégradation par la voie endosomale (**Figure 28**). Au contraire, le mutant Ts1 de l'AdV de type 5, incapable d'induire ces ruptures de membrane, est dégradé par les lysosomes (Martinez et al., 2015). Cette étape clef dans le cycle infectieux est due à l'interaction de l'hélice amphipathique de la protéine VI avec la membrane endosomale qui entraîne sa courbure (Wiethoff et al., 2005). Cette protéine présente également un motif PPxY impliqué dans l'interaction entre la protéine VI et les domaines WW de l'E3 ubiquitine ligase cellulaire Nedd4.2 (Wodrich et al., 2010).



**Figure 28: Autophagie dirigée contre l'AdV**

L'AdV est présent dans un endosome suite à son entrée dans la cellule. Il induit la rupture de la membrane endosomale grâce à sa protéine VI ce qui induit le recrutement de Gal8 et l'initiation de l'autophagie. La protéine VI du virus WT recrute Nedd4.2 et parvient à échapper à la dégradation par autophagie. Le virus utilise par la suite l'autophagie, notamment LC3 pour son transport le long des microtubules et libère son génome dans le noyau cellulaire.

Le mutant M1, ne recrute pas Nedd4.2 et par conséquent est dégradé par autophagie.

Le virus Ts1 ne parvient pas à induire de rupture de membrane endosomale et est dégradé par les lysosomes.

Un virus muté sur ce motif (PPxY > PGAA), le mutant M1, est incapable d'interagir avec Nedd4.2, ce qui entraîne un défaut d'infectiosité. En effet, ce mutant est 20 fois moins infectieux que le virus WT (Wodrich et al., 2010). L'interaction entre la protéine VI et Nedd4.2 a donc un rôle fondamental dans l'infectiosité du virus. Récemment, notre laboratoire a montré que ce défaut d'infectiosité résulte de la dégradation du virus M1 par autophagie, indiquant ainsi un rôle de Nedd4.2 dans le contournement de cette dégradation par le virus sauvage (Montespan et al., 2017).

Les travaux sur l'AdV, et notamment ceux du laboratoire, ont montré que les ruptures de membrane induites par l'AdV sont des signaux de danger qui sont détectés par le recrutement des Gal3 (Maier et al., 2012) et Gal8 (Montespan et al., 2017). Les adaptateurs p62 et NDP52 sont aussi recrutés, et l'infection par les virus WT et M1 induit la lipidation de LC3. En revanche, le mutant Ts1 n'induit ni recrutement de Gal3, ni lipidation de LC3, suggérant un lien entre dommages membranaires et activation de l'autophagie au cours de l'infection par l'AdV.

Le virus WT parvient à s'échapper de l'endosome rompu, marqué par Gal3. Au contraire, le virus M1 reste associé avec Gal3 et des structures positives pour LC3. Des images de microscopie électronique montrent que ce mutant reste associé avec l'endosome rompu dans des structures à double membrane analogues aux autophagosomes.

En présence d'inhibiteurs de l'autophagie (3'MA [3-méthyladenine], Chloroquine) ou en absence d'autophagie fonctionnelle (cellules déplétées pour ATG5), l'infectiosité du virus M1 est proche du virus WT, prouvant que son défaut d'infectiosité est dû à sa dégradation par autophagie.

La déplétion de Gal8, et non de Gal3 ni de Gal9, restaure également l'infectiosité du mutant M1, confirmant le rôle spécifique de Gal8 dans l'activation de l'autophagie. De façon intéressante, la déplétion des adaptateurs p62, NDP52 et OPTN ne restaure pas spécifiquement l'infectiosité de ce mutant. Ainsi, il est possible de supposer que, soit aucun adaptateur n'est nécessaire pour cette activation, soit des adaptateurs différents de ceux classiquement impliqués dans l'autophagie sélective sont recrutés au cours de l'infection par l'AdV.

Le virus WT, contrairement au M1, contourne cette dégradation par autophagie. Des études indiquent que le virus utilise l'autophagie pour favoriser sa propre réplication, mais les

mécanismes ne sont pas connus (Rodriguez-Rocha et al., 2011 ; Zeng and Carlin, 2013). Notre laboratoire, a montré que le virus WT limite sa dégradation en modulant l'activité de Nedd4.2. Cette ligase semble impliquée dans la formation des autolysosomes lors de l'infection par l'AdV. En effet, la déplétion de Nedd4.2 diminue le nombre d'autolysosomes et empêche la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes.

De plus, le virus détournerait Nedd4.2 pour favoriser son transport jusqu'au noyau, car en absence de cette ligase, l'accumulation du virus au MTOC est diminuée (Wodrich et al., 2010). Dans des cellules où l'expression d'ATG5 est réduite, le virus WT présente un défaut d'échappement endosomal, de transport et par conséquent de libération du génome viral dans le noyau. L'AdV semble donc utiliser l'autophagie pour promouvoir son cycle infectieux.

Récemment, il a été montré que les protéines Nedd4 possèdent un motif LIR, permettant leur interaction avec LC3 (Sun et al., 2017). LC3 est impliqué dans le transport des autophagosomes de façon dépendante de la dynéine et des microtubules, afin de favoriser leur interaction avec les lysosomes (Kimura et al., 2008). Or, l'AdV se déplace dans la cellule le long des microtubules en association avec LC3. Ainsi le recrutement de Nedd4.2 par le motif PPxY de la protéine VI pourrait favoriser l'interaction du virus avec LC3, et donc son transport. Le rôle de la lipidation de LC3 dans ce processus reste encore à être identifié.

De plus, en évitant sa dégradation par autophagie, le virus WT parvient à limiter sa présentation antigénique (Klein et al., 2016 ; Montespan et al., 2017).

L'autophagie, une fois contournée par l'AdV jouerait donc un rôle proviral. Le rôle de Nedd4.2 dans ce processus reste inconnu. Cependant, il est suggéré que la protéine VI grâce à son motif PPxY, en recrutant Nedd4.2, pourrait interférer avec le processus d'élongation de la membrane endosomale et ainsi prévenir la fermeture de l'autophagosome et donc sa dégradation (Montespan et al., 2017).

Le rôle des ubiquitine ligases Nedd4 dans le contrôle de l'autophagie sélective a déjà été mis en évidence dans différents contextes. Ainsi, Nedd4.2 a été impliqué dans l'inhibition de l'autophagie en induisant l'ubiquitination d'ULK1 (Nazio et al., 2016). De plus, Nedd4.1, qui appartient à la famille des Nedd4, régule l'activité de Beclin1 (Platta et al., 2012) et est utilisé par le virus de l'encéphalite Japonaise pour favoriser sa réplication (Xu et al., 2017). Certaines protéines impliquées dans l'autophagie telles qu'AMPK (Nakatsu et al., 2015) ou encore Tax1BP1 (Sudol et al., 1995) exposent un motif PPxY et pourraient donc interagir

avec les WW domaines des Nedd4. L'AdV avec son motif PPxY pourrait donc interférer avec ces interactions, et contrôler la fonction de Nedd4.2.

Ainsi, moduler la fonction des protéines Nedd4, notamment via un motif PPxY, pourrait limiter l'activation de l'autophagie et permettre au virus d'utiliser l'autophagie à son propre avantage. Il est à noter que la présence d'un motif PPxY est retrouvée dans de nombreuses familles virales (Thèse Sisley Austin), l'utilisation de ce motif pourrait donc être une stratégie de contournement conservée pour différents virus.



## OBJECTIFS DE LA THESE

Les dommages membranaires induits au cours de l'entrée de l'AdV ont récemment été décrits pour induire l'activation de l'autophagie. Cependant, leur rôle dans l'activation de l'immunité innée, notamment la réponse IFN, n'est pas encore connu pour ce virus.

Les travaux de cette thèse ont pour objectifs de déterminer l'impact des dommages membranaires dans l'activation de la réponse antivirale induite au cours de l'infection par l'AdV et d'en élucider les mécanismes moléculaires.

Nous avons étudié, dans un premier temps, l'impact des dommages membranaires sur l'expression d'IFN $\beta$ , dans des cellules humaines non immunitaires, et ce dès l'entrée du virus. Les résultats obtenus nous ont orientés vers la kinase TBK1 qui est impliquée dans l'activation de l'immunité innée dont font partie la réponse IFN et l'autophagie qui contrôle l'infection par l'AdV.

Nous avons, par la suite, étudié le lien entre les dommages membranaires, l'activation de TBK1 et la dégradation du virus par autophagie.



## **MATERIEL ET METHODES**



## I- Culture cellulaire

### A) Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires utilisées sont les cellules épithéliales d'ostéosarcomes humains (U2OS), les cellules rénales embryonnaires humaines exprimant les intégrines cellulaires  $\alpha\beta5$  (HEK293- $\alpha\beta5$ ), les fibroblastes humains issus de prépuces et exprimant le récepteur cellulaire CAR (HFF-CAR) fournis par Dr. Julie Dechanet (Université de Bordeaux). Les cellules U2OS-STING exprimant la protéine de fusion STING-mCherry ont été produites au laboratoire par Dr. Tetsuro Komatsu et les cellules U2OS exprimant des ARN interférents dirigés contre ATG5 ou NDP52 ont été produites selon le protocole détaillé dans la partie sh ARN.

Les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture utilisé est le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) contenant du Glutamax™ et supplémenté avec 1 % de pénicilline et streptomycine (Gibco, 10 000 U/mL pénicilline, 10 000 µg/mL streptomycine) et 10 % de sérum de veau fœtal (Eurobio) préalablement décomplémenté pendant 30 min à 56°C. Dans le cas des cellules HEK293- $\alpha\beta5$ , le milieu de culture est supplémenté avec 0,5 mg/mL de généticine (G418, Gibco). Les cellules U2OS-STING ou exprimant des ARN interférents dirigés contre ATG5 ou NDP52 sont maintenues en présence de 2 mg/mL de puromycine (Invivogen).

Les cellules sontensemencées dans des flasques et sont diluées lorsqu'elles atteignent 80 % de confluence. Pour cela, les cellules sont lavées dans 5 mL de PBS (PBS pH 7,4 Gibco), puis décollées quelques minutes à 37°C en présence de 2,5 mL de trypsine/EDTA (0,05 % trypsine EDTA 1x, Gibco). Les cellules sont ensuite resuspendues dans 7,5 mL de DMEM complet. La culture est maintenue en ensemençant à nouveau 1 mL de cellules dans 9 mL de DMEM complet.

Pour les différentes expériences, les cellules sont dénombrées avec une cellule de Malassez afin d'être ensemençées, selon les conditions du **tableau 4**.

Plaqué	Quantité de cellules / puits	Volume final
24 puits	1 x 10 <sup>5</sup>	500 µL
12 puits	0,8 x 10 <sup>5</sup>	1 mL
6 puits	2,5 x 10 <sup>5</sup>	2 mL

**Tableau 4: Conditions d'ensemencement**

## B) Transfection de si ARN

Les cellules sontensemencées à 70 % de confluence. Le lendemain, les cellules sont transfectées avec la quantité désirée de si ARN indiquée dans le **tableau 5**.

Cible	Séquence / Fournisseur	Quantité	Référence
Contrôle	5'-AGG UAG UGU AAU CGC CUU G	100 à 200 pmol	(Montespan et al., 2017)
Galectine 3	5'-AAG CCC AAU GCA AAC AGA AUU GCU U 5'-GAG AAC AAC AGG AGA GUC AUU GUU U	100 pmol	(Montespan et al., 2017)
Galectine 8	5'-CCC ACG CCU GAA UAU UAA AGC AUU U 5'-GGA CAA AUU CCA GGU GGC UGU AAA U	100 pmol	(Montespan et al., 2017)
Galectine 9	5'-GGC UUC AGU GGA AAU GAC AUU GCC U 5'-UGU GCA ACA CGA GGC AGA ACG GAG G	100 pmol	(Montespan et al., 2017)
TBK1	5'-GAC AGA AGU UGU GAU CAC A	120 à 200 pmol	(Ou et al., 2011)
Tax1BP1	5'-CAG UCU UUG GCU UAU CAA U	100 pmol	(Newman et al., 2012)
p62	5'-GCA UUG AAG UUG AUA UCG A	100 pmol	(Montespan et al., 2017)
TRIM16	5'-AGU AAU UCA CCA UGC AGG U	100 pmol	(Bell et al., 2013)
TRIM21	Qiagen / Numero 1027415	100 pmol	(Das et al., 2015)
TRIM23	Dharmacon / L-006523-00-0005	100 pmol	(Watanabe et al., 2015)
TRIM27	5'-GAA CCA GCU CGA CCA UUU A	100 pmol	(Hao et al., 2013)

**Tableau 5 : Liste et séquence des si ARN utilisés pour l'ARN interférence**

La transfection s'effectue le 2<sup>ème</sup> jour de culture, en fonction des conditions de transfection, le volume de réactif utilisé varie et est donc indiqué dans le **tableau 6**.

Les cellules sont préalablement lavées avec du PBS puis placées dans le volume désiré d'optiMEM (Gibco). La transfection est réalisée avec la lipofectamine RNAiMAX (Invivogen). Pour cela le volume désiré de lipofectamine est dilué dans de l'optiMEM puis ajouté au si ARN préalablement dilué dans l'optiMEM. Ce mélange est laissé à température ambiante pendant 10 min avant d'être ajouté sur les cellules et incubé pendant 3 h à 37°C. Par la suite, le milieu de transfection est remplacé par 2 mL de DMEM complet.

Une transfection successive est effectuée le lendemain selon le même protocole, puis 3 h après la transfection les cellules sont décollées et dénombrées sur cellule de Malassez afin d'êtreensemencées dans des plaques adaptées à l'expérience.

Réactifs	12 puits	6 puits
Lipofectamine RNAiMax	1,5 µL	3 µL
optiMEM ajouté aux cellules	400 µL	800 µL
optiMEM ajouté aux si ARN	100 µL	200 µL
optiMEM ajouté à la lipofectamine	100 µL	200 µL

**Tableau 6: Conditions de transfection en fonction des plaques utilisées**

Le poly IC (poly I:C-LMW, Invivogen), utilisé comme contrôle positif, est également transfecté selon le même protocole avec la lipofectamine RNAiMAX (Invivogen) à 2 µg/mL et 3 h après la transfection les cellules sont soit fixées (voir partie Immunofluorescence) soit lysées (voir la partie RT-qPCR).

### C) Lignées stables exprimant des sh ARN

Des cellules U2OS sontensemencées le jour 1 à  $1 \times 10^5$  cellules par puits dans des plaques 12 puits. Le lendemain, les cellules sont transduites à une MOI de 10 avec un lentivirus codant pour un sh ARN ciblant ATG5 ou NDP52 ou un sh ARN contrôle (Sigma). Le jour 3, le milieu de culture est changé afin d'éliminer les lentivirus restants, puis les cellules sontensemencées le lendemain au 1/3 dans des plaques 6 puits. La sélection est effectuée le jour suivant par ajout de 2 mg/mL de puromycine. Finalement, les cellules sont amplifiées dans une flasque de culture, toujours en présence de 2 mg/mL de puromycine afin de conserver l'expression stable de l'ARN interférence.

### D) Traitements pharmacologiques

Les inhibiteurs Bx795 et MRT67307 (Sigma) sont utilisés à différentes concentrations (de 0,5 µM à 10 µM), et sont ajoutés sur les cellules 3 h avant le début de l'expérience (sauf indication contraire). L'inhibiteur Composé C (Tocris) est utilisé à 10 µM et est ajouté sur les cellules 3 h avant le début de l'expérience. Le TNFα (PeproTech) est utilisé comme contrôle positif à une concentration de 25 ng/mL et est ajouté sur les cellules 30 min avant leur lyse (voir partie western blot).

Ces composés sont dissous selon les recommandations du fournisseur dans de l'eau ou du DMSO (Euromedex).

## II- Production de virus et infection

### A) **Amplification du virus**

Différents stocks de virus sont disponibles au laboratoire : les virus réplicatifs WT et M1 et les vecteurs non réplicatifs WT et les mutants M1, Ts1 et dIX. Tous ces virus sont délétés pour la région immunomodulatrice E3 et les vecteurs non réplicatifs codent pour la protéine GFP à la place du gène de transactivation E1A.

Les cellules HEK293- $\alpha\beta 5$  sont utilisées pour la production de tous ces virus car d'une part, elles surexpriment les intégrines  $\alpha\beta 5$ , le corécepteur de l'Adénovirus, assurant une bonne efficacité d'infection et d'une autre part, elles sont transformées avec le gène E1A ce qui assure la réplication des vecteurs par trans-complémentation.

Dans un premier temps, le virus à purifier doit être amplifié. Pour cela, 5 boîtes de Pétri de 15 cm de diamètre sontensemencées avec les cellules HEK293- $\alpha\beta 5$ . Lorsqu'elles atteignent 80 à 90 % de confluence, les cellules sont infectées avec  $10^9$  particules physiques de virus par boîte de Pétri. Les cellules sont placées à 37°C jusqu'à observer l'effet cytopathique du virus. Celui-ci est caractérisé par un détachement des cellules en amas et apparaît environ 48 h après le début de l'infection. Les cellules et le milieu de culture sont alors récupérés dans des tubes de 50 mL. Ces tubes suivent 3 cycles de congélation (à -80°C) et de décongélation (à 27°C), permettant de lyser les cellules et d'en libérer les particules virales. Les tubes sont centrifugés pendant 10 min à 3 500 g pour se débarrasser des débris cellulaires, et le surnageant est utilisé pour infecter 20 nouvelles boîtes de Pétri de 15 cm de diamètre.

La deuxième étape de cette production permet d'obtenir le stock de virus à purifier. Comme précédemment, les 20 boîtes de Pétri sont placées dans un incubateur à 37°C jusqu'à observer l'effet cytopathique du virus. Les cellules sont récoltées et centrifugées 10 min à 3 500 g. Le culot cellulaire est repris dans un volume final de 40 mL de DMEM. Les cellules sont soumises à 3 cycles de congélation / décongélation permettant de libérer le virus. Les tubes sont ensuite centrifugés 20 min à 3 500 g pour éliminer les débris cellulaires, le surnageant est conservé à -80°C jusqu'à la purification.

Pour la production du virus Ts1, les cellules sont placées lors de l'amplification à 37°C puis 3 h après le début de l'infection, la température non permissive (38,5°C) est utilisée afin de produire un virus portant la mutation de la protéase. En parallèle, une culture de cellules

infectées par le Ts1 est maintenue à 33°C afin de produire ce virus sous la forme infectieuse (ne portant pas la mutation) qui sera stocké et utilisé comme source pour les prochaines étapes d'amplification.

### **B) Purification du virus**

La purification est effectuée en 2 étapes par ultracentrifugation sur des gradients de densité de chlorure de césium (CsCl, Sigma). Dans un premier temps, un gradient discontinu est constitué dans un tube en polypropylène (Beckman) avec 2 mL de CsCl à 1,40 mg/mL et 2 mL de CsCl à 1,25 mg/mL. Ensuite, 8 mL de surnageant contenant le virus précédemment amplifié sont ajoutés à ce gradient. En général, 3 tubes sont nécessaires pour purifier l'intégralité du surnageant. Les tubes sont ensuite placés dans des godets pour être centrifugés pendant 2 h à 35 000 rpm à 18°C avec un rotor SW41T (Beckman). Après la centrifugation, des bandes blanches, contenant le virus concentré, apparaissent : celle en haut du tube correspond aux capsides vides et celle en dessous correspond aux virus. Afin de récupérer les virus, une aiguille 21G associée à une seringue est utilisée pour percer le tube au niveau de la bande d'intérêt. Environ 1 mL de virus est ainsi récupéré puis placé dans un second tube en polypropylène (Beckman) sur lequel sont ajoutés environ 12 mL de CsCl à 1,34 mg/mL. Le tube est ensuite centrifugé pendant 18 h à 35 000 rpm à 18°C avec un rotor SW41T (Beckman). A la suite de la centrifugation, une bande blanche contenant le virus concentré est récupérée comme précédemment. Le virus est dialysé dans des cassettes (Slide-A-Lyzer Dialysis cassettes, 10K MWCO; Thermo Scientific), préalablement réhydratées, dans 500 mL de PBS. Deux dialyses sont effectuées en immergeant la cassette dans 500 mL de PBS sous agitation, tout d'abord pendant 2 h, puis de nouveau dans 500 mL de PBS pendant 3 h. La cassette est ensuite placée toute la nuit dans une solution de PBS contenant 10 % de glycérol (Euromedex). Le lendemain, le virus est récupéré et stocké à -80°C.

### **C) Marquage du virus**

Les virus sont conjugués à un fluorochrome Alexa Fluor A488 en utilisant le kit Micro scale protein labeling (A30006, Invitrogen). Pour cela, 100 µL de virus sont mélangés avec 12 µL de solution 1 M Na-bicarbonate pH 8,3 (fourni dans le kit) et avec 2 µL du fluorochrome préalablement dilué dans 10 µL de DMSO. Ce mélange est laissé sous agitation pendant 15 min à température ambiante. En parallèle, la colonne qui servira à retirer l'excès de fluorochrome est préparée. Pour cela, 800 µL de résine (fournie dans le kit) est équilibrée avec 400 µL de PBS avec 10 % de glycérol. Le mélange contenant le virus est alors filtré par

passage dans la colonne, une centrifugation 2 min à 1 500 rpm permet de récupérer le virus marqué qui sera stocké à -80°C.

#### **D) Quantification du virus**

Les virus sont quantifiés par mesure de la densité optique (DO) à 260 nm afin de déterminer la quantité d'ADN présent et d'estimer le nombre de particules physiques (pp/ $\mu$ L). Ils sont également titrés par la méthode des plages de lyses qui permet de déterminer le nombre de particules infectieuses (pfu : plaque forming units). On estime que l'infection avec 100 pp équivaut à 1 pfu.

##### Quantification par DO

Les virus sont dilués au 1/10 dans un tampon de lyse (10 mM Tris pH 7,4, 0,1 % SDS et 1 mM EDTA) et incubés 10 min à 56°C. La DO à 260 nm est mesurée, et le nombre de particules physiques est estimé par cette formule : 1 unité de DO =  $10^{12}$  pp / mL (Mittereder et al., 1996)

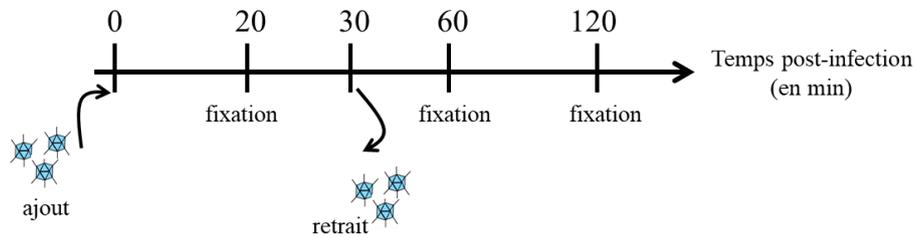
##### Quantification par plage de lyse

Des plaques 6 puits sontensemencées avec  $1 \times 10^6$  cellules par puits de cellules HEK293- $\alpha v \beta 5$  et sont infectées le lendemain avec différentes quantités de virus exprimé en pp (0,01 ou 0,1 ou 1). Le lendemain, un lavage en PBS est effectué. Un milieu de culture est préparé contenant 1 % agarose (Fisher), préalablement chauffé à 70°C. Ce milieu, une fois légèrement refroidi, est ajouté aux cellules qui sont à nouveau incubées à 37°C. Environ 7 à 9 jours après l'ajout d'agarose, le nombre de plage de lyse est quantifié par microscopie. Chaque plaque correspond à 1 virus infectieux, et permet de calculer le nombre de pfu contenu dans la solution stock de virus utilisé.

#### **E) Infection synchronisée**

L'infection par l'AdV s'effectue à 37°C dans un volume restreint de milieu afin de favoriser le contact entre le virus et les cellules. Ainsi le volume de DMEM utilisé pour l'infection représente la moitié du volume utilisé pour la culture cellulaire. Dans certains cas (principalement les cinétiques d'infection), l'infection avec le virus est synchronisée 30 min post-infection, afin d'éviter que de nouvelles particules virales entrent dans la cellule après ces 30 min. Pour cela, le virus est ajouté aux cellules, et 30 min après le milieu de culture est remplacé par du DMEM complet. Ces 30 min sont comprises dans le temps d'infection qui est

considéré à partir du moment où le virus est ajouté aux cellules. Ainsi, si le temps d'infection est de 30 min les cellules sont directement lysées ou fixées, si le temps d'infection est supérieur à 30 min le milieu de culture est remplacé par du DMEM complet jusqu'au temps désiré. Le schéma de la **figure 29** représente un exemple de cinétique d'infection, où les cellules sont fixées 20 min, 60 min et 120 min après l'infection.



**Figure 29: Infection synchronisée**

Les expériences où une infection synchronisée est réalisée seront précisées par la suite. Pour les autres expériences, le virus est retiré au temps indiqué.

### III- Quantification de l'expression d'ARNm par RT-qPCR

#### A) Infection et extraction d'ARN totaux

Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits et le lendemain, elles sont transfectées avec le poly IC (Invivogen, selon le protocole décrit partie I-B) et infectées de façon synchronisée (voire partie II-E), sauf dans les cas de co-transfection avec le poly IC où l'infection n'est pas synchronisée. L'infection se fait, sauf indication contraire avec 5 000 pp/c de virus. Trois heures après l'infection (sauf dans le cas de la cinétique) les cellules sont lavées dans 1 mL de PBS. Les ARN totaux sont extraits avec le kit d'extraction « Nucleospin RNA » (Machery Nagel) en suivant les indications du fournisseur. La quantité d'ARN extraite est déterminée par mesure de la DO à 260 nm (Nanodrop).

L'intégrité des ARN est vérifiée en analysant, selon le protocole du fournisseur, 100 ng/μL de l'échantillon grâce à des puces ARN (Agilent RNA 600 Nanokit) qui indiquent un RIN (=RNA integrity number ; correspondant au ratio entre l'ARN 18S et l'ARN 26S). Plus ce RIN est proche de 10, plus l'intégrité de l'ARN est bonne.

### B) Reverse Transcription (RT)

L'étape de transcription inverse est effectuée selon les conditions détaillées dans le **tableau 7**. Pour chaque échantillon d'ARN, la même réaction est réalisée sans RT pour vérifier l'absence de contamination par l'ADN génomique.

Réactifs	Volume / quantité final	Fournisseur
FS Buffer 5x	10 µL	Thermo Fisher
DTT 1M	1 µL	Thermo Fisher
RT Superscript III	1 µL	Invitrogen
Poly dT 2,5 µg/µL	1,4 µL	Eurofins
dNTP 10 mM	1 µL	Promega
ARN	1 µg	
H <sub>2</sub> O DEPC	qsp 50 µL	

**Tableau 7: Mélange réactionnel pour la RT**

Les tubes sont alors placés dans le thermocycler (Mastercycler gradient, eppendorf) et suivent le programme de RT indiqué ci-dessous :

- 30 min à 50°C
- 30 min à 55°C
- 15 min à 70°C

Les ADN complémentaires (ADNc) obtenus sont dilués dans 50 µL H<sub>2</sub>O DEPC et sont stockés à -20°C.

### C) PCR quantitative (qPCR)

La PCR quantitative est effectuée grâce à l'agent intercalant fluorescent SYBR Green® (Quanta Bioscience) et à des couples d'amorces spécifiques pour chaque gène d'intérêt comme indiqué dans le **tableau 8**.

ARN cible	séquence
IFNβ	<b>Sens</b> : TCC AAA TTG CTC TCC TGT TG <b>Anti-sens</b> : GCA GTA TTC AAG CCT CCC AT
β-2-microglobuline	<b>Sens</b> : TGC TGT CTC CAT GTT TGA TGT ATC T <b>Anti-sens</b> : TCT CTG CTC CCC ACC TCT AAG T
E1A	<b>Sens</b> : GGC TCA GGT TCA GAC ACA GGA CTG TAG <b>Anti-sens</b> : TCC GGA GCC GCC TCA CCT TTC
Hexon	<b>Sens</b> : GCC CCA GTG GTC TTA CAT GCA CAT C <b>Anti-sens</b> : GCC ACG GTG GGG TTT CTA AAC TT

**Tableau 8 : Liste des amorces utilisées pour la qPCR**

Un mélange réactionnel est préparé pour chaque gène d'intérêt en suivant les conditions du **tableau 9**.

Réactifs	Volume finale	Fournisseur
SYBR Green®	10 µL	Quanta Bioscience
H <sub>2</sub> O	1 µL	
Amorce sens 10 µM	2 µL	Eurofins
Amorce anti-sens 10 µM	2 µL	Eurofins

**Tableau 9 : Mélange réactionnel pour la qPCR**

Quinze µL du mélange réactionnel sont placés dans les puits d'une plaque 96 puits (Biorad) et 5 µL d'ADNc préalablement dilués sont ajoutés. La plaque est recouverte d'un film adhésif (Biorad) et placée dans le thermocycler CFX96 (Biorad).

Le programme de qPCR utilisé est le suivant :

- 10 min à 95°C
  - 10 sec à 95°C
  - 30 sec à 60°C
  - 20 sec à 72°C
  - 30 sec à 95°C
  - 1 min à 50 °C (+ 0,5°C par cycle jusqu'à 95°C)
- } 45 cycles

Les valeurs de température de fusion ( $T_m$  : melting temperature) et de seuil de détection de la fluorescence ( $C_t$  : cycle threshold) sont analysés grâce au logiciel CFX Manager (Biorad).

La quantité relative d'ARNm est calculée par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak and Schmittgen, 2001).

Pour cela, la valeur de  $C_t$  pour une condition donnée est normalisée par la valeur de  $C_t$  du gène de ménage. Ce ratio est par la suite normalisé par la condition non infectée, afin d'obtenir le taux d'induction de l'expression de l'ARNm concerné. Par exemple, la formule utilisée dans le cas de l'étude de l'IFN $\beta$  est :

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-[(C_t \text{ IFN}\beta - C_t \beta 2m) \text{ cellule infectée} - (C_t \text{ IFN}\beta - C_t \beta 2m) \text{ Non Infectée}]}$$

Le ratio ainsi obtenu est reporté dans le logiciel PRISM afin d'obtenir le graphique représentant le taux d'induction (voire partie VII).

#### IV- Analyse des protéines par western blot

##### **A) Infection et lyse**

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits, puis le lendemain sont infectées de façon synchronisée, généralement avec 5 000 pp/c (voir partie II-E) ou traitées avec les contrôles positifs. Au temps désiré, les cellules sont lavées dans 1 mL de PBS, puis sont décollées avec 1 mL de PBS contenant 0,6 mM EDTA. Les cellules sont alors centrifugées 5 min à 4°C à 5 000 g puis le culot est repris dans 160 µL d'IP Buffer (25 mM Tris pH7,4 ; 150 mM NaCl ; 1mM EDTA pH8 ; 5 % glycérol ; 1 % NP40 ; 1 mM PMSF). Pour les études de phosphorylation des inhibiteurs de phosphatase sont ajoutés à ce tampon (Inhibiteur 1 et 2, Sigma). La lyse s'effectue alors pendant 10 min dans la glace et les cellules sont centrifugées 10 min à 21 000 g à 4°C. Suite à cela le surnageant composé des protéines (lysate clair) est récupéré et stocké à -20°C.

La méthode de Bradford est utilisée pour quantifier la concentration en protéines dans le lysate cellulaire (Bradford, 1976). Pour cela, une courbe étalon avec une concentration connue de BSA (allant de 0 à 20 µg dans un volume final de 800 µL) est préparée. En parallèle, 2 µL du lysate est dilué dans un volume final de 800 µL de PBS. Le réactif de Bradford (Bradford assay, Biorad) est alors ajouté pour compléter le volume à 1 mL. La réaction s'effectue pendant 5 min dans l'obscurité. La DO à 595 nm est alors mesurée et la quantité de protéine présente dans le lysate est calculée en fonction de la courbe étalon.

##### **B) Electrophorèse en gel d'acrylamide dénaturant et réducteur (SDS-PAGE)**

La quantité désirée de protéine est alors dénaturée dans un tampon de charge (50 mM Tris pH 6,8, 2 % SDS, 10 % Glycérol, 1 % β-mercaptoéthanol, 0,05 % bleu bromophénol) puis chauffée 5 min à 100°C avant d'être déposée sur gel SDS-PAGE discontinu.

Le gel de concentration est constitué de 4% d'acrylamide (37.5:1, 40%, MP Biomedicals) dans un tampon de concentration (125 mM Tris pH 6.8 et 0,1 % SDS). Le gel de séparation utilisé contient 10 % d'acrylamide dans un tampon de séparation (375 mM Tris pH 8.8 et 0,1 % SDS). Pour la polymérisation du gel de l'APS (ammonium persulfate, Euromedex) et du TEMED (Tetraméthylethylènediamine, Euromedex) sont ajoutés.

La migration s'effectue dans des cuves Biorad à voltage constant (90 V) dans un tampon de migration TGS (Tris-Glycine-SDS: 25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glycine, 1 % SDS). Un marqueur de taille (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder; Thermo Scientific) est également déposé.

### C) Transfert sur membrane de nitrocellulose

Une fois la migration des échantillons finie, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0,2  $\mu$ m (Amersham Protran, GE Healthcare). Pour cela, le gel d'acrylamide et la membrane sont déposés entre des papiers Whatman (3 MM CHR, GE Healthcare). Ces différents éléments sont préalablement placés dans le tampon de transfert (192 mM glycine, 25 mM Tris pH 8,5, 0,01 % SDS, 15 % éthanol) avant d'être assemblés entre 2 éponges pour le transfert. Le système est alors installé dans une cuve de transfert liquide (Biorad) et le transfert s'effectue à ampérage constant (600 mA) pendant 1 h 30. L'efficacité de transfert est vérifiée par coloration au rouge Ponceau puis les membranes sont décolorées à l'eau.

### D) Western blot

Les membranes sont saturées pendant 30 min, dans un tampon de saturation composé de TBS (Tris-Buffer-Saline: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM Tris pH 7.4) avec 0,1 % Tween20 (Euromedex) et 10 % de lait en poudre écrémé (Régilait). Pour certains anticorps, le lait est remplacé par 5 % de BSA (Euromedex) (précisé dans le **tableau 10**). Les membranes sont ensuite incubées toute la nuit avec les anticorps primaires dilués dans 5 mL de tampon de saturation, sous agitation à 4°C.

Protéine	Source	Dilution	Fournisseur / Référence
Actine	Souris	1/2000	Merck Millipore / ab1501
mCherry / RFP	Rat	1/1000	Chromotek
STING	Lapin	1/1000	Sigma / SAB1306550
p-TBK1 S172 (BSA)	Lapin	1/1000	Cell Signaling / 5483
TBK1 (BSA)	Lapin	1/1000	Cell Signaling / 3504
p-IRF3 S396 (BSA)	Lapin	1/1000	Cell Signaling / 4947
IRF3	Lapin	1/1000	Cell Signaling / 11904
p-p65 S536 (BSA)	Lapin	1/1000	Cell Signaling / 3031
p65	Lapin	1/1000	Cell Signaling / 8242
p-AMPK T172 (BSA)	Lapin	1/1000	Cell Signaling / 2535
AMPK	Lapin	1/1000	Cell Signaling / 2532
Galectine 8	Lapin	1/ 500	Abcam / ab42879
Galectine 9	Lapin	1/500	Abcam / ab69630
NDP52	Lapin	1/1000	Abcam / ab68588
Tax1BP1	Lapin	1/1000	Cell Signaling / 5105
p62	Souris	1/500	BD Transduction laboratories / 610832
LC3	Lapin	1/2000	Novusbio / NB100-2220
TRIM16	Lapin	1/1000	Proteintech / 24403-1-AP
TRIM21	Lapin	1/1000	Proteintech / 12108-1-AP
TRIM23	Lapin	1/10000	Abcam / ab192032
TRIM27	Lapin	1/1000	Proteintech / 12205-1-AP

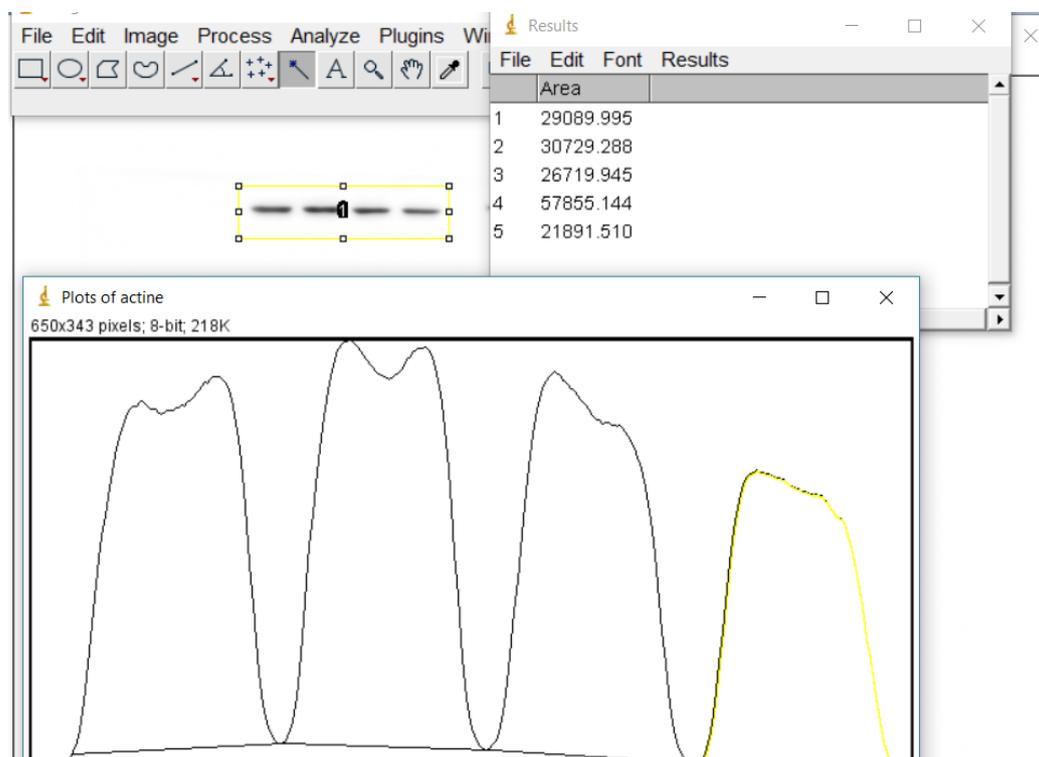
**Tableau 10: Anticorps utilisés pour les western blot**

Le lendemain, les membranes sont lavées 3 fois avec du TBS contenant 0,1 % Tween20 pendant environ 20 min. Puis, elles sont incubées pendant 1 h avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase (Jackson Immuno Research) qui sont dilués au 1/10000<sup>ème</sup> dans du tampon de saturation. Les membranes sont de nouveau lavées 3 fois avec du TBS contenant 0,1 % Tween20. Puis un dernier lavage par du TBS est réalisé.

### E) Révélation et quantification

Les membranes du western blot sont révélées par chimioluminescence (ECL Femto, Fisher), avec la caméra LAS4000 (GE Healthcare). Le temps d'exposition est choisi en fonction de l'intensité du signal.

Les images obtenues sont ensuite analysées avec le logiciel Image J et l'intensité des signaux est déterminée. Pour cela, les bandes d'intérêt sont sélectionnées (rectangle jaune), puis le profil des bandes est analysé afin d'adapter le bruit de fond. Par la suite, l'intensité de chaque bande est mesurée, puis normalisée avec l'intensité de la bande du contrôle de charge (**Figure 30**).



**Figure 30: Utilisation du logiciel Image J pour quantifier l'intensité des signaux de western blot**  
 Les bandes à quantifier sont sélectionnées (rectangle jaune), puis le profil des bandes est analysé (Analyse : plot profil), un bruit de fond uniforme est alors appliqué (Process : subtract background). Un fichier contenant les profils des pics est obtenu (Analyse : select lane, puis Analyse : plot lane). L'aire de ces pics est mesurée (wand tool) puis sera normalisée par l'aire des pics du contrôle de charge.

#### V- Transduction et cytométrie en flux

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits. Le lendemain les cellules sont, si nécessaire, prétraitées pendant 3 h avec les inhibiteurs, puis transduites généralement avec 50 pp/c des vecteurs WT-GFP et M1-GFP. Si des inhibiteurs sont utilisés, ils sont ajoutés dans le DMEM dès que le milieu est changé. Trois heures après l'infection, le milieu de culture est changé et les cellules laissées toute la nuit dans l'incubateur à 37°C. Le lendemain, les cellules sont lavées avec du PBS, puis sont décollées avec 200 µL de trypsine/EDTA. La plaque est laissée quelques minutes à 37°C, puis les cellules sont reprises avec 300 µL de PBS

contenant 0,6 mM EDTA et placées dans des tubes adaptés pour la cytométrie en flux (Tubes FACS, Falcon).

Le pourcentage de cellules positives pour la GFP est dénombré avec le FACS Canto I® (BD Bioscience). Cet équipement est disponible à la plateforme de cytométrie en flux (SFR Transbiomed, Bordeaux). Pour chaque condition 10 000 cellules sont analysées, et les expériences sont réalisées en triplicat.

## VI- Immunofluorescence

### A) Infection et fixation

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 12 puits sur des lamelles de verre de 15 mm de diamètre. Le lendemain, les cellules sont infectées de façon synchronisée (voir partie II-E). Pour cela, 100 µL de DMEM contenant le virus sont ajoutés directement sur les lamelles. Selon les expériences, des contrôles positifs tels que le poly IC ou le TNF $\alpha$  sont utilisés (voir partie I-B et I-D respectivement). Les lamelles sont placées dans l'incubateur à 37°C. Trente minutes après l'infection les lamelles sont à nouveau déposées dans la plaque de culture contenant du DMEM et replacées à 37°C. Au temps désiré, les cellules sont lavées dans du PBS, puis fixées pendant 10 min avec 100 µL de 4 % paraformaldéhyde (PFA-EM Grade, Delta microscopie). Les lamelles sont lavées avec du PBS et peuvent être stockées dans du PBS à 4°C jusqu'à l'immunofluorescence.

### B) Immunofluorescence

Les cellules sont perméabilisées pendant 15 min dans 50 µL de tampon IF (10 % SVF, 0,05 % Saponine dans du PBS), à température ambiante. En parallèle les anticorps primaires (**tableau 11**) sont dilués dans ce tampon puis sont centrifugés pendant 10 min à 21 000g à 4°C et le surnageant est déposé sur les lamelles qui sont laissées pendant 1 h à 37°C en chambre humide.

Protéine	Source	Dilution	Fournisseur / Référence
p-TBK1 S172	Lapin	1/50	Cell Signaling / #5483
IRF3	Lapin	1/400	Cell Signaling / #11904
p65	Lapin	1/400	Cell Signaling / #8242
Galectine 8	Chèvre	1/20	R&D system / AF1305
VI	Souris	1/200	Produit au laboratoire
Hexon	Souris	1/500	Santa Cruz / 8c4
TRIM23	Lapin	1/50	Proteintech / 12607-1-AP

**Tableau 11: Anticorps utilisés pour les immunofluorescences**

Les lamelles sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS, et pendant ce temps les anticorps secondaires couplés avec des fluorochromes (Alexa Fluor, Invitrogen) sont dilués au 1/300<sup>ème</sup> dans le tampon IF et centrifugés pendant 10 min à 21 000 g à 4°C avant d'être utilisés. Les différents fluorochromes utilisés sont A488, A555 et A647.

Les lamelles sont incubées pendant 1 h à 37°C en chambre humide avec les anticorps secondaires. Les lamelles sont de nouveau lavées 3 fois par du PBS. Puis, elles sont immergées dans des bains successifs de PBS, d'eau distillée et d'éthanol absolu. Les lamelles sont séchées à température ambiante puis sont fixées sur une lame avec du milieu de montage (mounting medium, DAKO) contenant 1 µg/mL de DAPI (Sigma). Les lames sont conservées à l'abri de la lumière jusqu'à l'observation au microscope.

### C) Acquisition et analyse

Les lames sont observées soit avec un microscope à épi-fluorescence (Leica DMI 6000B, associé à une caméra Hamamatsu camera C11440 ORCA-Flash2.8) pour les études de translocation, soit avec un microscope confocal (Leica SP5) pour les études de colocalisation, ce dernier étant disponible à la plateforme d'imagerie (BIC, Bordeaux).

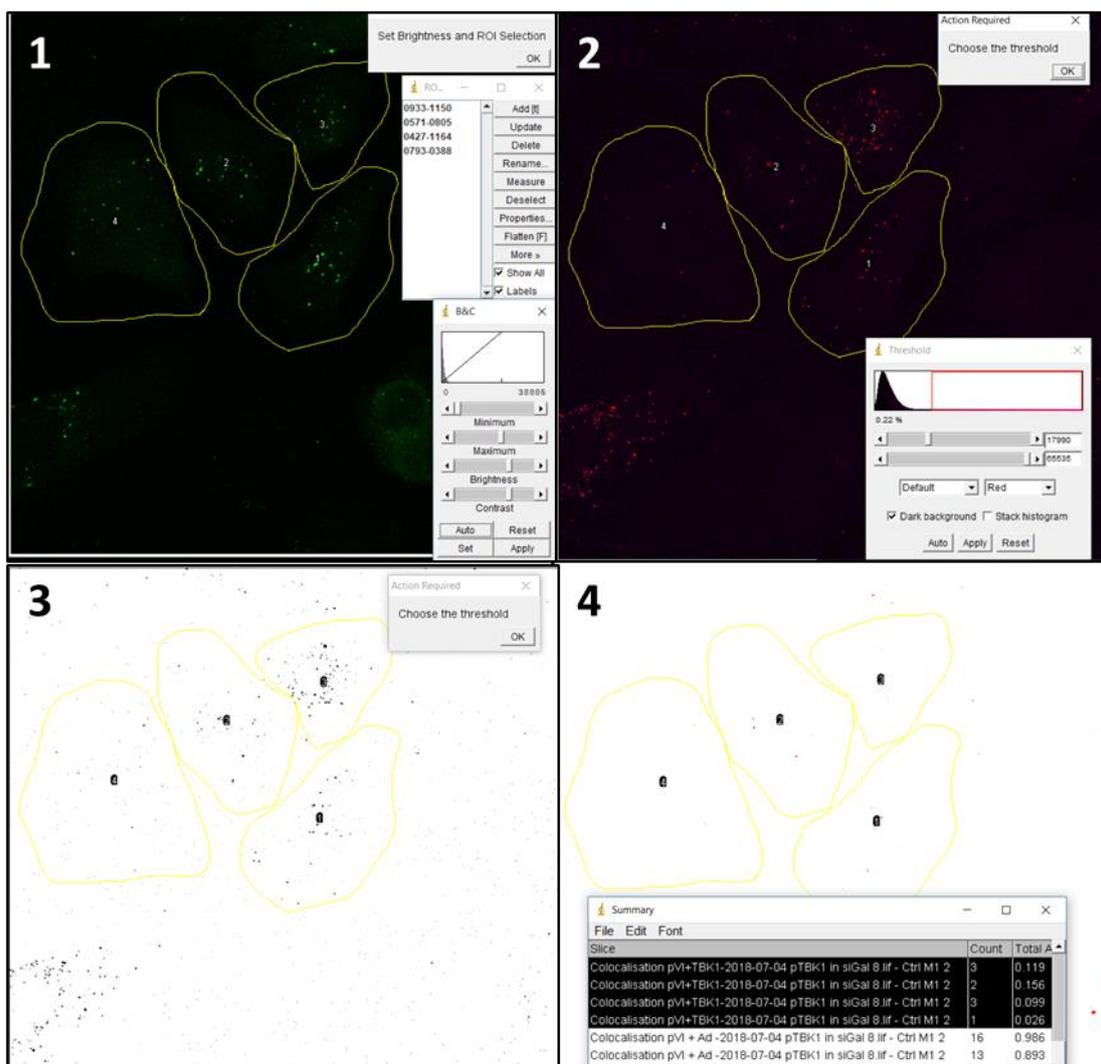
Les images de microscopie confocale sont prises au format 2048 x 2048 avec une taille de pixel de 72 nm et une résolution de 16 bits. Des plans focaux de 0,3 µm sont réalisés (environ 10 par cellules) avec un pinhole fixé à 1 AU.

Les images sont analysées avec le logiciel Image J, à partir duquel des macros sont réalisées pour automatiser le procédé de quantification des colocalisations.

Pour effectuer ces analyses, les plans focaux sont rassemblés sur une seule projection (Z-projection) et chaque canal de couleur est analysé séparément. Des régions d'intérêts

(ROI) sont dessinées manuellement et permettent de définir chaque cellule à analyser, ces ROI sont reportées automatiquement sur chaque canal de couleur. Dans un premier temps, un seuil est appliqué à l'image afin de distinguer les signaux d'intérêts. La macro dénombre alors les objets d'intérêt, en fonction des conditions de pixel fixées (par exemple pixel supérieur à 5 pour les particules virales, et pixel supérieur à 10 pour la galectine 8).

Un masque (image binaire) est automatiquement créé à partir de ce réglage. Pour les études de colocalisation, le signal de 2 masques différents est combiné et les signaux communs aux deux sont dénombrés (**Figure 31**). Un minimum de 30 cellules est analysé pour chaque condition.



**Figure 31 : Utilisation du logiciel Image J pour quantifier les colocalisations**

1 : Les régions d'intérêts (ROI) sont définies manuellement autour de chaque cellule (en modifiant le contraste) et ajoutées dans le « ROI manager ». 2 : un seuil est appliqué manuellement sur les ROI précédemment définies pour chaque canal de l'image. 3 : Pour chaque canal un masque est créé à partir du seuil précédemment défini et des conditions précisées dans la macro. 4 : La combinaison de deux masques permet de définir le nombre de colocalisations dans chaque ROI, ce nombre est automatiquement reporté dans un tableau.

## VII- Graphiques et Statistiques

Les graphiques et analyses statistiques sont effectués grâce au logiciel GraphPad Prism 6.

Les résultats de quantification de RT-qPCR et de western blot sont présentés sous forme d'histogramme. La barre d'erreur indique l'erreur à la moyenne (SEM : standard error to the mean). Les résultats de quantification d'IF sont représentés sous forme de nuages de points. Dans ce cas, toutes les données sont représentées, une barre d'erreur représente la moyenne entourée de 2 petites barres correspondant à l'écart de SEM.

Pour les études statistiques, un test one-way ANOVA est appliqué, suivi d'un post-test de Tukey's, et les données indiquées sur le graphique correspondent aux valeurs suivantes :

n.s = non significatif, \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ .



## **RESULTATS**



## CHAPITRE 1

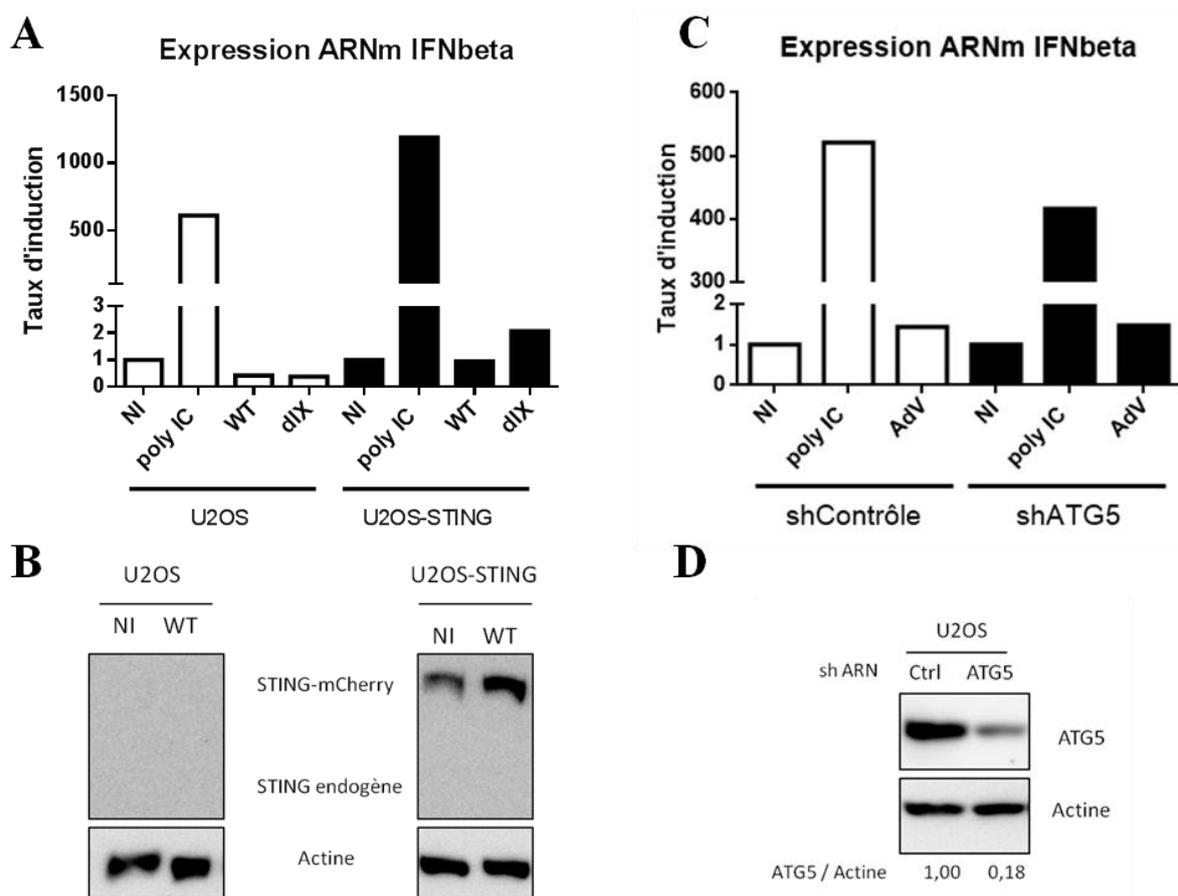
### Etude de l'expression d'interféron $\beta$ au cours de l'infection par l'Adénovirus

Les AdV sont décrits comme de puissants inducteurs de la réponse immunitaire, ce qui complique leur utilisation comme vecteurs en thérapie génique (Sharon and Kamen, 2018) et favorise leur rôle en tant qu'adjuvants (Vujadinovic and Vellinga, 2018). Il a ainsi été mis en évidence que les AdV induisent l'expression d'interféron bêta (IFN $\beta$ ), notamment suite à la détection d'ADN viral dans le cytoplasme par la voie cGAS/STING (Lam et al., 2014). Cependant, ces études sont pour la plupart menées avec des cellules immunitaires, le plus souvent murines, et infectées avec de fortes doses virales. Pour se rapprocher davantage de la réalité physiologique, nous avons choisi d'étudier l'expression d'IFN $\beta$  dans un modèle cellulaire humain cible de l'infection par l'AdV (des cellules épithéliales et fibroblastes) et infecté avec des doses virales limitées. Nous avons voulu savoir si, comme décrit par d'autres équipes lors d'infections de souris et de cellules murines (Fejer et al., 2008 ; Nociari et al., 2007), la rupture membranaire induite par le virus constitue un signal de danger détecté par la cellule pour activer l'expression d'IFN $\beta$ .

#### I- Expression d'IFN $\beta$ dans des cellules non immunitaires

##### A) Etude dans la lignée cellulaire U2OS

Pour évaluer l'activation de l'IFN $\beta$  induite par l'AdV, des cellules U2OS sont infectées pendant 3 h avec 5 000 pp/c (particules physiques par cellule) d'AdV sauvage (WT) non réplicatif. La quantité d'ARN messager (ARNm) de l'IFN $\beta$  est déterminée par RT-qPCR. La quantité relative d'ARNm de l'IFN $\beta$  est déterminée par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  en utilisant le gène de référence de la  $\beta$ -2-microglobuline et en effectuant une normalisation par les cellules non infectées qui servent de contrôle négatif. La transfection de 2  $\mu$ g/mL de poly IC, analogue d'ARN double brin, connu pour induire une forte expression d'IFN $\beta$ , est le contrôle positif de l'expérience (Jiang et al., 2014) (**Figure 32A**). Nos résultats montrent que le poly IC induit bien l'expression d'IFN $\beta$  dans nos conditions expérimentales. En revanche, l'infection des cellules U2OS par l'AdV ne permet pas de détecter l'expression d'IFN $\beta$  par rapport aux cellules non infectées.



**Figure 32: Etude de l'expression d'IFN $\beta$  dans les lignées U2OS sauvages et modifiées**

(A) Les cellules U2OS et U2OS-STING sont transfectées pendant 3 h avec 2  $\mu\text{g/mL}$  de poly IC ou infectées pendant 3 h avec 5 000 pp/c d'Adv sauvage (WT) ou du mutant delta IX (dIX). Les ARN totaux sont extraits et analysés par RT-qPCR pour les gènes de l'IFN $\beta$  et de la  $\beta$ 2-microglobuline. Les valeurs de Ct sont normalisées par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  avec la condition non infectée. (B) Les cellules U2OS et U2OS-STING sont lysées et l'expression de STING est analysée par western blot. L'actine sert de contrôle de charge. (C) Les cellules U2OS-shContrôle et U2OS-shATG5 sont transfectées pendant 3 h avec 2  $\mu\text{g/mL}$  de poly IC ou infectées pendant 3 h avec 5 000 pp/c d'Adv sauvage (WT). Les ARN totaux sont extraits et analysés par RT-qPCR pour les gènes de l'IFN $\beta$  et de la  $\beta$ 2-microglobuline. Les valeurs de Ct sont normalisées par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  avec la condition non infectée. (D) Les cellules U2OS-shContrôle et U2OS-shATG5 sont lysées et l'expression d'ATG5 est analysée par western blot. L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes ATG5 et actine est mesurée et le rapport ATG5/actine est calculé.

Ce défaut d'expression d'IFN $\beta$  en présence d'AdV pourrait s'expliquer par l'absence de facteurs cellulaires nécessaires à cette activation. En effet, comme de nombreuses lignées cellulaires, les U2OS sont fortement modifiées génétiquement et n'expriment pas certains facteurs clefs de la réponse immunitaire (Laredj and Beard, 2011). Parmi eux, la protéine STING, plateforme nécessaire pour l'activation de la réponse immunitaire par l'ADN cytoplasmique, est absente (Deschamps and Kalamvoki, 2017). Pour savoir si l'absence de STING explique à elle seule le défaut d'activation de la voie IFN $\beta$ , une lignée cellulaire U2OS exprimant la protéine de fusion STING-mCherry a été établie au laboratoire (U2OS-STING). Un western blot a permis de confirmer l'absence de STING dans les cellules U2OS et l'expression de la protéine de fusion dans les cellules U2OS-STING (**Figure 32B**). Afin de tester le rôle de STING dans l'expression d'IFN $\beta$ , des cellules U2OS et U2OS-STING sont infectées pendant 3 h avec 5 000 pp/c d'AdV WT et du mutant dIX qui est caractérisé par l'absence de la protéine IX, une des protéines ciment de la capsid. Ce mutant, moins stable, semble exposer de l'ADN viral dans le cytoplasme (Thèse Irene Carlon-Andrès, **Figure 33A**). Il constituerait donc, dans la lignée U2OS-STING, un contrôle positif pour l'expression d'IFN $\beta$  activée par la voie cGAS/STING en présence d'ADN viral cytoplasmique. L'expression d'IFN $\beta$  est quantifiée dans les cellules U2OS et U2OS-STING par RT-qPCR (**Figure 32A**). Nos résultats montrent, que contrairement au poly IC, l'AdV WT n'induit pas d'expression d'IFN $\beta$  dans les cellules U2OS-STING. De plus, l'infection avec le mutant dIX, malgré l'expression de STING, ne permet pas non plus de détecter une réponse IFN $\beta$  dans ces cellules. Ces données suggèrent que la présence d'ADN viral cytoplasmique n'induit pas l'expression d'IFN $\beta$ . Il semble donc que dans nos conditions expérimentales la voie cGAS-STING ne soit pas activée au cours de l'infection par l'AdV. Ces résultats indiquent que le défaut d'expression d'IFN $\beta$  au cours de l'infection dans les cellules U2OS n'est pas dû à l'absence de la protéine STING. D'autres senseurs de l'immunité pourraient également être absents dans ces cellules et expliquer ce défaut de détection.

Lorsqu'elle est induite, l'expression d'IFN $\beta$  est extrêmement régulée par les cellules pour empêcher une activation excessive de cette réponse immunitaire, un mécanisme de répression cellulaire pourrait donc limiter l'activation de la réponse IFN $\beta$  et la rendre indétectable dans nos conditions expérimentales avec l'AdV.

## B) Implication de l'autophagie

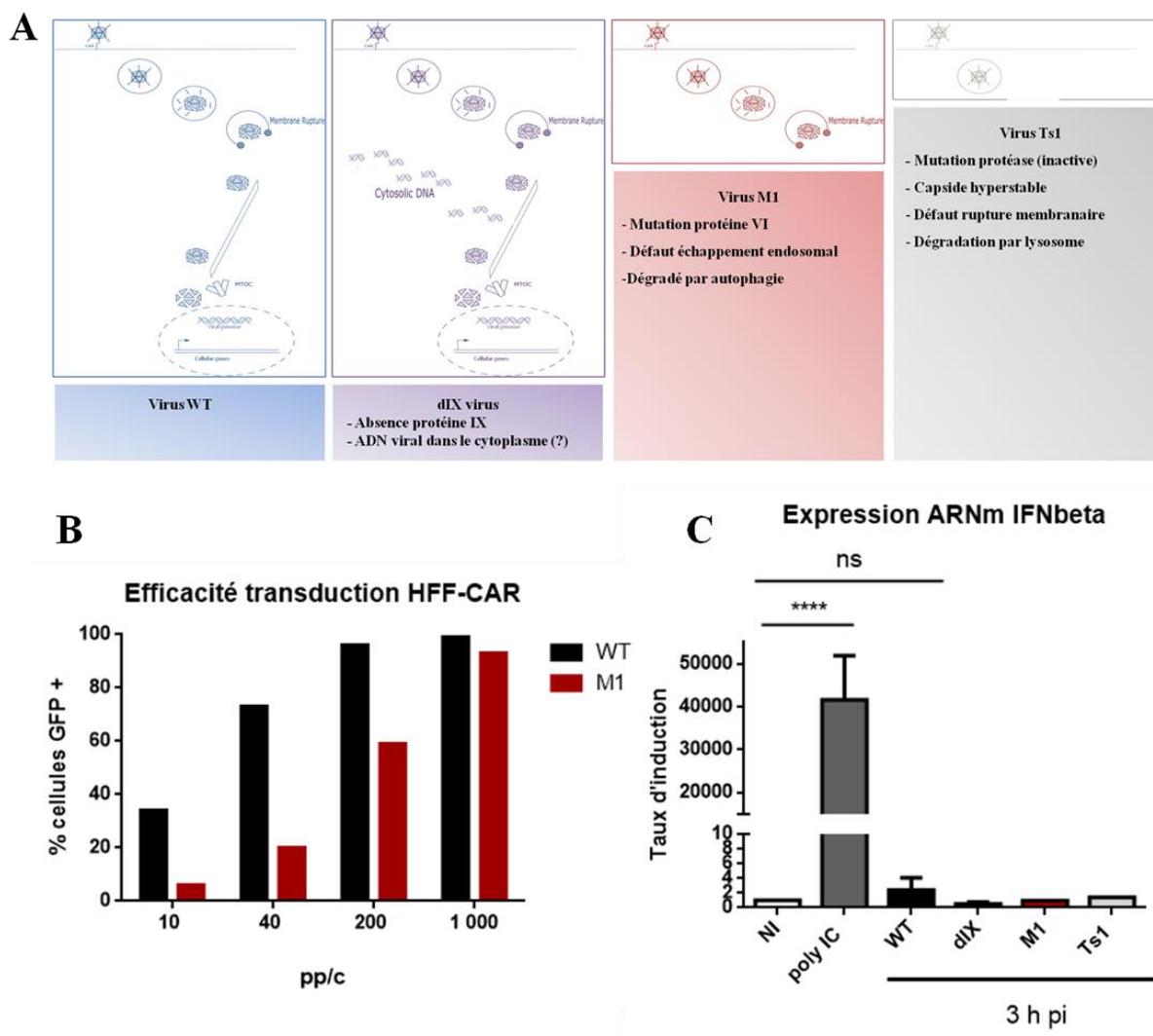
La dégradation de facteurs clefs de la réponse IFN par l'autophagie, tels que la protéine STING, constitue un mécanisme de contrôle cellulaire limitant l'activation de la réponse IFN (Prabakaran et al., 2018). Il est ainsi décrit que l'autophagie peut limiter la réponse IFN. En effet, en absence de la protéine ATG5 (facteur clef de l'activation de l'autophagie, voir chapitre 2 de l'introduction) l'expression d'IFN est augmentée lors de l'infection par le VSV (Jounai et al., 2007). Or, l'AdV active l'autophagie (Montespan et al., 2017) et celle-ci pourrait donc limiter l'expression d'IFN $\beta$ . Pour le savoir, nous avons utilisé une lignée cellulaire U2OS où l'activation de l'autophagie est limitée par déplétion de la protéine ATG5 par ARN interférence (U2OS-shATG5). Le défaut d'expression d'ATG5, dans la lignée U2OS-shATG5 a été vérifié par western blot. Les résultats montrent que la déplétion est partielle avec environ 20 % des protéines toujours exprimées (**Figure 32D**). Des cellules U2OS-shContrôle et des cellules U2OS-shATG5 sont infectées pendant 3 h avec 5 000 pp/c d'AdV WT, puis l'expression d'IFN $\beta$  est détectée par RT-qPCR (**Figure 32C**). Nos résultats montrent que, comme pour les cellules U2OS, l'infection par l'AdV de la lignée U2OS-shATG5 n'induit pas non plus l'expression d'IFN $\beta$ , contrairement au poly IC. Il semblerait donc que l'absence d'expression d'IFN $\beta$  au cours de l'infection ne soit pas due à un rétrocontrôle négatif exercé par l'autophagie.

Malgré l'expression d'IFN $\beta$  activée par le poly IC, aucune induction de cette réponse n'a été détectée au cours de l'infection par l'AdV. Pour savoir si ce défaut d'expression est un mécanisme spécifique de cette lignée, un autre modèle cellulaire a été utilisé.

### II- Expression d'IFN $\beta$ dans des cellules primaires immortalisées

Des fibroblastes humains immortalisés (HFF-CAR) ont été choisis pour étudier l'expression d'IFN $\beta$  en réponse à l'infection. En effet, les fibroblastes sont des cellules couramment utilisées pour les études concernant la réponse immunitaire activée par l'infection virale, notamment par le cytomégalovirus humain (Lee et al., 2006).

Les HFF-CAR présentent également l'avantage d'exprimer le récepteur CAR de l'AdV de type 5, ce qui facilite l'entrée du virus. De plus, ces cellules en tant que fibroblastes constituent la cible primaire de l'infection par l'AdV.



**Figure 33: Etude de l'expression d'IFN $\beta$  dans les cellules HFF-CAR**

(A) Présentation des différents virus et mutants utilisés : le virus WT effectue un cycle viral complet et est infectieux. Le virus dIX présente une capside moins stable dû à l'absence de la protéine IX et semble exposer de l'ADN viral dans le cytoplasme. Le virus M1 présente une mutation de la protéine VI et par conséquent, ne parvient pas à s'échapper de l'endosome rompu et est dégradé par autophagie. Le virus Ts1 présente une capside hyperstable ne pouvant pas induire de ruptures de la membrane endosomale pour s'en échapper. Il est donc dégradé par les lysosomes. (B) Les cellules HFF-CAR sont infectées avec différentes concentrations (en pp/c) de vecteur WT (en noir) et M1 (en rouge) exprimant la GFP. Le pourcentage de cellules infectées est déterminé par cytométrie en flux. (C) Les cellules HFF-CAR sont transfectées pendant 3 h avec 2  $\mu$ g/mL de poly IC ou infectées pendant 3 h avec 5 000 pp/c d'AdV WT (en noir), ou des mutants dIX (en violet), M1 (en rouge) et Ts1 (en gris clair). Les ARN totaux sont extraits et analysés par RT-qPCR pour les gènes de l'IFN $\beta$  et de la  $\beta$ 2-microglobuline. Les valeurs de Ct sont normalisées par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  avec la condition non infectée. n.s = non significatif, \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ .

### A) Validation du modèle expérimental

Afin de valider ce modèle, nous avons, dans un premier temps, déterminé les conditions optimales d'infection pour l'AdV et la permissivité de ces cellules dans nos conditions expérimentales. Dans un second temps, nous avons étudié le comportement du mutant M1, précédemment caractérisé au laboratoire, dans ces cellules. Ce mutant présente un défaut d'infectiosité (Wodrich et al., 2010) dû à sa dégradation par autophagie (Montespan et al., 2017) et nous permet de vérifier la capacité de ces cellules à induire l'autophagie en réponse à l'infection par l'AdV (**Figure 33A**). Pour effectuer cette optimisation, les cellules sont transduites avec différentes quantités de vecteurs AdV WT ou M1 exprimant la protéine GFP. Le pourcentage de cellules exprimant la GFP après transduction est déterminé par cytométrie en flux et permet de mesurer l'infectiosité de ces virus (**Figure 33B**).

Nos résultats montrent que les cellules HFF-CAR sont permissives à l'infection par l'AdV. En effet, en présence de 10 pp/c, 34 % des cellules expriment la GFP. Cette infectiosité augmente de façon dépendante de la dose de virus ajoutée, jusqu'à saturation avec 99 % de cellules exprimant la GFP avec 1 000 pp/c. La transduction avec le mutant M1 met en évidence son défaut d'infectiosité. En effet, contrairement à l'AdV WT, seulement 6 % de cellules expriment la GFP lors de l'infection avec 10 pp/c du virus M1, soit un virus 6 fois moins infectieux. L'infectiosité du mutant M1 augmente de façon dépendante de la dose utilisée mais reste largement inférieure à celle du vecteur WT jusqu'à la saturation à 93 % de cellules positives pour la GFP avec 1 000 pp/c du virus M1. Par comparaison, les cellules U2OS classiquement utilisées dans le laboratoire présentent un taux de transduction plus faible. Par exemple l'infection avec 10 pp/c du WT représente 11 % des cellules transduites (34 % pour les HFF-CAR) et 1,2 % avec le virus M1 (6 % pour les HFF-CAR) (données non montrées).

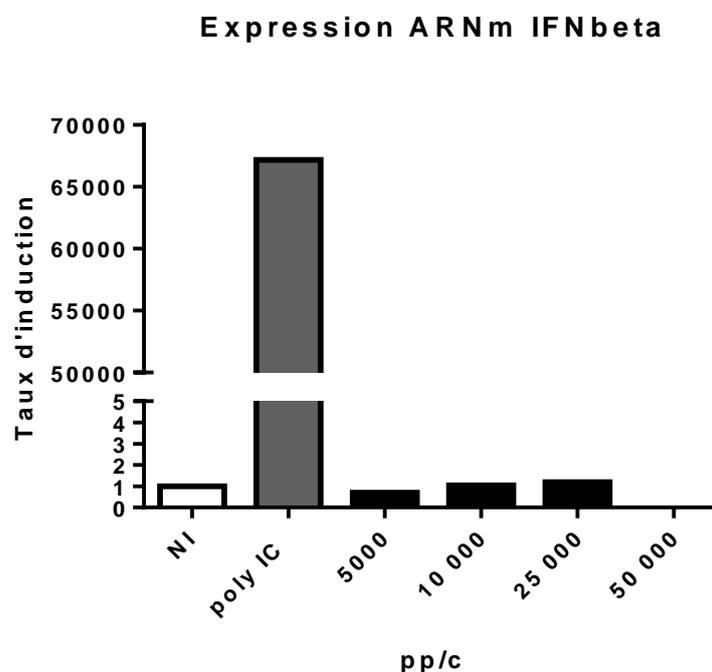
Les cellules HFF-CAR sont donc un bon modèle car elles sont permissives à l'infection par le virus sauvage et reproduisent le défaut d'infectiosité du mutant M1. Il est aussi à noter que ces cellules expriment la protéine STING (données non montrées).

### B) Etude de l'expression d'IFN $\beta$ dans les cellules HFF-CAR

Afin d'analyser l'expression d'IFN $\beta$ , les cellules sont infectées soit avec l'AdV WT, soit avec des mutants permettant de caractériser différentes étapes du cycle viral (**Figure 33A**). Le premier est le mutant dIX qui semble exposer de l'ADN viral dans le cytoplasme. Le second est le mutant M1 qui présente un défaut d'infectiosité dû à sa dégradation par autophagie.

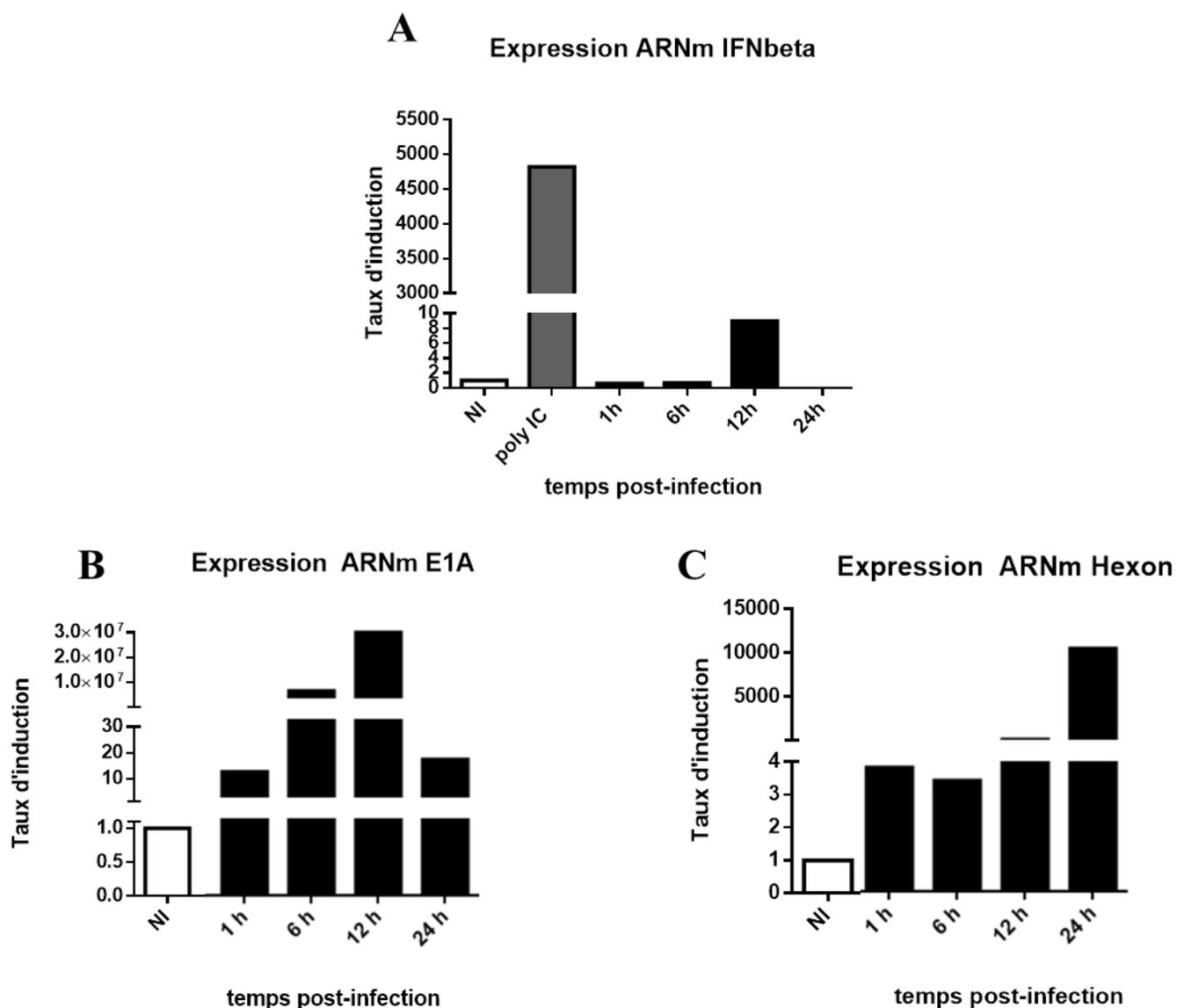
Ce dernier permet de déterminer si l'activation de la réponse IFN $\beta$  est favorisée par cette dégradation (comme décrit dans l'introduction). Le troisième est le mutant hyperstable Ts1 de l'AdV de type 5, qui n'induit pas de rupture membranaire, et permet de déterminer l'impact de ces dommages dans l'activation de la réponse IFN $\beta$ . Les HFF-CAR sont infectées pendant 3 h avec 5 000 pp/c de virus sauvages ou mutants puis l'expression d'IFN $\beta$  est suivie par RT-qPCR (**Figure 33C**). Nos résultats montrent que, contrairement au poly IC, ni le virus sauvage ni les mutants n'induisent l'expression d'IFN $\beta$ .

Nous avons voulu savoir si la quantité de virus utilisée pour l'infection impactait la réponse IFN $\beta$  dans ces cellules, et expliquerait nos résultats précédents. Pour cela, nous avons testé des concentrations croissantes de virus, jusqu'à 50 000 pp/c. En effet, dans la littérature, 20 000 pp/c sont utilisées pour les infections *in vitro* (Stein and Falck-Pedersen, 2012) et  $10^{10}$  particules sont injectées pour les infections *in vivo* de souris (Fejer et al., 2008). Nos résultats montrent que même les doses les plus élevées d'AdV WT n'induisent pas d'expression d'IFN $\beta$  dans les cellules HFF-CAR (**Figure 34**).



**Figure 34: Etude de l'impact de doses croissantes d'AdV sur l'expression d'IFN $\beta$**

Les cellules HFF-CAR sont transfectées pendant 3 h avec 2  $\mu$ g/mL de poly IC ou infectées pendant 3 h à différentes concentrations en pp/c. Les ARN totaux sont extraits et analysés par RT-qPCR pour les gènes de l'IFN $\beta$  et de la  $\beta$ 2-microglobuline. Les valeurs de Ct sont normalisées par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  avec la condition non infectée.



### Figure 35: Etude de l'expression IFN $\beta$ au cours du temps

Les cellules HFF-CAR sont transfectées pendant 3 h avec 2  $\mu\text{g/mL}$  de poly IC ou infectées avec 5 000 pp/c d'AdV WT (en noir). Les ARN totaux sont extraits à différents temps après l'infection et analysés par RT-qPCR pour les gènes de l'IFN $\beta$  (A), d'E1A (B) et de l'hexon (C). Les valeurs de Ct sont normalisées par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  avec la  $\beta 2$ -microglobuline et le contrôle non infecté.

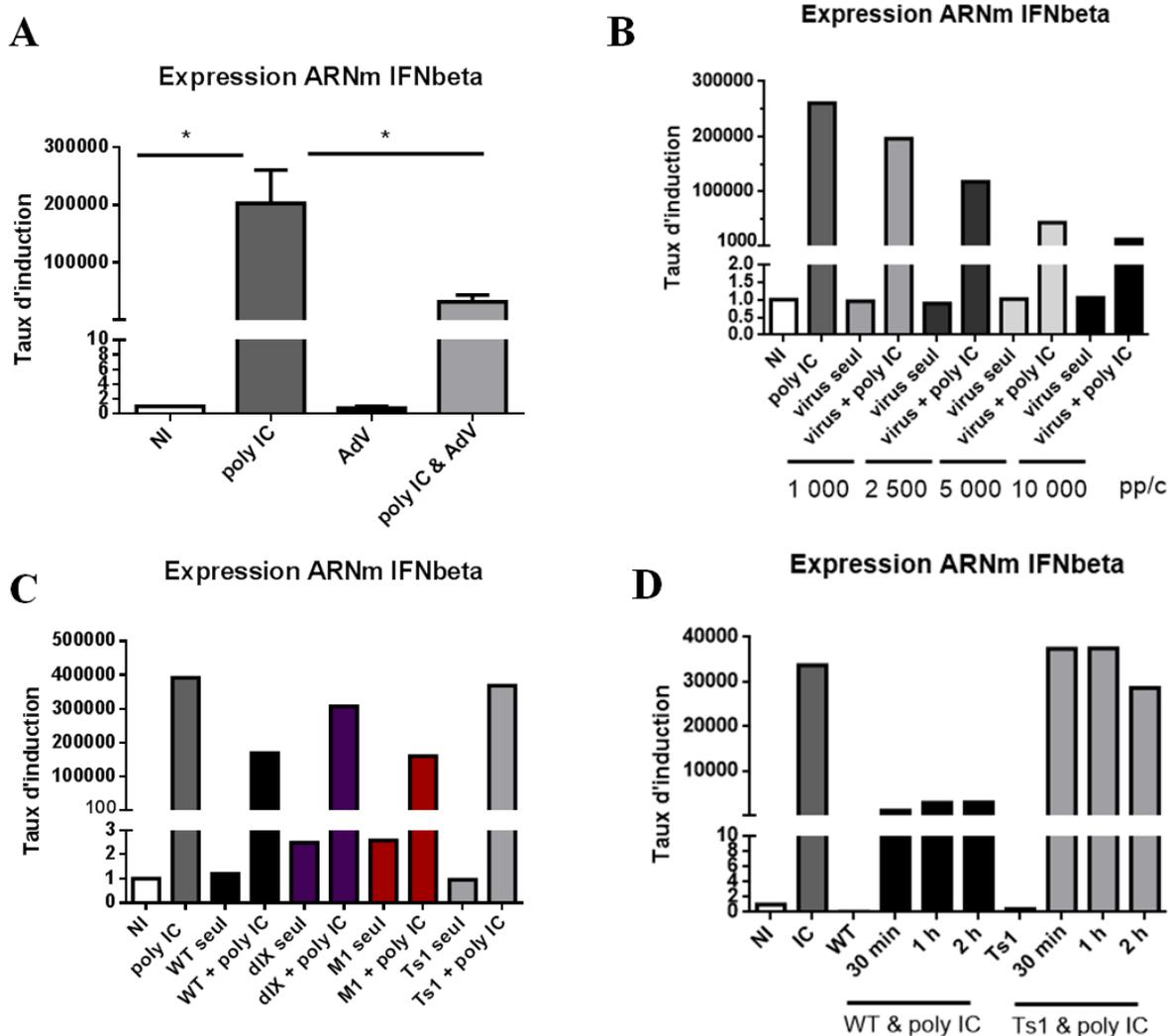
D'autres études suggèrent que l'expression d'IFN $\beta$  en réponse à l'infection nécessite la réplication du virus (Chang et al., 2006). Pour savoir si la réplication de l'AdV est nécessaire pour activer la réponse IFN $\beta$  dans les cellules HFF-CAR, une cinétique d'infection avec un virus répliquatif a été réalisée. Celle-ci a été étendue de 1 h, temps nécessaire pour l'entrée du virus et la libération du génome dans le noyau, à 24 h temps correspondant au début de la libération de nouvelles particules virales. L'expression d'IFN $\beta$  (**Figure 35A**), du gène viral précoce E1A (**Figure 35B**) et du gène viral tardif codant pour l'hexon (**Figure 35C**) a été déterminée par RT-qPCR. Nos résultats montrent la progression du cycle viral au cours de l'infection, avec une expression du gène précoce diminuant après 12 h d'infection alors que l'expression du gène codant pour l'hexon augmente plus tardivement au cours de l'infection. Cependant, quelque soit le temps d'infection analysé, l'expression d'IFN $\beta$  reste limitée voire nulle au cours de l'infection par l'AdV. Nos résultats indiquent que la réplication de l'AdV n'active pas l'expression d'IFN $\beta$  dans nos conditions expérimentales.

L'infection par l'AdV des différentes lignées cellulaires que nous avons utilisées et dans différentes conditions expérimentales ne permet pas de mettre en évidence l'expression d'IFN $\beta$ . Ces résultats peuvent s'expliquer soit par une absence totale d'induction de réponse IFN $\beta$ , soit par un mécanisme d'inhibition de cette réponse par l'AdV, ce qui favoriserait sa réplication.

### III- Effet de l'infection sur l'expression d'IFN $\beta$

Afin de déterminer si l'AdV limite l'activation de la réponse IFN $\beta$ , nous avons analysé l'effet de l'infection sur l'expression d'IFN $\beta$  induite par le poly IC. Pour cela, les cellules HFF-CAR sont transfectées pendant 3 h avec le poly IC en présence du virus. Comme contrôle, les cellules sont soit transfectées pendant 3 h avec du poly IC, soit infectées pendant 3 h avec 5 000 pp/c d'AdV WT non répliquatif (**Figure 36A**). Nos résultats montrent que le poly IC induit bien l'expression d'IFN $\beta$ , contrairement à l'infection seule. En revanche, en présence du virus, l'expression d'IFN $\beta$  induite par le poly IC diminue d'un facteur 8. Ces résultats montrent que l'AdV inhibe l'expression d'IFN $\beta$  induite par le poly IC.

Pour confirmer le rôle de l'infection dans ce contrôle de la réponse IFN $\beta$ , nous avons réalisé la même expérience avec des doses croissantes d'AdV WT (**Figure 36B**).



**Figure 36: Etude de l'impact de l'infection sur l'expression d'IFN $\beta$  induite par le poly IC**

(A) Les cellules HFF-CAR sont transfectées pendant 3 h avec 2  $\mu$ g/mL de poly IC ou infectées 3 h avec 5 000 pp/c d'AdV WT ou combinaison des deux. Les ARN totaux sont extraits et analysés par RT-qPCR pour le gène de l'IFN $\beta$  et de la  $\beta$ 2-microglobuline. Les valeurs de Ct sont normalisées par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  avec la condition non infectée. \* =  $P < 0,05$ . (B) Les cellules HFF-CAR sont transfectées pendant 3 h avec 2  $\mu$ g/mL de poly IC ou infectées 3 h avec différentes concentrations d'AdV WT ou combinaison des deux. Les ARN totaux sont extraits et analysés par RT-qPCR pour le gène de l'IFN $\beta$  et de la  $\beta$ 2-microglobuline. Les valeurs de Ct sont normalisées par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  avec la condition non infectée. (C) Les cellules HFF-CAR sont transfectées pendant 3 h avec 2  $\mu$ g/mL de poly IC ou infectées 3 h avec 5 000 pp/c d'AdV WT (en noir), dIX (en violet), M1 (en rouge) ou Ts1 (en gris clair) ou infectées avec les différents virus en présence de poly IC. Les ARN totaux sont extraits et analysés par RT-qPCR pour le gène de l'IFN $\beta$  et de la  $\beta$ 2-microglobuline. Les valeurs de Ct sont normalisées par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . (D) Les cellules HFF-CAR sont infectées avec 5 000 pp/c d'AdV WT (en noir) ou Ts1 (en gris clair) pendant différents temps puis sont transfectées pendant 3 h avec 2  $\mu$ g/mL de poly IC. Les ARN totaux sont extraits et analysés par RT-qPCR pour le gène de l'IFN $\beta$  et de la  $\beta$ 2-microglobuline. Les valeurs de Ct sont normalisées par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  avec la condition non infectée.

Nos résultats montrent, que plus la quantité de virus est élevée, plus l'expression d'IFN $\beta$  induite par le poly IC diminue, indiquant que l'infection par l'AdV est bien impliquée dans le contrôle de l'expression d'IFN $\beta$  dans les cellules HFF-CAR.

Afin de déterminer quelle étape du cycle viral est impliquée dans ce mécanisme, nous avons analysé la capacité des différents mutants de l'AdV (dIX, M1, Ts1) à inhiber l'expression d'IFN $\beta$  induite par le poly IC (**Figure 36C**). Les cellules HFF-CAR sont transfectées avec le poly IC et sont infectées pendant 3 h avec 5 000 pp/c des virus WT ou mutants, puis l'expression d'IFN $\beta$  est analysée par RT-qPCR. L'analyse des résultats montre que les virus WT, M1 et dIX réduisent l'expression d'IFN $\beta$  induite par le poly IC, l'effet étant plus limité pour le dIX. En revanche, l'infection par le mutant Ts1 n'inhibe pas cette réponse IFN $\beta$ . Ces résultats indiquent que la rupture de la membrane endosomale par l'AdV est nécessaire au contrôle de l'expression d'IFN $\beta$  par le virus.

Afin de confirmer que l'AdV inhibe l'activation de l'IFN $\beta$  induite par le poly IC, une méthode couramment décrite dans la littérature est utilisée (Taylor and Bresnahan, 2005). Elle consiste à infecter les cellules (avec un virus dont on veut démontrer l'effet inhibiteur), avant de stimuler l'expression d'IFN avec un contrôle positif (par exemple le poly IC). Ceci permet d'induire un environnement limitant l'expression d'IFN, avant même de l'induire avec le contrôle positif et permet de valider l'effet du virus sur la réponse immunitaire.

Dans notre cas, nous souhaitons induire un environnement « anti-interféron » en pré-incubant les cellules HFF-CAR avec le virus WT ou le mutant Ts1 à différents temps (30 min, 1 h ou 2 h) avant la transfection avec le poly IC (**Figure 36D**). Nos résultats montrent que le virus WT limite bien l'expression d'IFN $\beta$  induite par le poly IC et, nous confirmons que le virus Ts1 n'en a pas la capacité.

En conclusion, ces données indiquent que l'absence d'induction de l'IFN $\beta$  par l'AdV dans nos conditions expérimentales est due à un contrôle efficace de cette réponse par le virus, et que ce contrôle nécessite la rupture des membranes endosomales induite par le virus.

#### IV- Conclusion générale du chapitre

Dans nos conditions expérimentales, l'AdV n'induit pas l'expression d'IFN $\beta$  contrairement à ce qui est décrit dans la littérature. Ce défaut d'activation est dû à une inhibition de la réponse IFN $\beta$  par l'AdV. Des études récentes confirment que l'infection par l'AdV n'induit pas l'activation des voies menant à l'expression d'IFN dans des fibroblastes pulmonaires infectés avec une faible dose de virus (moins de 500 pp/c), ni dans la lignée THP-1 (monocytes humains) (Hare et al., 2015 ; Liu et al., 2017) et que l'activation de cette réponse immunitaire par le virus dépend de la lignée cellulaire utilisée comme modèle d'étude (Stein et al., 2012). Ce contrôle de la réponse IFN $\beta$  par l'AdV nécessite l'étape de la rupture de la membrane endosomale. Pour savoir quels sont les mécanismes utilisés par le virus pour limiter cette réponse, nous avons analysé l'effet de l'infection sur les signaux en amont de la réponse IFN $\beta$  tels que l'activation des facteurs de transcription.

## CHAPITRE 2

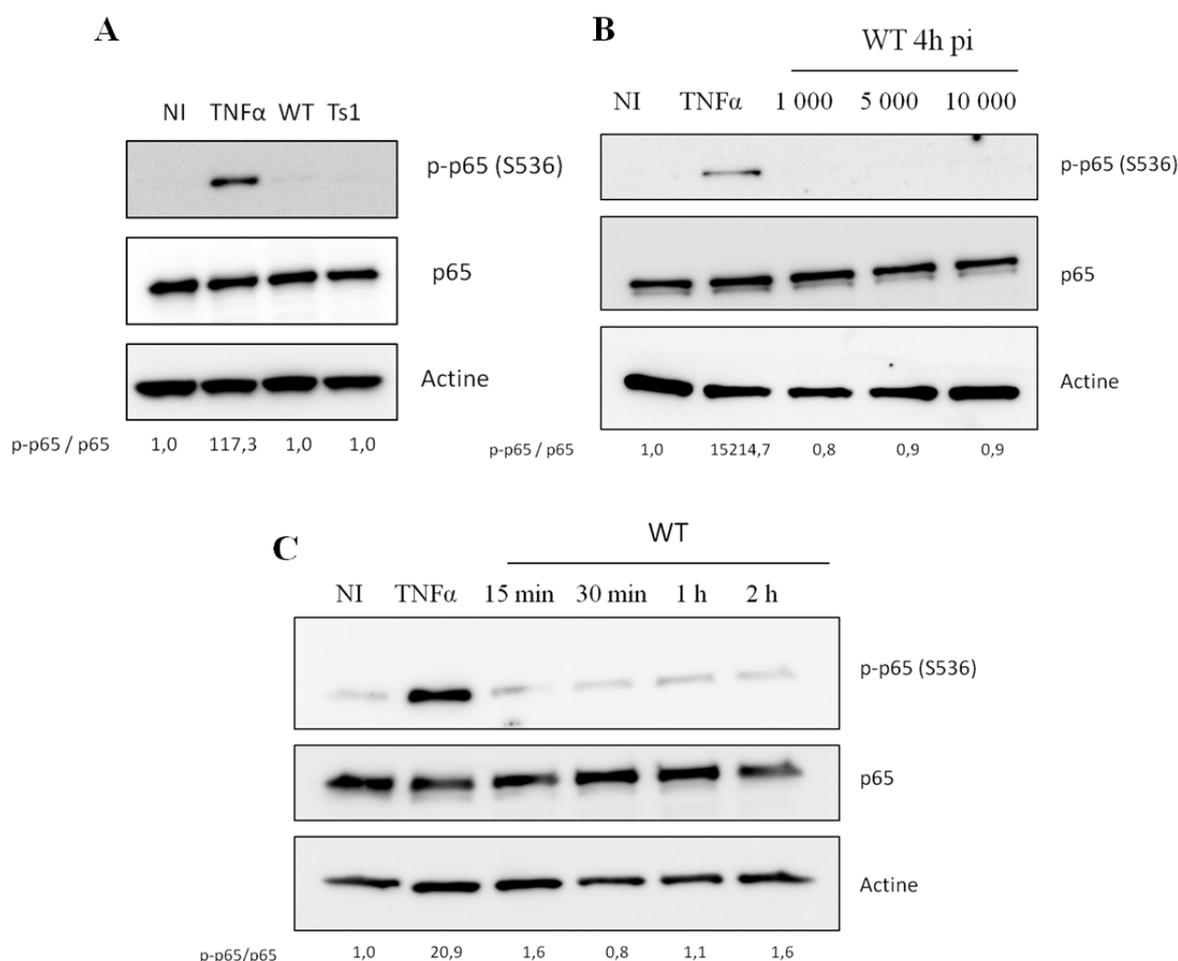
### Etude des facteurs de transcription en amont de l'expression d'interféron $\beta$

L'expression d'IFN $\beta$  est induite par l'activation de facteurs de transcription, dont les plus décrits sont NF- $\kappa$ B et IRF3. Ces facteurs de transcription sont phosphorylés dans le cytoplasme puis sont transloqués dans le noyau où ils se lient au promoteur de l'IFN $\beta$  et induisent son expression (Seth et al., 2006). Comme nos résultats précédents ont montré que cette expression est inhibée par l'AdV, nous nous sommes intéressés à l'activation de ces facteurs de transcription dans les cellules infectées.

#### I- Etude de l'activation de NF- $\kappa$ B

Afin de déterminer l'effet de l'infection par l'AdV sur NF- $\kappa$ B, la phosphorylation de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B est suivie comme marqueur de son activation (Christian et al., 2016). Pour cela, des cellules U2OS sont infectées pendant 4 h avec 1 000 pp/c des vecteurs non réplicatifs d'AdV WT et du mutant Ts1. Les cellules non infectées servent de contrôle négatif. L'incubation des cellules pendant 30 min en présence de TNF $\alpha$ , connu pour induire la phosphorylation de p65, constitue le contrôle positif de l'expérience (Schütze et al., 1995). Les cellules sont lysées puis un western blot est effectué avec des anticorps spécifiques de la forme phosphorylée de la sérine 536 de la sous-unité p65 (**Figure 37A**). La quantité de p65 total est, elle, déterminée à l'aide d'anticorps dirigés contre p65. Le niveau de p65 détecté sous la forme phosphorylée est normalisé par le taux de p65 total (rapport p-p65/p65), ce rapport est par la suite normalisé par la condition non infectée. Nos résultats montrent que le traitement avec le TNF $\alpha$  induit bien la phosphorylation de p65. Au contraire, l'infection par l'AdV n'induit pas l'activation de p65.

Afin d'exclure la possibilité que ce défaut d'activation représente un défaut de détection due à la faible quantité de virus utilisée dans nos conditions expérimentales, nous avons effectué la même étude en présence de doses croissantes de virus. Les cellules U2OS sont infectées avec l'AdV WT à différentes concentrations jusqu'à 10 000 pp/c. Quatre heures après l'infection, les cellules sont lysées puis le niveau de phosphorylation de p65 est analysé par western blot (**Figure 37B**). Nos résultats montrent que contrairement au TNF $\alpha$ , l'infection par l'AdV n'induit pas la phosphorylation de p65, même avec de fortes doses virales. La quantification du rapport p-p65/p65 normalisé par la condition non infectée confirme ces données.



### Figure 37: Etude de la phosphorylation de NF- $\kappa$ B

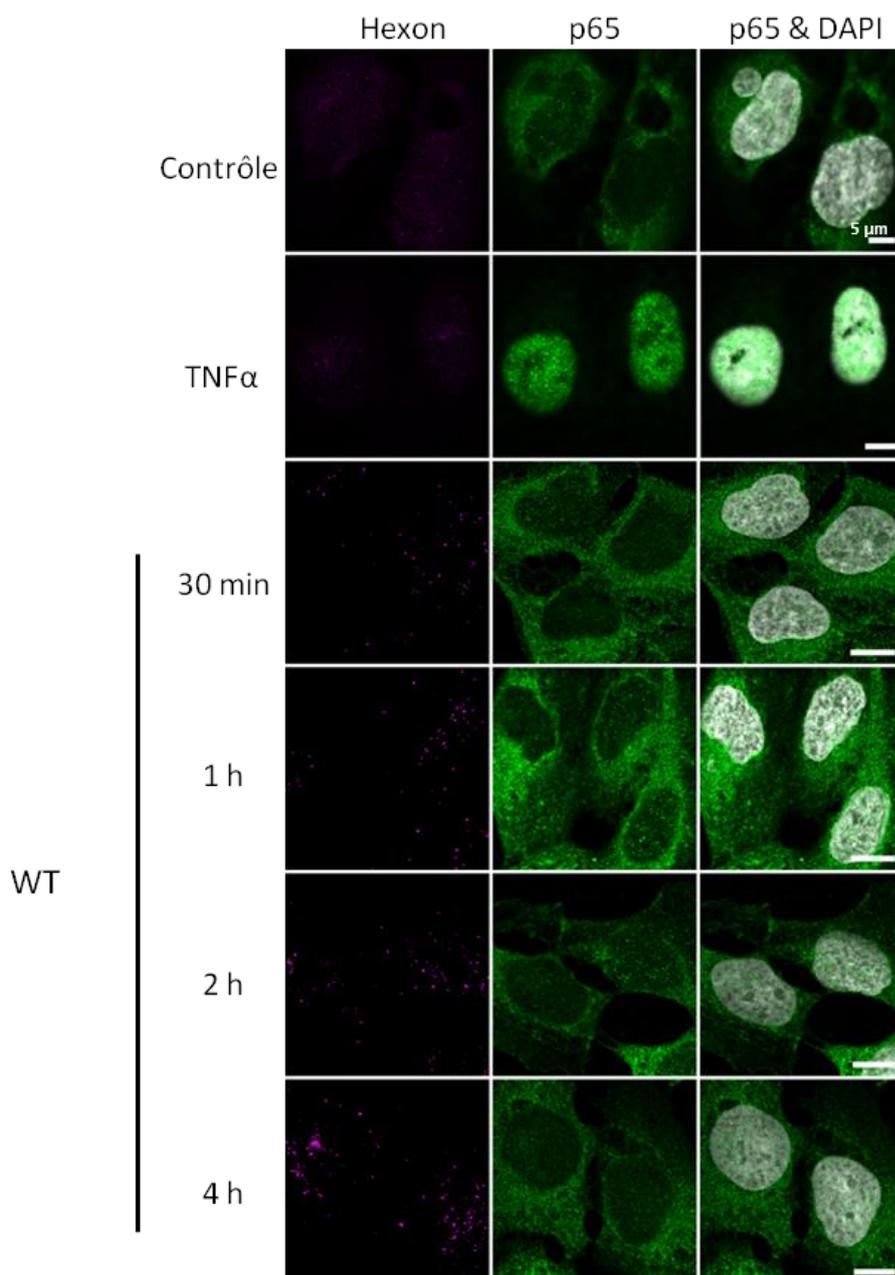
(A) Les cellules U2OS sont soit traitées pendant 30 min avec 25 ng/mL de TNF $\alpha$  soit infectées pendant 4 h avec 1 000 pp/c de virus WT ou du mutant Ts1. Les cellules sont lysées puis analysées par western blot pour l'expression de p65 sous sa forme phosphorylée (p-p65) ou total (p65). L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes p-p65, p65 et actine est mesurée et le rapport p-p65 par p65 est calculé. (B) Les cellules U2OS sont soit traitées pendant 30 min avec 25 ng/mL de TNF $\alpha$ , soit infectées pendant 4 h avec différentes concentrations (pp/c) de virus WT. Les cellules sont lysées puis analysées par western blot pour l'expression de p65 sous sa forme phosphorylée (p-p65) ou total (p65). L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes p-p65, p65 et actine est mesurée et le rapport p-p65 par p65 est calculé. (C) Les cellules U2OS sont soit traitées pendant 30 min avec 25 ng/mL de TNF $\alpha$ , ou infectées avec 1 000 pp/c du virus WT pendant différent temps post-infection. Les cellules sont lysées puis analysées par western blot pour l'expression de p65 sous sa forme phosphorylée (p-p65) ou total (p65). L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes p-p65, p65 et actine est mesurée et le rapport p-p65 par p65 est calculé.

L'absence de phosphorylation de p65 ne semble donc pas due à la quantité limitée de virus utilisée.

Cependant, comme pour la réponse IFN $\beta$ , l'activation des facteurs de transcription est contrôlée par la cellule afin de réguler la réponse immunitaire (Oeckinghaus and Ghosh, 2009). Pour déterminer si l'AdV induit une activation de p65 qui serait par la suite rapidement inhibée par la cellule et donc non détectable au moment de la lyse (4 h post-infection), une cinétique d'infection a été réalisée et les cellules lysées de 15 min à 2 h post-infection (**Figure 37C**). L'analyse du western blot nous permet de mettre en évidence que même à des temps courts après l'infection, la sous unité p65 n'est pas phosphorylée. Il semble donc que ce défaut de détection ne soit pas dû à une régulation cellulaire de l'activation des facteurs de transcription.

Par la suite, pour confirmer l'absence d'activation de p65 au cours de l'infection, nous avons étudié sa localisation cellulaire afin de déterminer si p65 était transloqué dans le noyau. Pour cela, nous avons suivi sa localisation par immunofluorescence (en vert) dans des cellules U2OS soit traitées avec le TNF $\alpha$  pendant 30 min, soit infectées avec 5 000 pp/c de l'AdV WT et fixées à différents temps post-infection (**Figure 38**). Le marquage de la protéine de capsid hexon (en violet) permet de confirmer l'infection, et le noyau est détecté par marquage au DAPI. Sur les images obtenues par microscopie à épifluorescence, nous observons le marquage nucléaire de p65 après traitement avec le TNF $\alpha$  alors que l'infection n'induit pas de relocalisation de p65 au niveau du noyau, et cela à différents temps post-infection. Ces résultats confirment que l'infection par l'AdV n'induit pas l'activation de NF- $\kappa$ B dans nos conditions expérimentales, car ni la phosphorylation de p65, ni sa localisation nucléaire ne sont détectées au cours de l'infection.

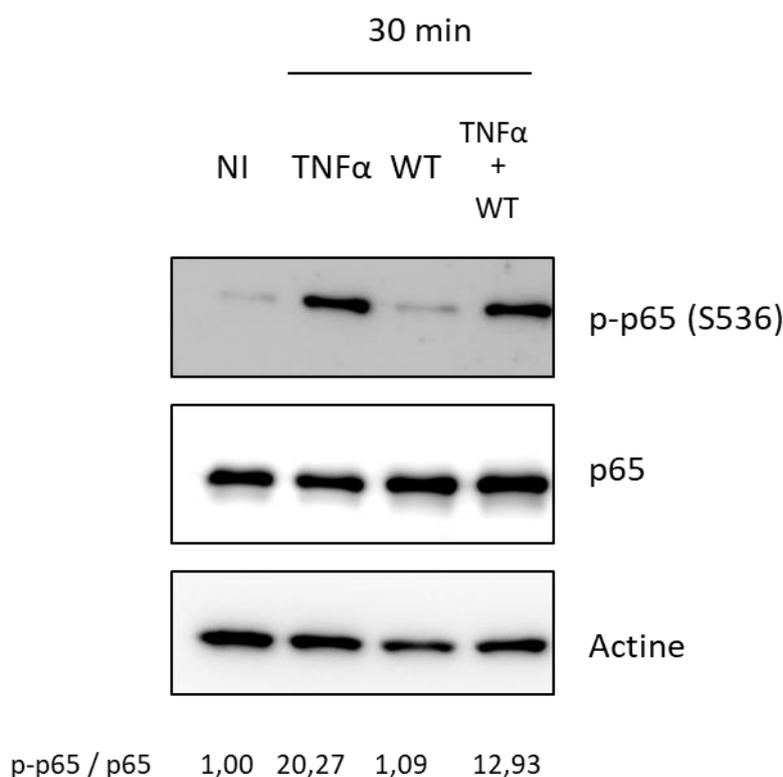
Cependant, comme décrit précédemment pour la réponse IFN $\beta$ , l'AdV pourrait contrôler l'activation de NF- $\kappa$ B. L'effet de l'infection sur le niveau de phosphorylation de p65 induit par le TNF $\alpha$  a donc été étudié. Pour cela, les cellules sont incubées avec le TNF $\alpha$  en présence de virus et sont lysées 30 min après ces traitements (**Figure 39**). Les cellules simplement traitées 30 min avec le TNF $\alpha$  ou infectées par l'AdV constituent les contrôles de l'activation. Nos résultats montrent que le virus seul n'induit pas la phosphorylation de p65, mais que la présence du virus dans les cellules traitées avec le TNF $\alpha$  limite sa phosphorylation. En effet, en analysant le rapport p-p65/p65 représentant le niveau de phosphorylation de la sous-unité, nous remarquons que ce taux est de 20,27 en présence du TNF $\alpha$  seul alors qu'il atteint 12,93

**Figure 38: Etude de la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B**

Les cellules U2OS sont, soit traitées pendant 30 min avec 25 ng/mL de TNF $\alpha$ , soit infectées avec 5 000 pp/c d'AdV WT et fixées à différents temps post-infection. Une immunofluorescence est réalisée avec des anticorps anti hexon (en violet), anti p65 (en vert) avec un marquage DAPI pour le noyau (en gris). Les images sont obtenues au microscope à épifluorescence.

quand les cellules sont également infectées par l'AdV. La présence du virus pourrait limiter la phosphorylation de p65 induite par le TNF $\alpha$ . Cependant cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et il serait nécessaire de reproduire cette expérience pour confirmer ces résultats.

Nous nous sommes également intéressés à l'autre facteur de transcription bien décrit dans la réponse IFN : IRF3.



**Figure 39: Etude de l'effet de l'infection par l'AdV sur la phosphorylation de NF- $\kappa$ B**

Les cellules U2OS sont soit traitées pendant 30 min avec 25 ng/mL de TNF $\alpha$  soit infectées pendant 30 min avec 10 000 pp/c de virus WT soit infectées en présence de TNF $\alpha$ . Les cellules sont lysées puis analysées par western blot pour l'expression de p65 sous sa forme phosphorylée (p-p65) ou total (p65). L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes p-p65, p65 et actine est mesurée et le rapport p-p65 par p65 est calculé.

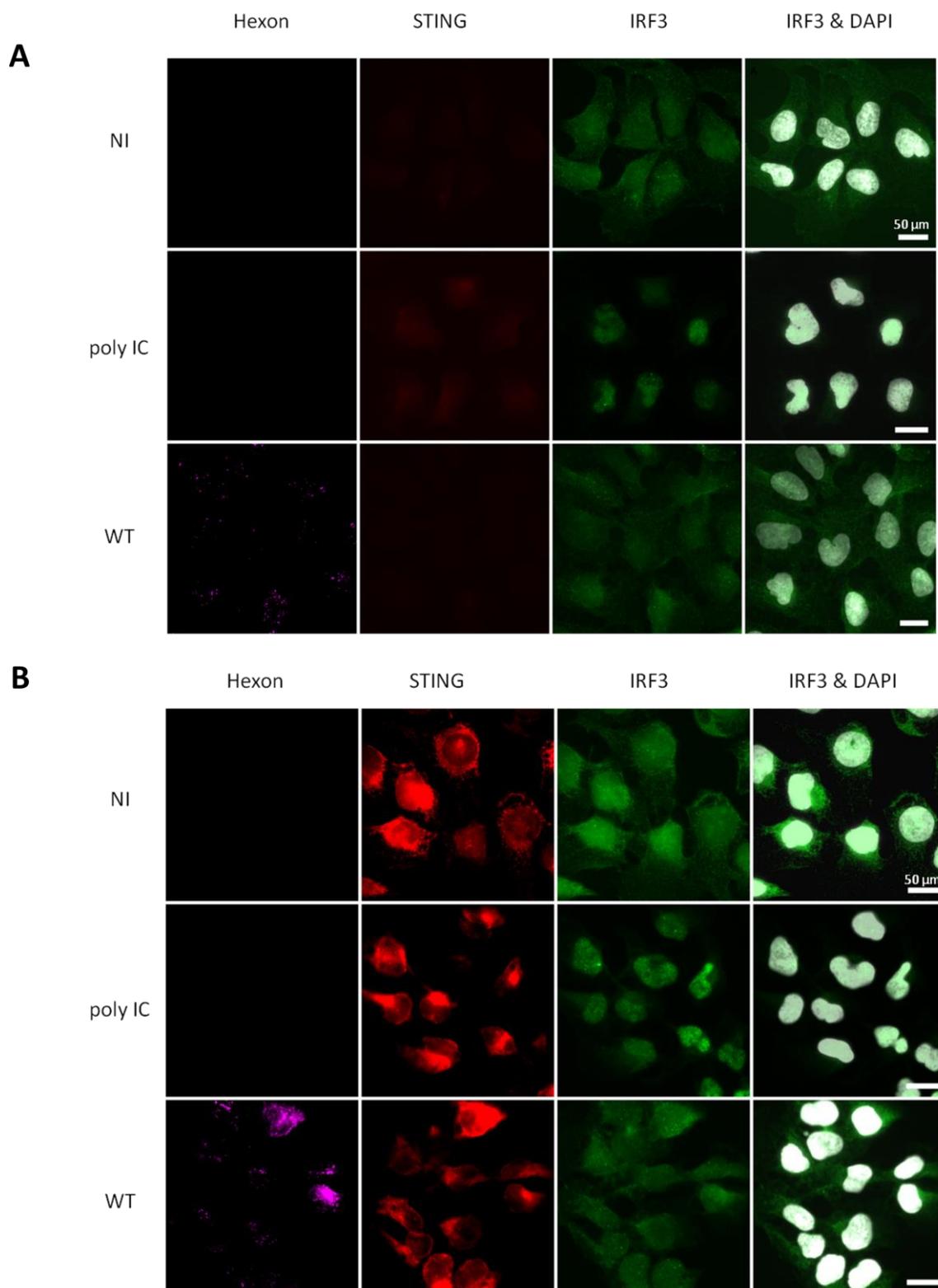
## II- Etude de l'activation d'IRF3

IRF3 est le facteur de transcription le plus étudié pour l'activation de l'IFN $\beta$ . Il existe différentes voies d'activation qui mènent toutes à la phosphorylation d'IRF3. Parmi elles, on trouve la voie cGAS/STING activée en réponse à la détection d'ADN cytoplasmique (Shu et al., 2014). Puisque STING peut avoir un impact sur l'activation d'IRF3, nos études seront menées dans la lignée cellulaire U2OS-STING précédemment décrite. En parallèle, la lignée U2OS est utilisée comme contrôle.

Afin de déterminer si l'infection par l'AdV induit l'activation d'IRF3, nous avons voulu déterminer son niveau de phosphorylation. Cependant, l'anticorps utilisé ne nous a pas permis de détecter un signal clair pour la forme phosphorylée d'IRF3, même avec le contrôle positif (données non montrées).

Nous avons donc analysé la localisation cellulaire de ce facteur de transcription. Pour cela des cellules U2OS et U2OS-STING sont soit transfectées pendant 3 h avec 2  $\mu$ g/mL de poly IC, soit infectées pendant 1 h avec 5 000 pp/c d'AdV WT. Les cellules sont fixées puis une immunofluorescence est effectuée afin de déterminer la localisation d'IRF3 (en vert) (**Figure 40**). Le marquage de la protéine virale hexon (en violet) permet de confirmer l'infection et l'expression de la protéine STING est vérifiée grâce à son étiquette mCherry (en rouge). L'analyse par microscopie à épifluorescence révèle que le poly IC induit bien une relocalisation nucléaire d'IRF3 dans les cellules U2OS et U2OS-STING. Au contraire, l'infection par l'AdV ne permet pas de détecter la translocation d'IRF3, ni dans les cellules U2OS, ni dans les cellules U2OS-STING.

Ces résultats indiquent que le facteur de transcription IRF3 n'est pas non plus activé par l'infection avec l'AdV dans nos conditions expérimentales.



**Figure 40: Etude de la translocation nucléaire d'IRF3**

Les cellules U2OS (A) et U2OS-STING (B) sont transfectées pendant 3h avec 2  $\mu\text{g/mL}$  de poly IC ou infectées pendant 1 h avec 5 000 pp/c d'AdV WT. Une immunofluorescence est réalisée avec des anticorps anti hexon (en violet), anti IRF3 (en vert). STING est visualisé par son étiquette mCherry et le DAPI est utilisé pour marquer le noyau (en gris). Les images sont obtenues au microscope à épifluorescence.

### III- Conclusion générale du chapitre

L'étude de NF- $\kappa$ B et d'IRF3 n'a pas permis de mettre en évidence leur activation lors d'infection par l'AdV. Le défaut d'expression d'IFN $\beta$  pourrait être dû à un défaut d'activation des facteurs de transcription. Il reste donc à étudier par quel(s) mécanisme(s) l'AdV parvient à limiter la réponse IFN $\beta$ .

Sachant que les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF3 ne sont pas activés dans les cellules infectées, nous avons recherché si cela était dû à un défaut d'activation des kinases en amont. Parmi elles, nous nous sommes intéressés à la kinase TBK1 car elle est impliquée dans la phosphorylation d'IRF3 et probablement dans celle de NF- $\kappa$ B, bien que ce dernier rôle soit controversé (Abe and Barber, 2014).

## CHAPITRE 3

### Etude de l'activation de TBK1 et de son rôle au cours de l'infection par l'Adénovirus

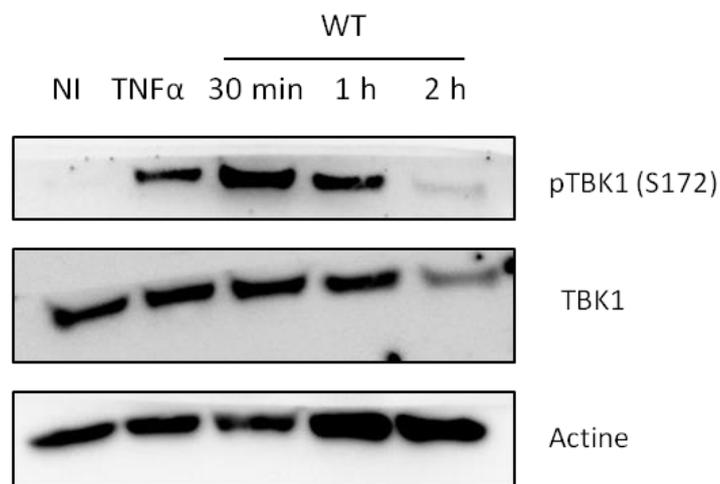
TBK1 est une kinase clef de la réponse IFN $\beta$ , et elle est également impliquée dans l'autophagie sélective, menant à la dégradation de bactéries comme *Salmonella thyphimurium* (Weidberg and Elazar, 2011). En effet, TBK1 permet la phosphorylation des adaptateurs de l'autophagie et participe ainsi à renforcer l'activation de l'autophagie (voir chapitre 3 de l'introduction). Par exemple, la phosphorylation de l'optineurine par TBK1 augmente son affinité pour LC3 favorisant alors la formation des autophagosomes et la dégradation de la bactérie *Salmonella thyphimurium* (Wild et al., 2011). TBK1 est, par de nombreuses voies, impliqué dans la réponse cellulaire face aux infections bactériennes mais également virales (Thurston et al., 2016 ; Sparrer et al., 2017). Dans ce chapitre, nous étudierons l'activation et le rôle de TBK1 lors d'infection par l'AdV. Dans un premier temps, puisque nous n'avons pas détecté l'activation d'IRF3, nous souhaitons déterminer si TBK1, en amont dans la réponse IFN $\beta$ , est bien activé. Dans un second temps, nous nous intéressons au rôle de TBK1 dans l'activation de l'autophagie induite par l'AdV en la comparant à ce qui est déjà décrit pour les bactéries.

#### I- Etude de l'activation de TBK1

##### A) Activation de TBK1 au cours de l'infection

TBK1 est activé suite à une transautophosphorylation induite par le regroupement de plusieurs TBK1 sur un même site. Cette autophosphorylation de TBK1 est donc une conséquence de sa multimérisation (Ma et al., 2012). Afin de déterminer si l'infection par l'AdV induit l'activation de TBK1, nous avons analysé son niveau de phosphorylation dans les cellules infectées. Pour cela, les cellules U2OS ont été infectées avec 10 000 pp/c d'AdV WT ou traitées avec 25 ng/mL de TNF $\alpha$  pendant 30 min (contrôle positif de l'activation de TBK1), puis lysées à différents temps post-infection. L'état de phosphorylation de TBK1 est déterminé par western blot à l'aide d'anticorps spécifiques de la forme phosphorylée de la sérine 172 (**Figure 41**). Les résultats montrent que, tout comme le traitement avec le TNF $\alpha$ , l'infection par l'AdV WT induit la phosphorylation de TBK1 sur le résidu 172. Cette activation se fait dès 30 min d'infection et diminue 1 h après l'infection. Au cours de son entrée, l'AdV induit donc l'activation de TBK1 qui est par la suite limitée.

Pour comprendre comment cette kinase est activée par le virus, nous avons voulu identifier l'étape du cycle viral nécessaire à cette activation.



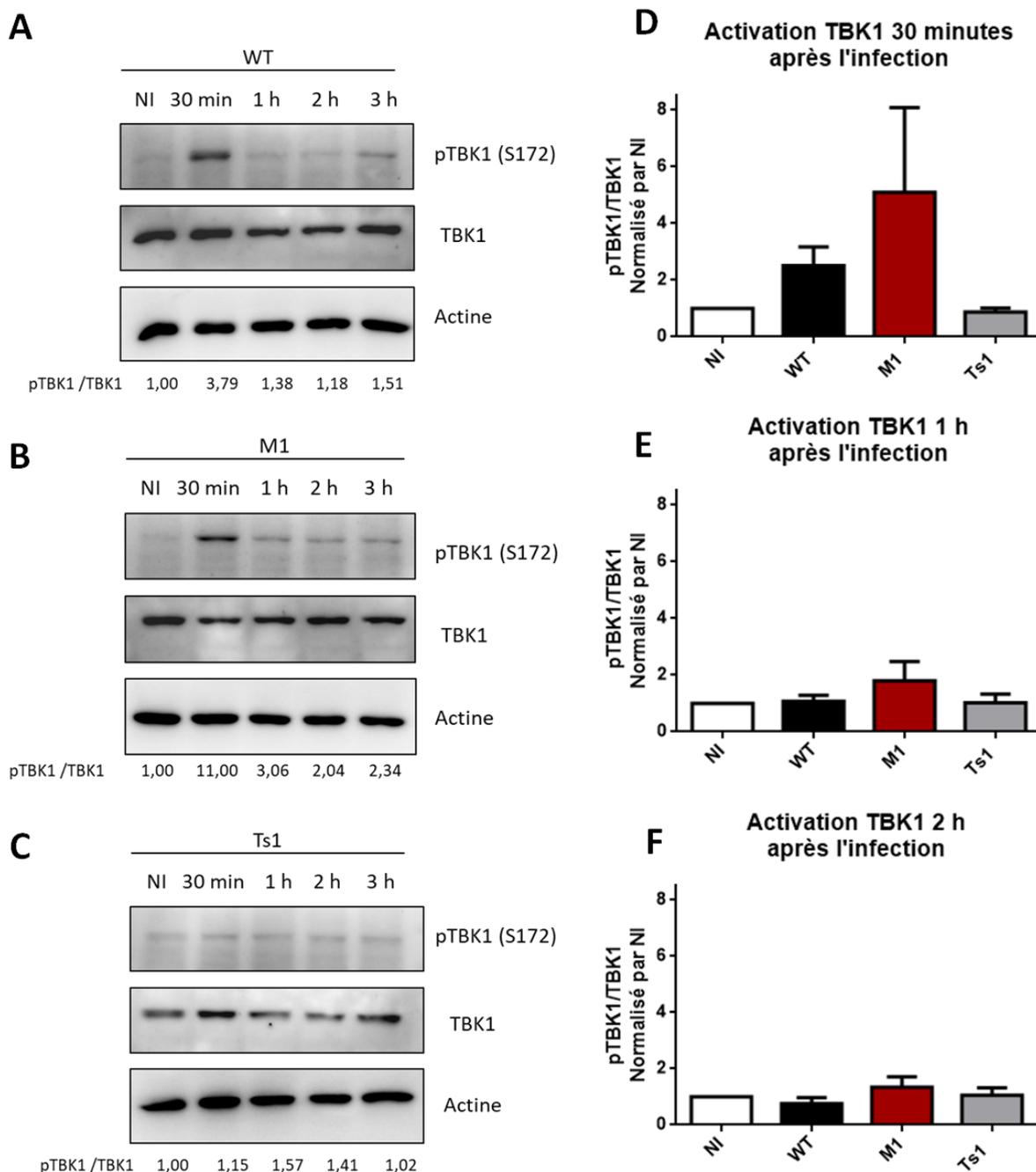
**Figure 41: Etude de la phosphorylation de TBK1**

Les cellules U2OS sont soit traitées pendant 30 min avec 25 ng/mL de TNF $\alpha$  soit infectées avec 10 000 pp/c de virus WT. Les cellules sont lysées à différents temps post-infection puis analysées par western blot pour l'expression de TBK1 sous sa forme phosphorylée (pTBK1) et total (TBK1). L'actine sert de contrôle de charge.

## B) TBK1, dommages membranaires et autophagie induits par l'AdV

En effet, un de nos objectifs est de comprendre la réponse cellulaire induite par l'AdV au cours de son entrée et, en particulier, d'étudier le rôle des ruptures membranaires et de l'autophagie qu'il induit. Pour déterminer si ces deux mécanismes sont nécessaires à l'activation de TBK1, nous avons utilisé les mutants Ts1 (incapable de rompre les membranes endosomales) et M1 (dégradé par autophagie). Les cellules U2OS sont infectées avec 5 000 pp/c d'AdV WT ou des mutants M1 ou Ts1, et lysées à différents temps post-infection (30 min, 1 h, 2 h et 3 h). L'activation de TBK1 est analysée par western-blot à l'aide d'anticorps dirigés contre la forme phosphorylée de la protéine, comme précédemment. L'intensité des bandes révélées par western-blot a été mesurée et le rapport pTBK1/TBK1 calculé pour chaque condition. Il est ensuite normalisé par rapport au témoin non infecté (**Figure 42**). Comme précédemment, nos résultats montrent que l'infection avec le virus WT induit la phosphorylation de TBK1 dès 30 min après l'infection et que cette activation diminue après 1 h d'infection (le taux de phosphorylation de 1,38 se rapproche du niveau basal d'activation) (**Figure 42A**). L'infection avec le mutant M1, qui est dégradé par autophagie, induit également la phosphorylation de TBK1 dès 30 min. Celle-ci est plus forte avec le mutant qu'avec le virus sauvage à ce temps d'infection (3,79 pour le WT contre 11,00 pour le M1). De plus, le retour au niveau basal d'activation est plus lent avec le mutant M1 qu'avec le virus sauvage. Par exemple, à 1 h post-infection alors que le taux de phosphorylation de TBK1 est déjà proche du seuil basal avec le WT, ce taux est de 3,06 avec le M1 (**Figure 42B**). Ces données suggèrent que contrairement au mutant M1, le virus WT parvient à contrôler l'activation de TBK1 au cours du temps. En revanche, l'analyse des cellules infectées avec le mutant Ts1 révèle qu'il n'induit pas la phosphorylation de TBK1 quelque soit le temps post-infection. Ces résultats montrent que les dommages membranaires induits par l'AdV sont impliqués dans l'activation de TBK1 et qu'ils pourraient être le facteur déclencheur de cette activation (**Figure 42C**).

Ces données sont reproduites avec 3 expériences indépendantes, et les résultats sont regroupés dans des graphiques représentant, pour les différents virus, le rapport pTBK1/TBK1 (normalisé par le non infecté) à différents temps post-infection. L'analyse de ce triplicat permet de confirmer la tendance indiquant que 30 min après l'infection, TBK1 est activée par le virus WT et plus fortement par le virus M1, mais pas par le virus Ts1 (**Figure 42D**).



#### Figure 42: Etude de la phosphorylation de TBK1 induite par l'AdV WT et par les mutants

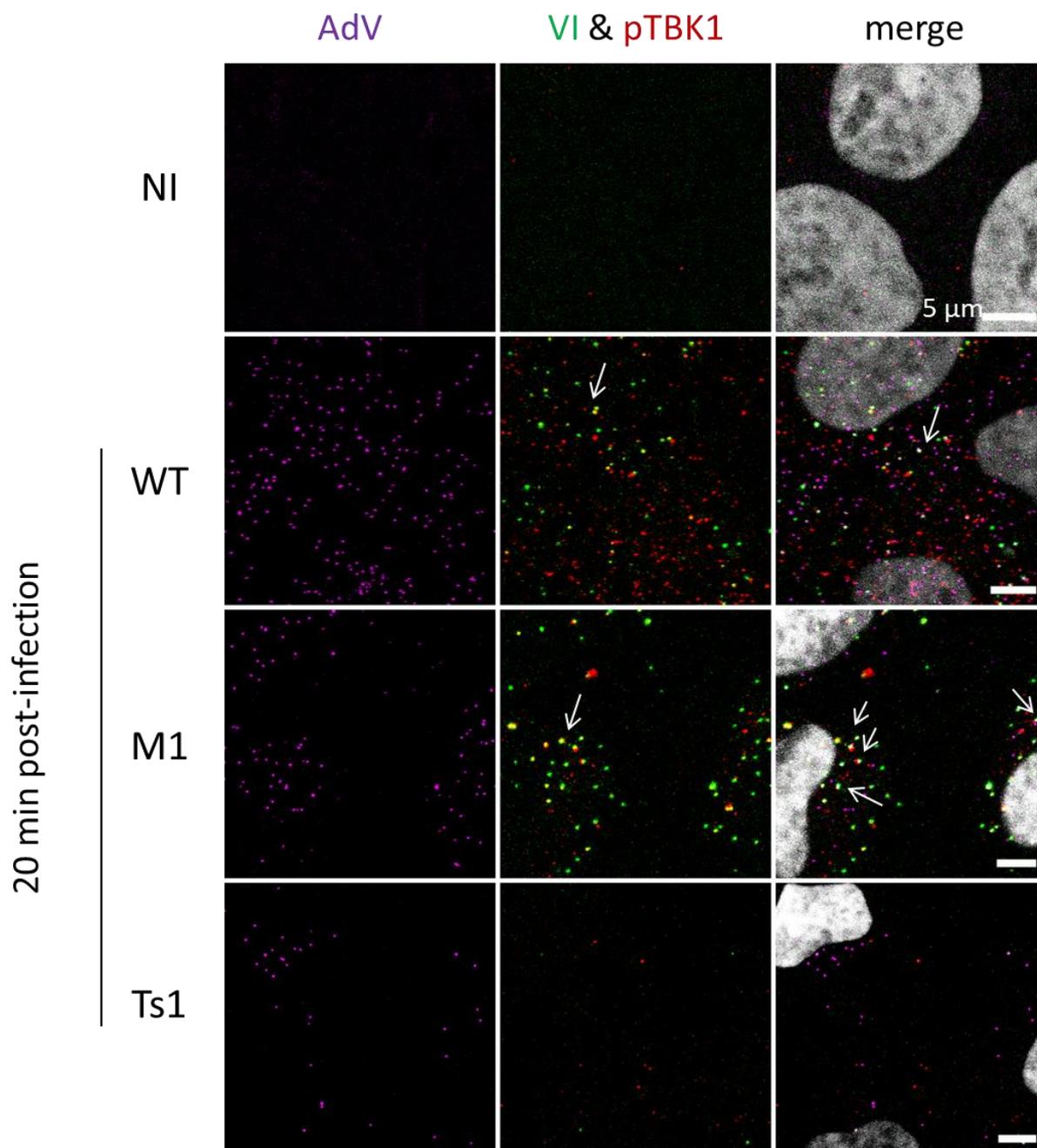
Les cellules U2OS sont infectées avec 5 000 pp/c de virus WT (A), M1 (B), Ts1 (C). Les cellules sont lysées à différents temps post-infection puis analysées par western blot pour l'expression de TBK1 sous sa forme phosphorylée (pTBK1) et total (TBK1). L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes pTBK1, TBK1 et actine est mesurée et le rapport pTBK1 par TBK1 est calculé. L'expérience est réalisée trois fois et les valeurs du rapport pTBK1 par TBK1, à 30 min (D), 1 h (E) et 2 h (F) post-infection, sont reportés dans ce graphique pour les virus WT (noir), M1 (rouge) et Ts1 (gris clair). Le graphique présente la moyenne de ces valeurs et les barres d'erreur correspondent à l'écart à la moyenne (SEM).

Ces résultats indiquent également qu'à des temps plus longs d'infections, 1 h (**Figure 42E**) et 2 h (**Figure 42F**), le virus WT limite l'activation de TBK1 plus efficacement que le mutant M1.

L'ensemble de ces données indique que l'activation de TBK1 dépend des ruptures membranaires induites par le virus. Ainsi, tout comme l'autophagie induite par l'AdV, TBK1 est activé par les dommages membranaires et son activation semble être ensuite limitée par le virus. Or, comme indiqué précédemment, l'autophosphorylation de TBK1 mesurée ici dépend de sa propre multimérisation et l'on peut supposer que cette kinase soit recrutée au niveau des sites de rupture membranaire induits par le virus et que cela favorise son activation en la concentrant spécifiquement au niveau de ce signal de danger.

Pour le savoir, nous avons étudié la localisation de TBK1 par immunofluorescence dans les cellules U2OS infectées, à différents temps post-infection (20 min, 40 min, 60 min, 120 min), avec 5 000 pp/c d'AdV WT ou des mutants, marqués par un fluorochrome. Afin de localiser les sites de dommage membranaire, des anticorps dirigés contre la protéine virale VI sont utilisés. Cette protéine est responsable de la rupture de l'endosome et reste partiellement associée avec l'endosome rompu (Wiethoff et al., 2005). Elle sert de marqueur des membranes rompues dans cette expérience. Des anticorps dirigés contre pTBK1 permettent de détecter la forme activée de TBK1. Les images sont acquises au microscope confocal, plusieurs plans focaux sont ainsi obtenus et une projection orthogonale est effectuée afin de visualiser les différents plans sur une seule image (**Figure 43**). Les événements de colocalisations sont dénombrés de façon semi-automatique grâce au logiciel Image J (**Figures 44 et 45**).

Un exemple d'images obtenues après la projection, 20 min post-infection pour les différents virus est présenté dans la **figure 43**. L'efficacité de l'infection est indiquée dans la colonne de gauche par la présence du virus (en violet). La présence de la protéine VI (en vert) et de la forme activée de TBK1 (en rouge) est indiquée dans la colonne du milieu, les événements de colocalisation entre la protéine VI et pTBK1 apparaissent ainsi (en jaune) et certains sont indiqués par une flèche. La localisation de l'ensemble de ces protéines ainsi que du noyau (DAPI) est présentée dans la colonne de droite. Les événements de colocalisation entre la protéine VI, pTBK1 et le virus apparaissent (en blanc) et certains sont indiqués par une flèche (**Figure 43**). Les cellules non infectées ne présentent pas le marquage du virus, alors que les virus marqués sont détectés dans les cellules infectées, que ce soit pour les virus WT, M1 et



**Figure 43: Etude du recrutement de TBK1 aux sites de dommage membranaire**

Les cellules U2OS sont infectées avec 5 000 pp/c d'AdV WT et des mutants M1 et Ts1 marqués avec des fluorochromes (en violet), puis fixées 20 min post-infection. Une immunofluorescence est réalisée avec des anticorps anti protéine VI (en vert), anti pTBK1 (en rouge), et le DAPI est utilisé pour marquer le noyau (en gris). Les images sont obtenues par microscopie à fluorescence confocale. Les flèches représentent des exemples de colocalisations entre pTBK1 et VI (colonne du milieu) et de colocalisations entre le virus, pTBK1 et VI (colonne de droite).

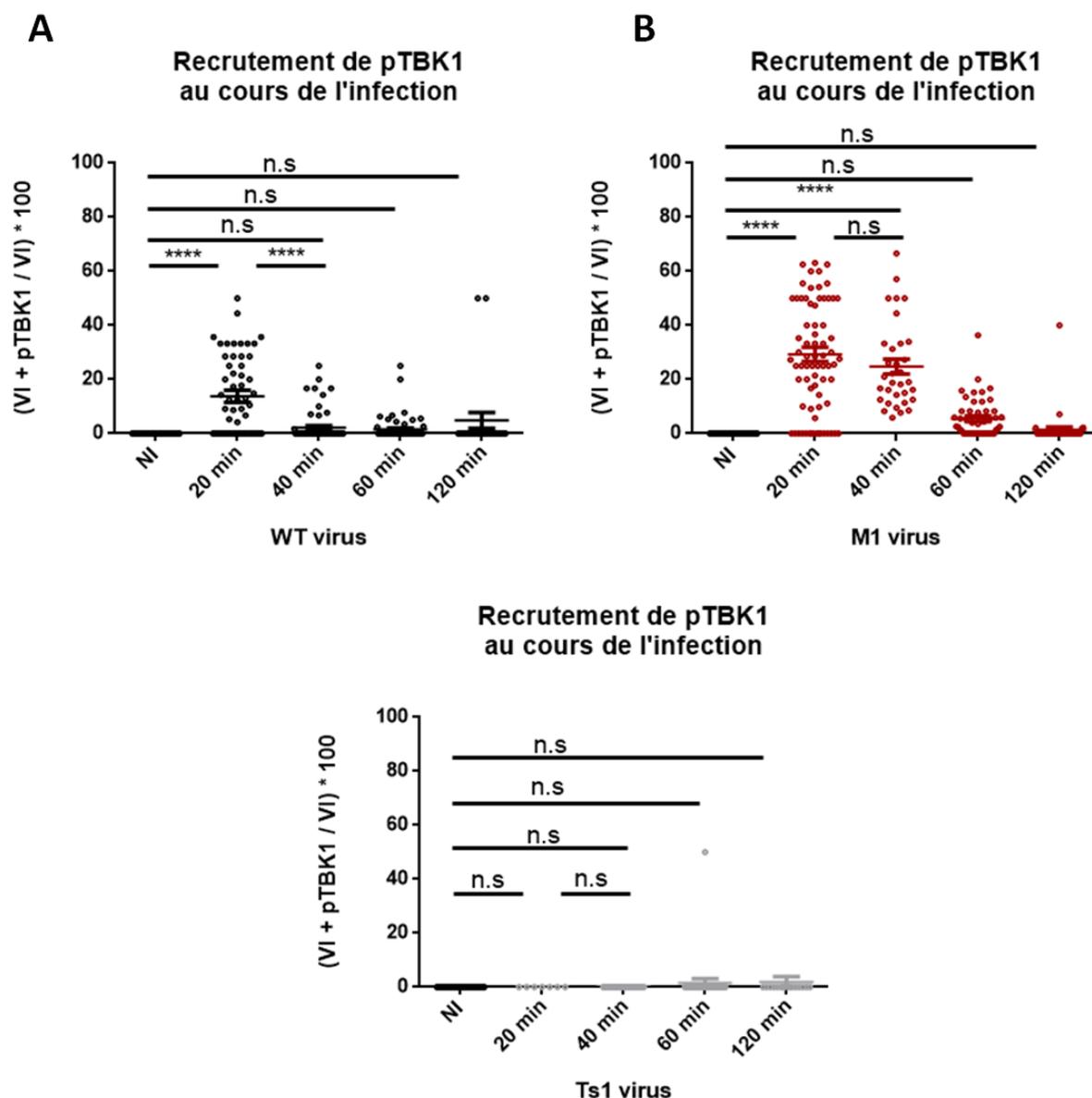
dans une plus faible proportion pour le Ts1 (car ce virus est dégradé par les lysosomes [Martinez et al., 2015]). De plus, ce virus n'induisant pas de rupture de membrane, la protéine VI n'est pas exposée et n'est donc pas détectée (en vert). Des événements de colocalisations entre la protéine VI et pTBK1 sont également détectés, ainsi que des triples colocalisations entre la protéine VI, pTBK1 et le virus, notamment dans le cas de l'infection par le virus M1.

Afin d'analyser ces observations, le nombre de colocalisations entre pTBK1 et la protéine VI est quantifié dans chaque cellule et est par la suite normalisé par le nombre de signaux de la protéine VI détectée dans la cellule. Ceci permet d'obtenir le pourcentage de protéine VI (et donc de sites de dommage membranaire) ayant induit le recrutement de TBK1 activé. L'analyse statistique des quantifications de ces colocalisations a été réalisée de deux façons : soit en fonction du temps d'infection pour chaque virus (**Figure 44**), soit en fonction du virus utilisé pour un temps donné (**Figure 45**).

L'analyse cinétique des colocalisations entre la protéine VI et pTBK1 induites par le virus WT (**Figure 44A**) indique qu'après 20 min d'infection 14 % des protéines VI détectées colocalisent significativement avec pTBK1. Ces colocalisations diminuent dès 40 min post-infection où seulement 2 % de ces sites de dommage membranaire sont positifs pour pTBK1. Dans le cas du mutant M1 (**Figure 44B**), on observe que 30 % des protéines VI détectées sont associées à pTBK1 dès 20 min d'infection et que ces colocalisations perdurent au cours de l'infection avec 25 % après 40 min alors qu'elles diminuent avec le WT. Ces colocalisations ne diminuent significativement qu'à partir de 60 min d'infection.

Ces données confirment également l'absence d'activation de TBK1 par le mutant Ts1 et donc par conséquent de colocalisation VI/pTBK1 (**Figure 44C**) et ce pour tous les temps de la cinétique.

Ces résultats indiquent que les virus WT et M1 induisent bien le recrutement de TBK1 activé aux sites marqués par la protéine VI (sites de dommage membranaire) et suggèrent une différence de comportement entre le virus WT et le mutant M1, c'est pourquoi le comportement des différents virus a été comparé pour chaque temps de la cinétique, le virus Ts1 servant de contrôle négatif (**Figure 45**).



**Figure 44: Etude du recrutement de TBK1 aux sites de dommage membranaire induit par l'AdV WT et les mutants**

Les images obtenues par microscopie à fluorescence confocale, sont analysées avec le logiciel Image J afin de quantifier les colocalisations entre la protéine VI et pTBK1. Ces colocalisations sont ensuite normalisées par le nombre de protéine VI détectées afin d'exprimer le pourcentage d'endosomes rompus positifs pour TBK1. Les graphiques représentent les résultats de ces quantifications à différents temps post-infection pour le virus WT (A), M1 (B) et Ts1 (C)

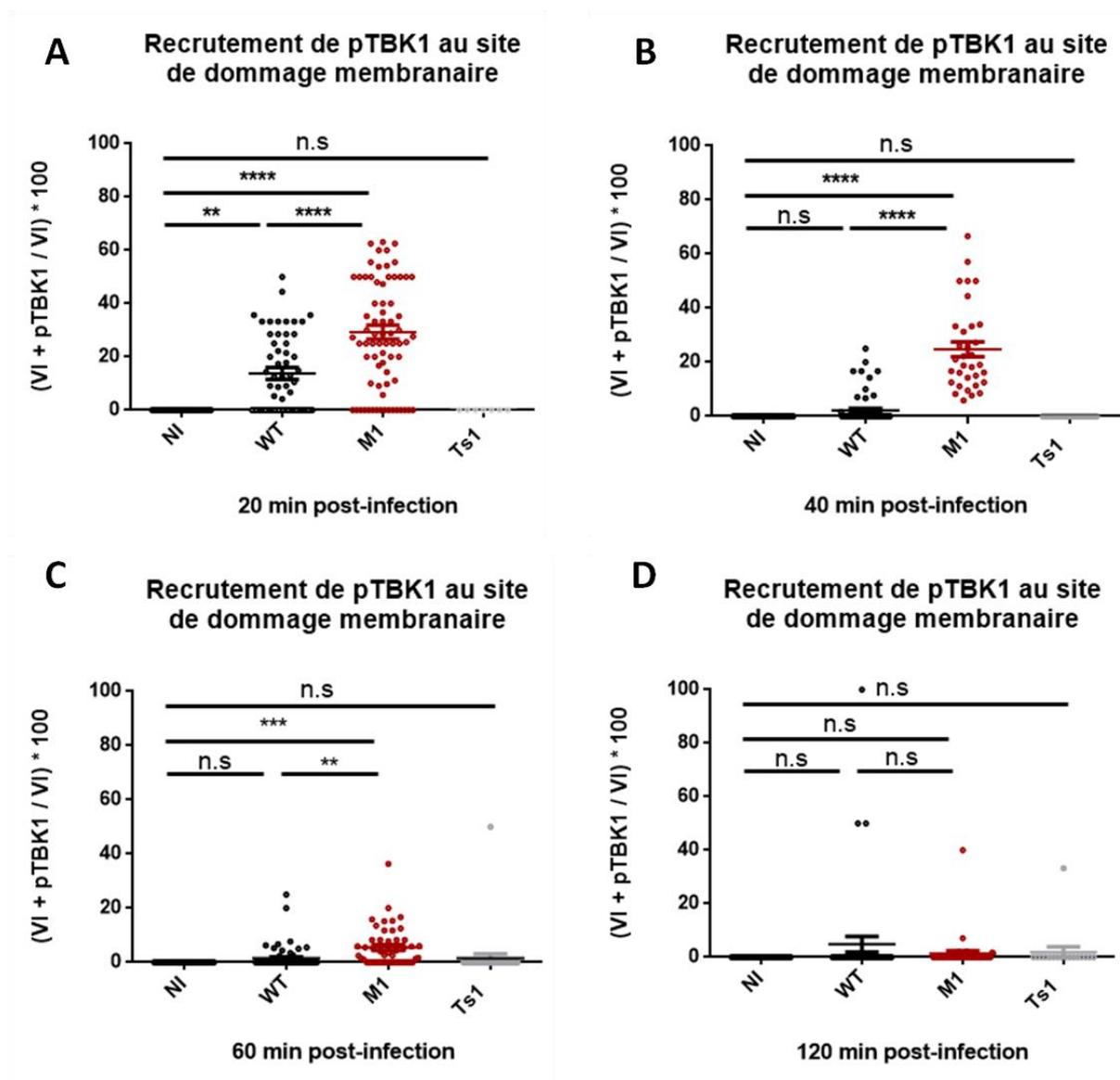
n.s = non significatif; \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ .

A 20 min post-infection (**Figure 45A**), notre analyse quantitative montre que la colocalisation de TBK1 activé avec la protéine VI est significativement supérieure avec le mutant M1 (30 %) qu'avec le virus WT (14 %), ce qui corrèle avec les résultats obtenus précédemment par western-blot. L'analyse après 40 min d'infection (**Figure 45B**) confirme la tendance précédente : l'infection par le virus M1 induit le recrutement significatif de pTBK1 aux sites de dommage membranaire, contrairement à l'infection par le virus WT (25 % de colocalisation pour le M1 contre 2 % avec le WT). De même, 60 min après l'infection la différence entre WT et M1 reste significative (5 % de colocalisation à 60 min post-infection avec le M1) (**Figure 45C**) jusqu'à 120 min post infection (**Figure 45D**) où aucun des virus, ni WT, ni mutant, n'induit de colocalisation entre pTBK1 et la protéine VI. Ces données confirment une différence de comportement entre le virus WT et le virus M1 et indiquent que le virus WT parvient à limiter le recrutement de TBK1 aux sites de dommage membranaire contrairement au mutant M1.

L'ensemble de ces données a également été normalisé par le nombre de virus fluorescents détectés dans la cellule afin de tenir compte des différences d'efficacité d'infection entre les virus. Les résultats obtenus sont identiques à ceux présentés et ne seront donc pas décrits, mais permettent de confirmer nos analyses.

Pour confirmer ces résultats, la triple colocalisation entre le virus, la protéine VI et TBK1 activé a été aussi quantifiée (**Figure 46**). La quantification de ces colocalisations est par la suite normalisée par le nombre de capsides détectées par cellule afin d'exprimer le pourcentage de virus associé à ces structures. La **figure 46A** montre les résultats après 20 min d'infection pour les différents virus. Le virus Ts1 n'est pas détecté dans des événements de triples colocalisations, démontrant une nouvelle fois le rôle positif des ruptures membranaires dans le recrutement de TBK1 activé. Le virus WT quant à lui, est peu retrouvé associé à ces sites (moins de 1 % des virus est détecté dans les triples colocalisations). En revanche, le virus M1 est lui significativement détecté au niveau des endosomes rompus (7 % des virus sont associés aux structures positives pour la protéine VI et pTBK1).

Ces résultats indiquent que le virus WT (**Figure 46B**) n'est pas détecté sur ces sites, contrairement au virus M1 (**Figure 46C**). Ce dernier reste associé aux endosomes rompus et positifs pour pTBK1, avec jusqu'à 20 % de virus présents 40 min post-infection, puis



**Figure 45: Etude du recrutement de TBK1 au site de dommage membranaire, au cours du temps**

Les images obtenues par microscopie à fluorescence confocale, sont analysées avec le logiciel Image J afin de quantifier les colocalisations entre la protéine VI et pTBK1. Ces colocalisations sont ensuite normalisées par le nombre de protéine VI détectées afin d'exprimer le pourcentage d'endosomes rompus positifs pour TBK1. Les graphiques représentent les résultats de ces quantifications pour les différents virus à 20 min post-infection (**A**), 40 min post-infection (**B**), 60 min post-infection (**C**) et 120 min post-infection (**D**).

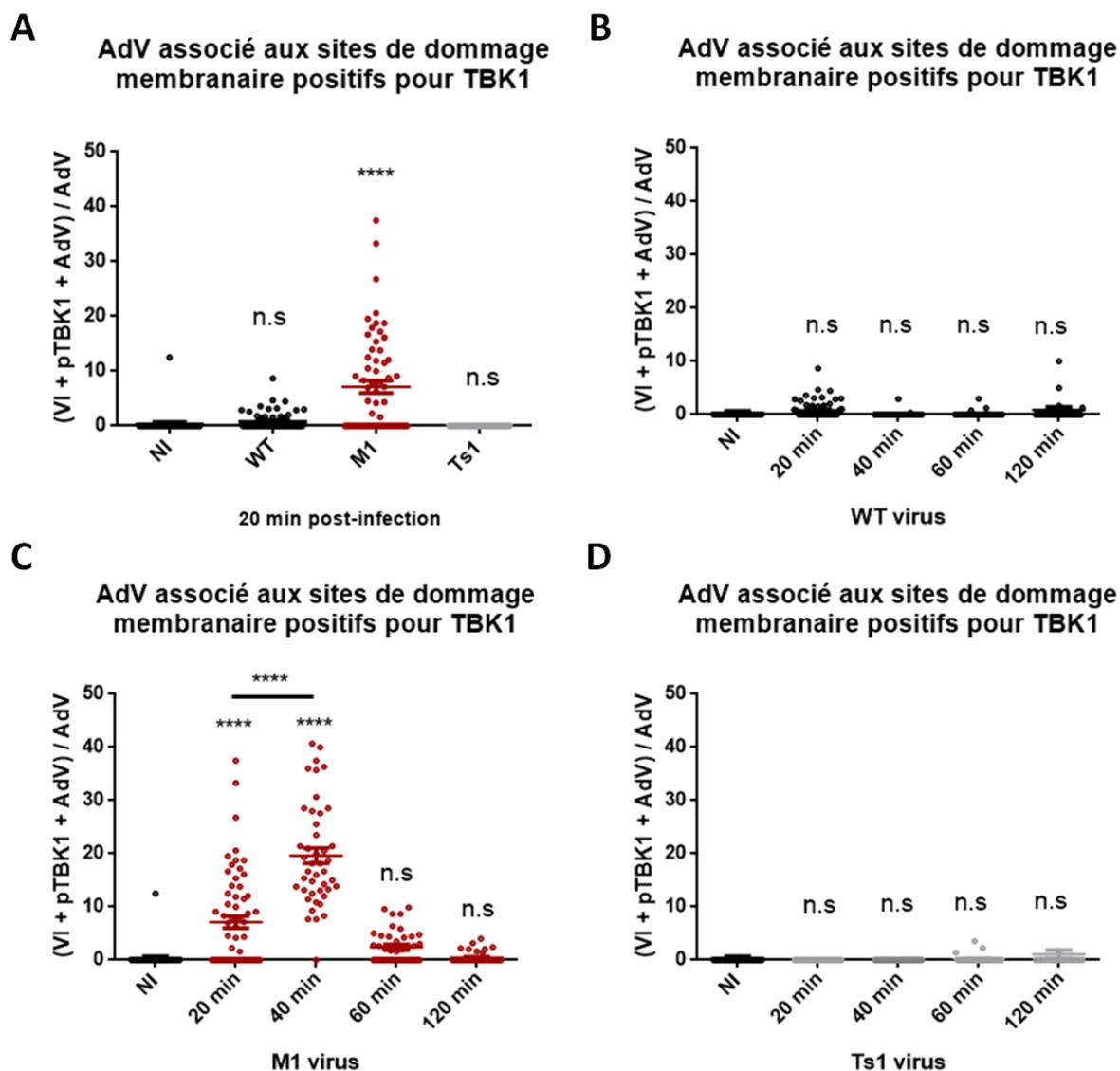
n.s = non significatif; \*\* = P<0,01; \*\*\* = P<0,001; \*\*\*\* = P<0,0001

ce niveau diminue au cours du temps. Le virus Ts1 sert de contrôle négatif (**Figure 46D**).

Ces données suggèrent que le virus M1 reste associé aux endosomes rompus détectés par TBK1 activé, contrairement au virus WT.

L'ensemble de ces analyses démontre que TBK1 activé est bien recruté au niveau des sites de rupture membranaire induits par le virus et que ce recrutement est un procédé dynamique car il varie au cours du temps. De plus, il semblerait que lors d'une infection par le virus WT ce recrutement est partiellement limité, contrairement au mutant M1. Ce mutant est décrit pour présenter un défaut d'échappement endosomal (Wodrich et al., 2010) menant à sa dégradation par autophagie (Montespan et al., 2017). Nous supposons donc que dans le cas du mutant M1, ce virus limiterait moins efficacement le recrutement de TBK1 aux sites de dommage membranaire et sa capsid resterait associée à ce niveau, pouvant alors être dégradée par autophagie. Au contraire, la régulation de TBK1 par le virus WT pourrait être liée à sa capacité à inhiber l'autophagie qu'il induit, ce qui lui permet d'échapper à la dégradation par cette voie. Ainsi, le contrôle de la localisation et de la phosphorylation de TBK1 par le virus pourrait être un moyen d'inhiber l'autophagie qu'il induit lors de son entrée et donc lui permettre d'échapper à cette dégradation.

TBK1 est activé au cours de l'infection et est recruté aux sites de dommage membranaire induits par le virus. Puisque nous n'avons pas détecté de réponse IFN associée à cette activation, nous nous intéresserons donc plus particulièrement aux ruptures de membrane et à leur rôle dans l'activation de TBK1.



#### Figure 46: Quantification de la présence du virus aux sites de dommage membranaire

Les images obtenues par microscopie à fluorescence confocale, sont analysées avec le logiciel Image J afin de quantifier les colocalisations entre la protéine VI, pTBK1 et l'AdV. Ces colocalisations sont ensuite normalisées par le nombre de virus détectés afin d'exprimer le pourcentage de virus présents aux sites de dommage membranaire. Les graphiques représentent les résultats de ces quantifications à 20 min post-infection pour différents virus (A) ou à différents temps post-infection pour le virus WT (B), M1 (C) et Ts1 (D)

n.s = non significatif ; \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ .

## II- Rôle des galectines dans l'activation de TBK1

Les dommages membranaires entraînent l'exposition de glycanes intra-luminaux dans le cytoplasme où ils sont reconnus par des Gal afin de signaler le danger (Vasta et al., 2017). Différentes Gal sont décrites pour détecter les dommages membranaires, dont les Gal 3, 8 et 9 (Thurston et al., 2012). Notre laboratoire a précédemment démontré que Gal3 et Gal8 sont recrutées aux sites de dommage membranaire induits par l'AdV (Montespan et al., 2017). Le virus WT parvient à limiter sa dégradation induite par l'autophagie, et seule la déplétion de Gal8 permet de restaurer spécifiquement l'infectiosité du mutant M1. Gal8 est donc nécessaire à l'activation de l'autophagie dirigée contre le virus et son recrutement ainsi que la réponse associée est limitée par le virus WT.

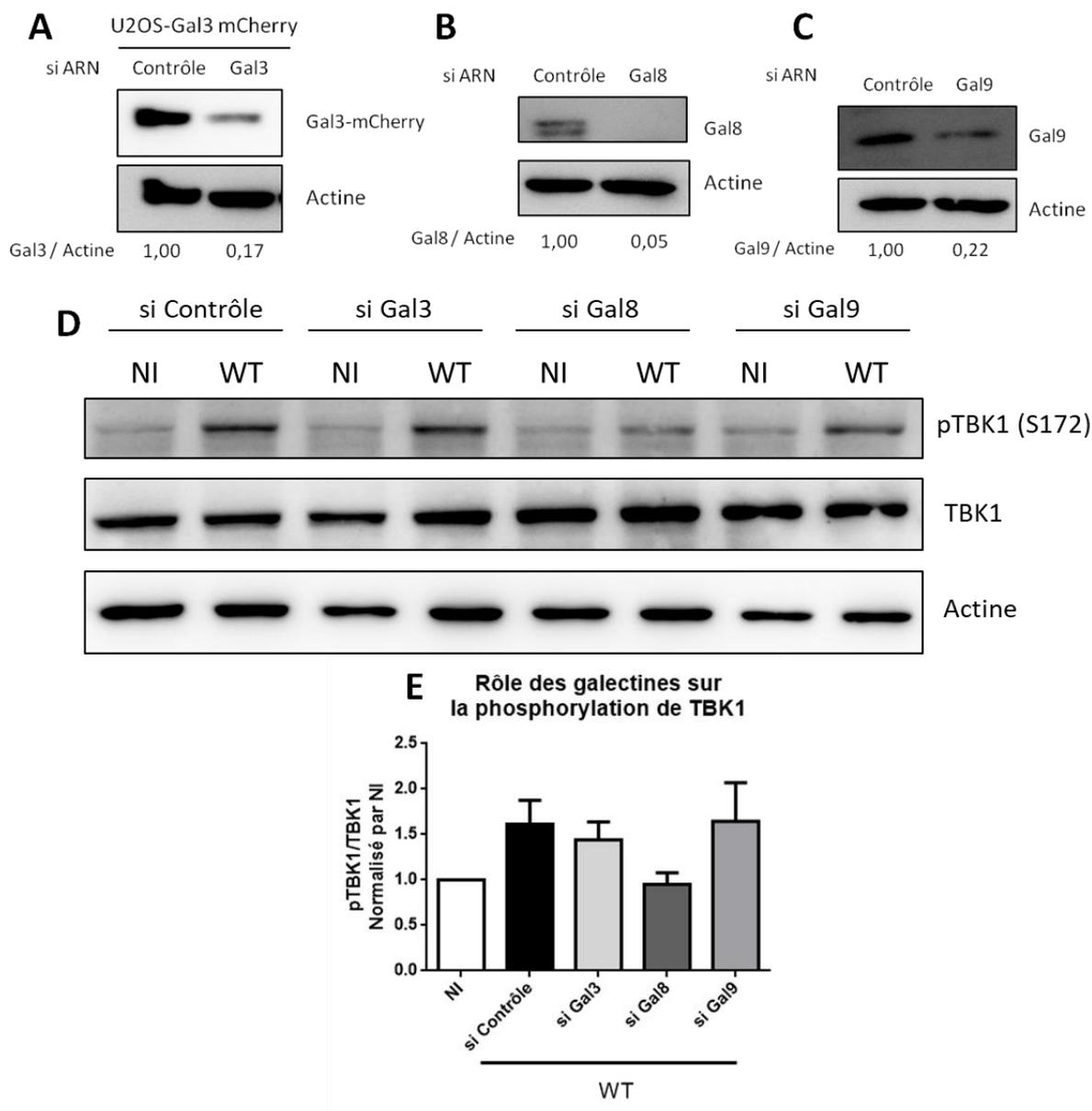
Gal8 est également impliquée dans l'autophagie dirigée contre la bactérie *Salmonella typhimurium* où elle induit le recrutement et l'activation de TBK1 en interagissant avec l'adaptateur NDP52 (Thurston et al., 2009).

Puisque la forme active de TBK1 est recrutée aux sites de dommage membranaire et que ce recrutement est limité par le virus AdV WT (comme pour les galectines), nous souhaitons savoir si, comme ce qui est décrit pour les bactéries, les galectines sont aussi impliquées dans l'activation et le recrutement de TBK1 dans les cellules infectées par l'AdV.

### A) Activation de TBK1 en absence des galectines

Pour étudier le rôle des galectines dans l'activation de TBK1, nous avons analysé l'effet de la déplétion des Gal 3, 8 ou 9 (notées Gal3, Gal8, Gal9) sur la phosphorylation de cette kinase. L'expression des différentes galectines a été réduite par ARN interférence (si Gal) et le niveau d'expression des Gal8 et Gal9 endogènes est vérifié par western-blot (**Figure 47B et 47C**). Comme nous ne possédons pas d'anticorps permettant de détecter Gal3 dans nos conditions expérimentales, une lignée cellulaire U2OS exprimant de façon constitutive Gal3-mCherry (U2OS Gal3-mCherry) a été utilisée et le niveau d'expression de Gal3-mCherry a été analysé par western-blot à l'aide d'anticorps mCherry (**Figure 47A**).

L'actine sert de contrôle de charge dans cette expérience. L'intensité des bandes correspondant aux galectines et à l'actine est mesurée.



**Figure 47: Etude de la phosphorylation de TBK1 en absence de galectines**

Les cellules U2OS ou U2OS-Gal3mCherry sont transfectées avec des si ARN contrôle ou ciblant Gal3 (A), Gal8 (B) et Gal9 (C). L'efficacité de la déplétion est vérifiée par western blot. L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes des galectines et de l'actine est mesurée et le calcul du rapport des différentes galectines par l'actine permet de déterminer l'efficacité de la déplétion. (D) Les cellules sont infectées 30 min avec 5 000 pp/c de virus WT puis lysées et analysées par western blot pour l'expression de TBK1 sous sa forme phosphorylée (pTBK1) et total (TBK1). L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes pTBK1, TBK1 et actine est mesurée et le rapport pTBK1 par TBK1 est calculé. (E) L'expérience est réalisée en triplicat et le rapport, à 30 min post-infection, de pTBK1/TBK1 normalisé par la condition non infectée est reporté dans un graphique pour les différentes galectines déplétées. Le graphique présente la moyenne de ces valeurs et les barres d'erreur correspondent à l'écart à la moyenne (SEM).

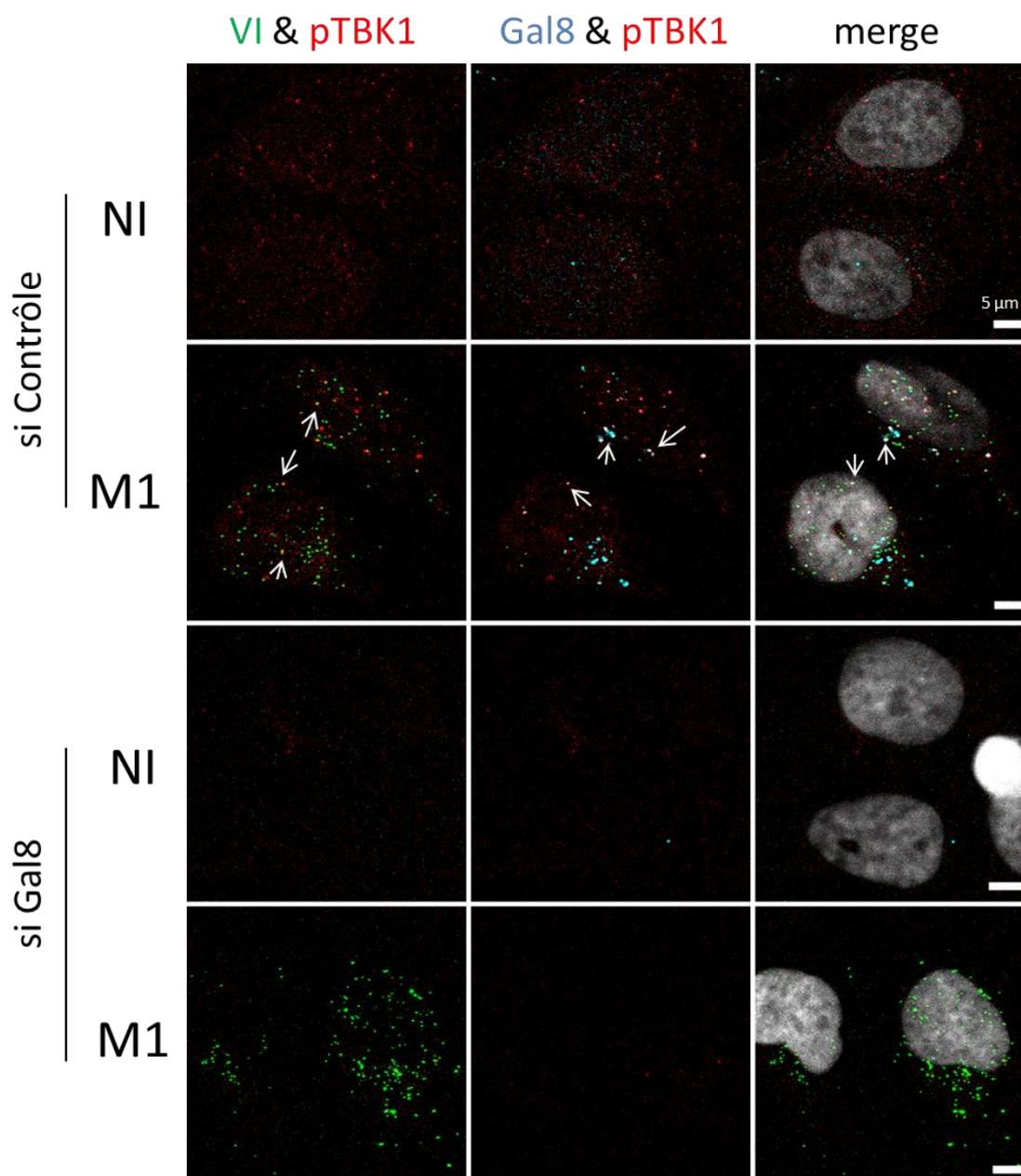
Le rapport Gal/Actine est normalisé par la condition exprimant un ARN interférent contrôle afin de déterminer l'efficacité de la déplétion. Nous constatons une déplétion relativement efficace pour les 3 galectines, avec une diminution d'au moins 80 %.

L'activation de TBK1 a ensuite été analysée dans ces conditions de déplétion dans les cellules infectées par l'AdV WT. Pour cela, les cellules U2OS, traitées avec les différents ARN interférents, ont été infectées pendant 30 min avec 5 000 pp/c d'AdV WT puis lysées. La phosphorylation de TBK1 est détectée par western blot, comme précédemment. Un western blot représentatif de l'expérience est présenté (**Figure 47D**). Celle-ci a été répétée 3 fois de façon indépendante. L'intensité des bandes a été mesurée afin de calculer le rapport pTBK1/TBK1 qui est normalisé par la condition non infectée. La moyenne de ces 3 expériences est présentée sur la **figure 47E**. Les résultats montrent que, dans les cellules exprimant le si ARN contrôle, l'infection par le virus WT induit la phosphorylation de TBK1 et que celle-ci est également détectée dans les cellules infectées exprimant les si ARN dirigés contre Gal3 ou Gal9. En revanche, l'infection dans les conditions de déplétion de Gal8, n'induit pas la phosphorylation de TBK1.

L'ensemble de ces résultats indique que Gal8 semble être nécessaire pour l'activation de TBK1 au cours de l'infection par l'AdV. Or, cette galectine est également celle impliquée dans l'activation de l'autophagie, menant à la dégradation du mutant M1. Il est donc probable que Gal8 soit nécessaire pour le recrutement de TBK1 aux sites de dommage membranaire, cibles de la dégradation par autophagie lors de l'infection par le virus M1.

### **B) Rôle de la galectine 8 dans le recrutement de TBK1**

Afin de déterminer si Gal8 est recrutée aux mêmes sites que TBK1 activé dans les cellules infectées, c'est-à-dire sur les membranes rompues, et si elle est nécessaire à la relocalisation de TBK1, nous avons analysé par immunofluorescence la localisation de Gal8 et pTBK1 dans les cellules infectées (**Figure 48**). Les cellules ont été traitées avec des ARN interférents contrôles (si Contrôle) ou dirigés contre la galectine 8 (si Gal8) afin de déterminer le rôle de cette dernière dans le recrutement de TBK1. Le signal de Gal8 apparaît en cyan et celui de pTBK1 en rouge. Comme dans les expériences d'immunofluorescences précédentes, la détection de la protéine VI du virus (en vert) sert de marqueur des sites de rupture membranaire induits par le virus.



**Figure 48: Etude du recrutement de pTBK1 aux sites de dommage membranaire en absence de galectine 8**

Les cellules U2OS sont transfectées avec des si ARN contrôle (si Contrôle) ou dirigés contre la Gal8 (si Gal8). Les cellules sont infectées avec 5 000 pp/c d'AdV M1. Une immunofluorescence est réalisée 30 min post-infection, avec des anticorps anti protéine VI (en vert), anti pTBK1 (en rouge), anti Gal8 (en cyan) et le DAPI est utilisé pour marquer le noyau (en gris). Les images sont obtenues par microscopie à fluorescence confocale. Les flèches représentent des exemples de colocalisations entre pTBK1 et VI (colonne de gauche), de colocalisations entre pTBK1 et Gal8 (colonne du milieu) et de colocalisations entre pTBK1, la protéine VI et Gal8 (colonne de droite).

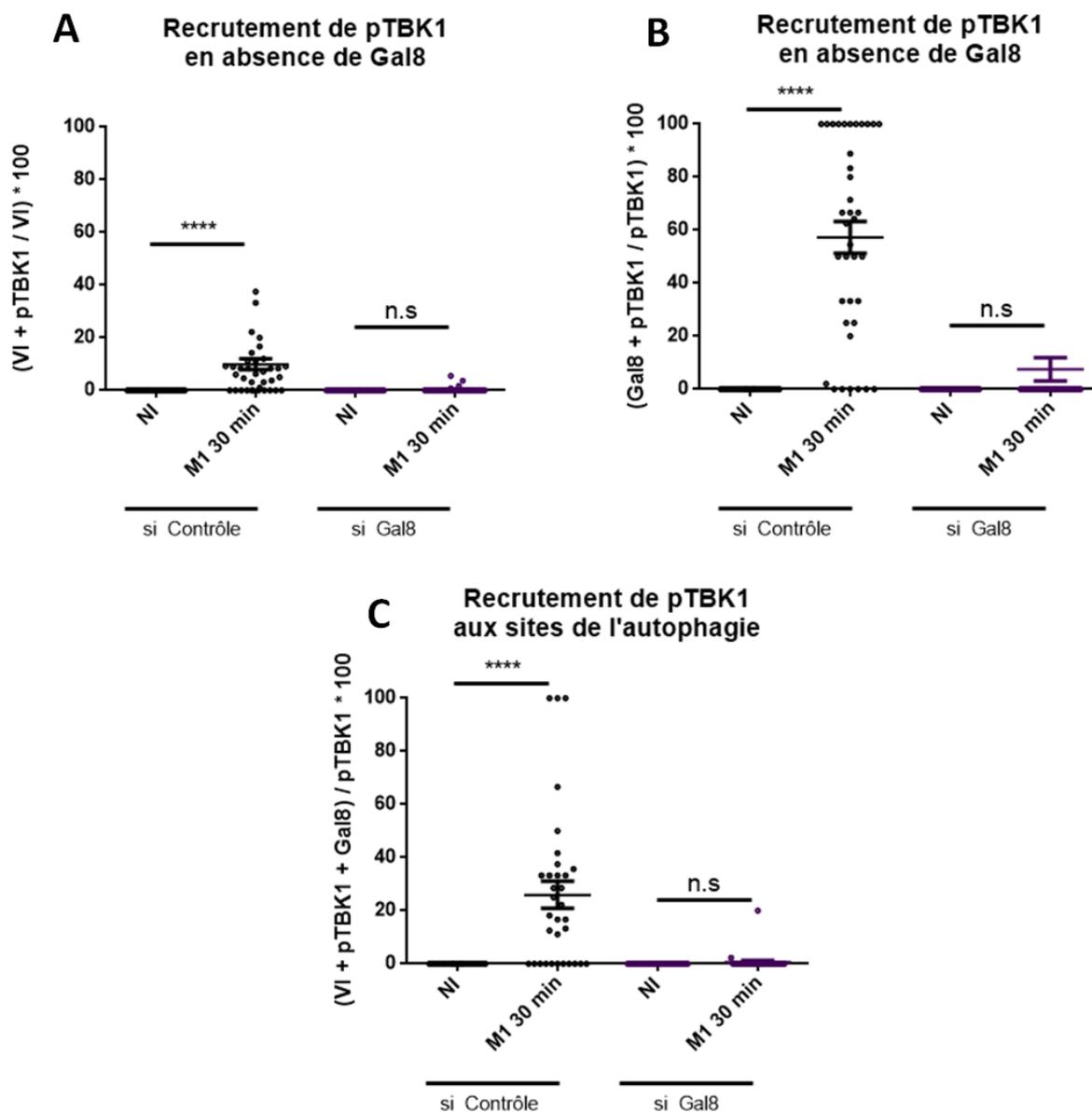
Pour ces expériences, le virus mutant M1 est utilisé car c'est ce virus qui reste le plus longtemps associé aux endosomes rompus et facilite donc la détection des événements de colocalisations.

Les cellules sont infectées 30 min avec 5 000 pp/c du mutant puis sont fixées et analysées par microscopie confocale. Les images des différents plans focaux obtenus sont projetées sur une seule image, dont un exemple est présenté dans la **figure 48**. L'expression de Gal8 ainsi que sa déplétion sont vérifiées respectivement sur le panel du haut (si Contrôle) et du bas (si Gal8). Dans les cellules contrôles infectées, la protéine VI colocalise avec pTBK1 et on observe une colocalisation entre pTBK1 et Gal8. Des événements de triple colocalisation sont également détectés entre pTBK1 / VI / Gal8. Ces signaux pourraient correspondre à l'activation de TBK1 au niveau des membranes endommagées détectées par Gal8 et donc par l'autophagie pour dégradation. En absence de Gal8, la protéine VI est exposée, mais pTBK1 n'est pas détecté. Ce qui confirme les données du western-blot indiquant que Gal8 est nécessaire pour induire l'activation de TBK1. Il semblerait donc qu'en absence de Gal8, la protéine TBK1 ne soit plus activée, ni recrutée aux sites de dommage membranaire marqués par la protéine VI.

Afin de confirmer ces données, une quantification semi-automatique est effectuée pour dénombrer les signaux de colocalisation en présence ou en absence de Gal8.

Dans un premier temps, les colocalisations entre la protéine VI et pTBK1 sont quantifiées puis normalisées par le nombre de protéine VI détectées afin de représenter le pourcentage de dommages membranaires ayant recrutés pTBK1 en fonction de la présence ou non de Gal8 (**Figure 49A**). Nous remarquons qu'en présence de Gal8, environ 10 % des sites de rupture membranaire sont positifs pour pTBK1 30 min après l'infection par le virus M1. En revanche, lorsque l'expression de Gal8 est réduite, TBK1 n'est plus recruté aux sites de rupture membranaire. Il semble donc que la présence de Gal8 soit nécessaire pour le recrutement de TBK1.

Pour confirmer le rôle de Gal8 dans le recrutement et l'activation de TBK1, les colocalisations entre ces deux protéines sont quantifiées. Ces valeurs sont normalisées par le nombre de pTBK1 détectés afin d'exprimer le pourcentage de TBK1 associé à Gal8 (**Figure 49B**).



**Figure 49: Quantification du recrutement de pTBK1 aux sites de dommage membranaire en absence de galectine 8**

(A) Les images obtenues par microscopie à fluorescence confocale, sont analysées avec le logiciel Image J afin de quantifier les colocalisations entre la protéine VI et pTBK1. Ces colocalisations sont ensuite normalisées par le nombre de protéine VI détectées afin d'exprimer le pourcentage d'endosomes rompus positifs pour TBK1. Le graphique représente ces résultats dans les cellules transfectées avec le si ARN contrôle (en noir) ou le si ARN ciblant Gal8 (en violet). (B) Les images obtenues par microscopie à fluorescence confocale, sont analysées avec le logiciel Image J afin de quantifier les colocalisations entre Gal8 et pTBK1. Ces colocalisations sont ensuite normalisées par le nombre de pTBK1 détecté afin de représenter le pourcentage de TBK1 recruté par Gal8. Le graphique représente ces résultats dans les cellules transfectées avec le si ARN contrôle (en noir) ou le si ARN ciblant Gal8 (en violet). (C) Les images obtenues par microscopie à fluorescence confocale, sont analysées avec le logiciel Image J afin de quantifier les colocalisations entre la protéine VI, pTBK1 et Gal8. Ces colocalisations sont ensuite normalisées par le nombre de pTBK1 détectées afin d'exprimer le pourcentage de TBK1 recrutés aux sites de l'autophagie. Le graphique représente ces résultats dans les cellules transfectées avec le si ARN contrôle (en noir) ou le si ARN ciblant Gal8 (en violet).

n.s = non significatif, \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ .

Nous remarquons ainsi que, dans les cellules infectées par le virus M1, environ 50 % de la forme phosphorylée de TBK1 est recrutée sur des structures positives pour Gal8. La majorité de TBK1 phosphorylé est donc retrouvée en association avec Gal8.

Pour confirmer que ces sites de recrutement de pTBK1 par Gal8 correspondent aux sites de dommage membranaire induits par le virus, les triples colocalisations entre la protéine VI Gal8 et pTBK1 sont quantifiées. Ces résultats sont normalisés par le nombre total de pTBK1 détecté (**Figure 49C**). Nous remarquons ainsi que 22 % de la forme phosphorylée de TBK1 sont recrutés sur ces structures qui correspondraient aux endosomes rompus reconnus par Gal8. Le recrutement de TBK1 semblerait donc avoir un lien avec l'activation de l'autophagie permettant de dégrader les endosomes rompus, et par extension le virus M1 qui ne peut pas s'en échapper efficacement.

Ces résultats indiquent que Gal8 est nécessaire pour l'activation et le recrutement de TBK1 aux sites de dommage membranaire induits par l'AdV. La triple colocalisation entre protéine VI / pTBK1 / Gal8 suggère que ces structures correspondent aux endosomes rompus contenant le virus et induisant sa dégradation s'il ne s'en échappe pas, comme c'est le cas pour le mutant M1. Sachant que Gal8 est nécessaire à l'activation de l'autophagie induite par l'AdV (Montespan et al., 2017), nos résultats suggèrent un lien direct entre l'activation de TBK1 par les dommages membranaires induits par le virus et l'autophagie dépendante de Gal8.

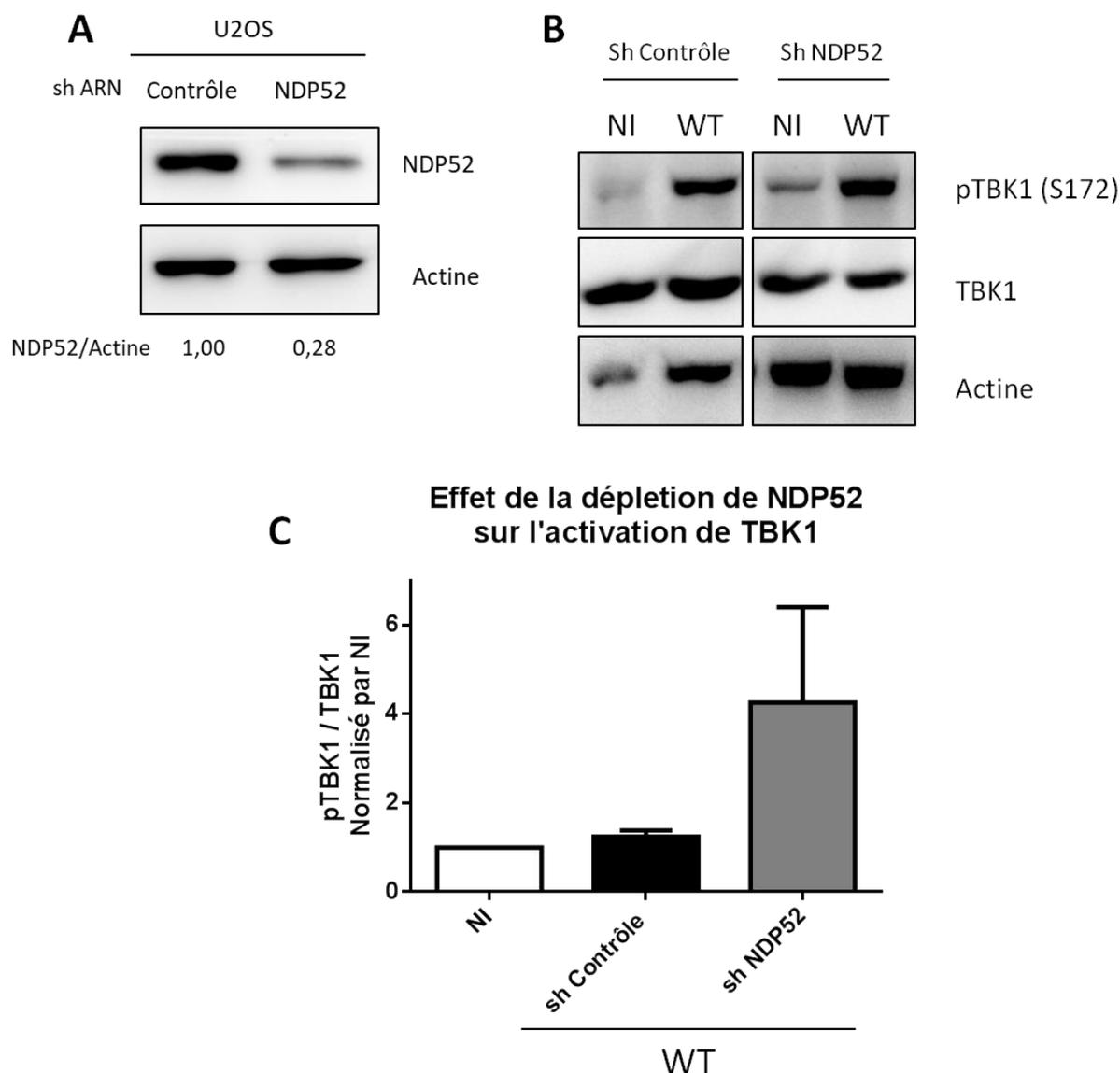
Dans le cas de *Salmonella typhimurium*, il a été montré que Gal8 est recrutée au niveau des vacuoles lysées par la bactérie et que ceci permet le recrutement et l'activation de TBK1. Dans ce modèle, cette étape nécessite la présence d'un adaptateur de l'autophagie, NDP52 qui interagit directement avec Gal8 et recrute indirectement TBK1 (Thurston et al., 2016). Dans la suite de ce travail, nous avons voulu savoir si l'activation de TBK1 au cours de l'infection par l'AdV dépend du même mécanisme et nous avons donc étudié l'implication des adaptateurs de l'autophagie dans la phosphorylation de TBK1.

### III- Rôle des adaptateurs conventionnels de l'autophagie dans l'activation de TBK1

#### A) **Activation de TBK1 en absence des adaptateurs**

Le premier adaptateur que nous avons étudié est NDP52 du fait de son rôle dans l'activation de l'autophagie lors d'infection par Salmonelle (Thurston et al., 2016). Pour déterminer si NDP52 a le même rôle dans le cas de l'AdV, nous avons étudié l'impact de sa déplétion sur l'activation de TBK1 dans les cellules infectées. Pour cela, des cellules exprimant constitutivement des ARN interférents dirigés contre NDP52 sont utilisées (sh NDP52). L'efficacité de la déplétion, est vérifiée par western blot qui montre une diminution de la quantité de NDP52, révélant une déplétion partielle de la protéine (**Figure 50A**). Les cellules U2OS sont infectées avec 5 000 pp/c d'AdV WT, puis lysées 30 min après l'infection. Un western blot est réalisé afin de détecter le niveau de phosphorylation de TBK1 (**Figure 50B**). Les résultats montrent que la diminution de NDP52 n'a pas d'effet sur la phosphorylation de TBK1 dans les cellules infectées par rapport aux cellules contrôles. Afin de confirmer ces observations, l'expérience a été réalisée trois fois. L'intensité des signaux de pTBK1 et de TBK1 a été mesurée afin de déterminer les valeurs du rapport pTBK1/TBK1. Ce rapport est normalisé par la condition non infectée et la moyenne des 3 expériences indépendantes est reportée dans la **figure 50C**. Ces données confirment que la diminution de NDP52 dans les cellules infectées n'a pas d'effet sur l'activation de TBK1 induite par l'AdV. Il semblerait même que la diminution de NDP52 favorise la phosphorylation de TBK1 qui est plus élevée dans ces cellules que dans les conditions contrôles.

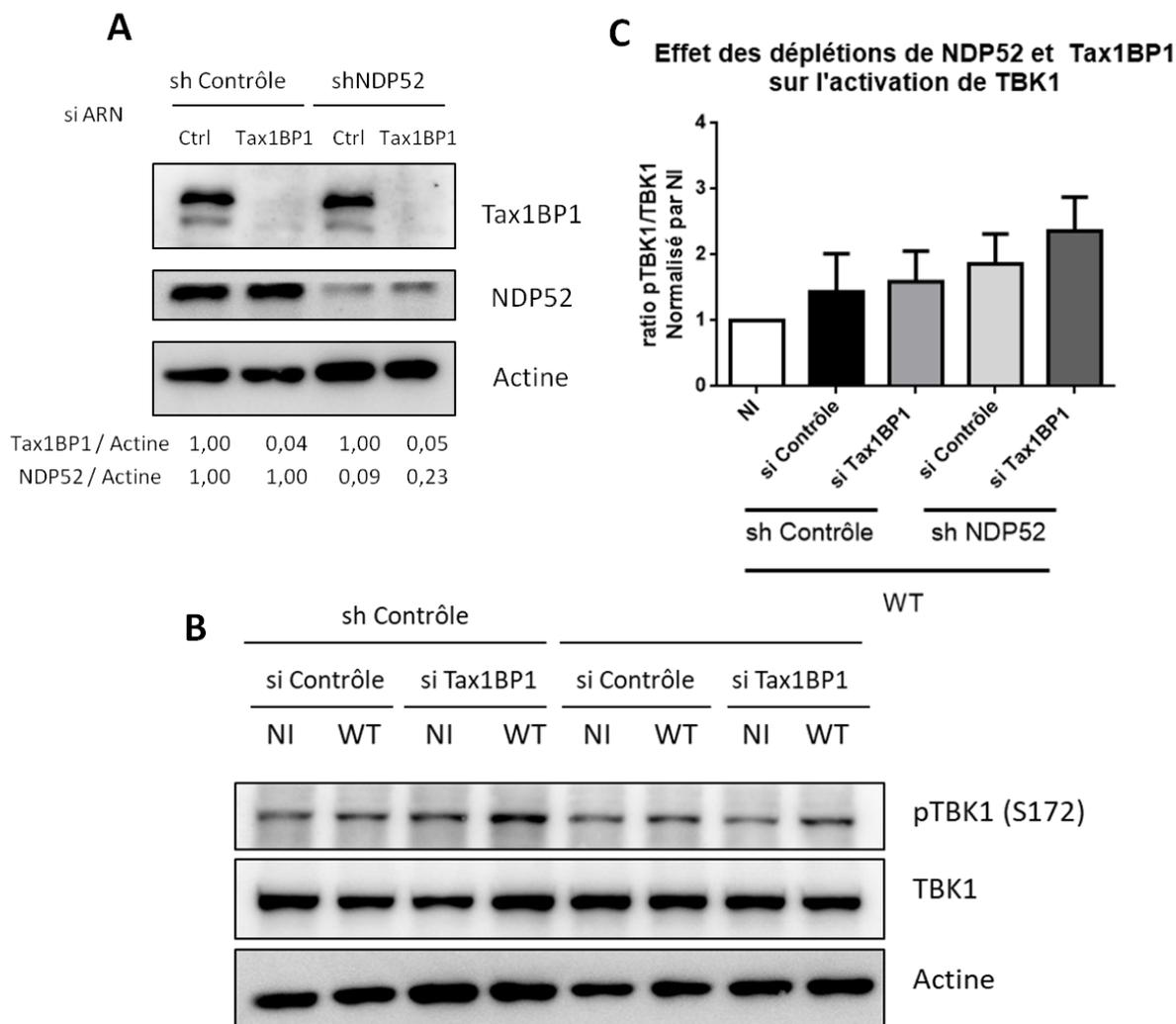
Cependant, NDP52 possède un paralogue fonctionnel nommé Tax1BP1 qui dans les cellules où l'expression de NDP52 est réduite pourrait compenser ce défaut (Tumbarello et al., 2015). Afin de déterminer si ces deux adaptateurs coopèrent lors de l'infection par l'AdV, nous avons analysé l'effet de la double déplétion sur l'activation de TBK1. Les cellules U2OS contrôle ou exprimant l'ARN interférent ciblant NDP52 de façon constitutive (sh NDP52) sont transfectées avec des ARN interférents contrôles ou dirigés contre Tax1BP1 (si Tax1BP1). L'efficacité de la déplétion est vérifiée par western blot (**Figure 51A**). Elle reste partielle pour NDP52 mais est pratiquement totale pour Tax1BP1. Les cellules sont infectées avec 5 000 pp/c d'AdV WT puis lysées 30 min après l'infection. Le niveau de phosphorylation de TBK1 est analysé par western blot (**Figure 51B**). La déplétion de ces adaptateurs ne semble pas avoir d'effet sur l'activation de TBK1 qui est toujours phosphorylé.



### Figure 50: Etude de la phosphorylation de TBK1 en absence de NDP52

(A) Les cellules U2OS exprimant des sh ARN contrôle (sh Contrôle) ou ciblant NDP52 (sh NDP52) sont lysées puis l'efficacité de la déplétion est vérifiée par western blot. L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes de NDP52 et de l'actine est mesurée et le calcul du rapport NDP52 par l'actine permet de déterminer l'efficacité de la déplétion. (B) Les cellules sont infectées 30 min avec 5 000 pp/c de virus WT puis lysées et analysées par western blot pour l'expression de TBK1 sous sa forme phosphorylée (pTBK1) et total (TBK1), l'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes pTBK1, TBK1 et actine est mesurée et le rapport pTBK1 par TBK1 est calculé.

(C) L'expérience est réalisée en triplicat et le rapport, à 30 min post-infection, de pTBK1/TBK1 normalisé par la condition non infectée est reporté dans ce graphique pour les différentes conditions de déplétion. Le graphique présente la moyenne de ces valeurs et les barres d'erreur correspondent à l'écart à la moyenne (SEM).



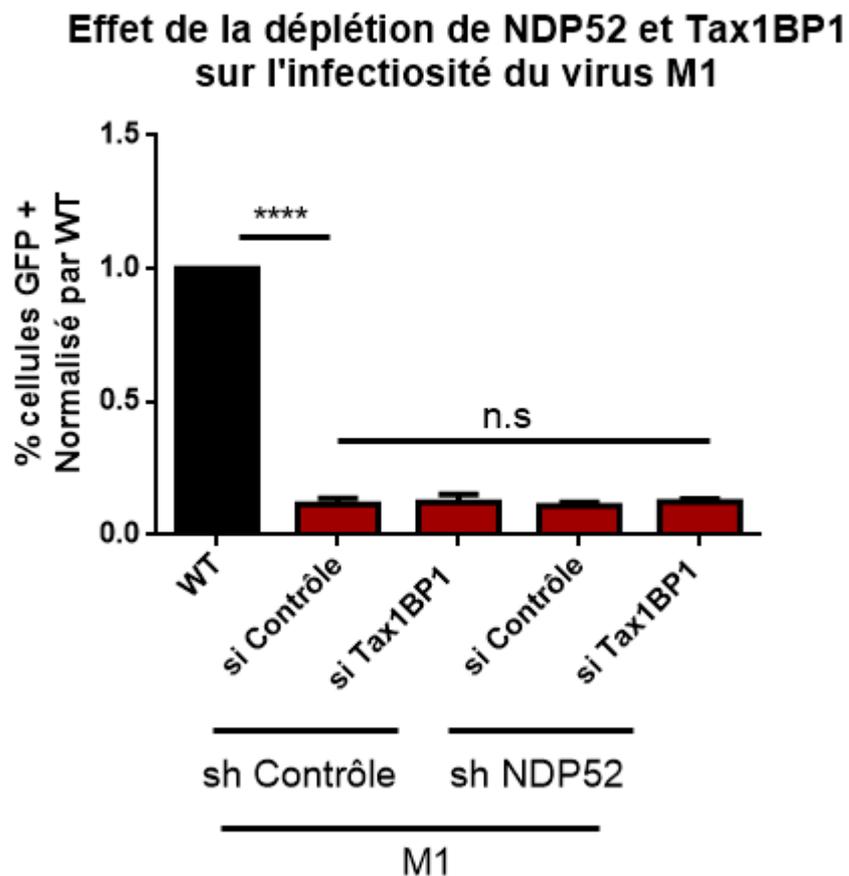
**Figure 51: Etude de la phosphorylation de TBK1 en absence de NDP52 et de Tax1BP1**

(A) Les cellules U2OS exprimant des sh ARN contrôle (sh Contrôle) ou ciblant NDP52 (sh NDP52) sont transfectées avec des si ARN contrôle (si Contrôle) ou dirigés contre Tax1BP1 (si Tax1BP1). Elle sont ensuite lysées et l'efficacité de la déplétion est vérifiée par western blot. L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes des NDP52, de Tax1BP1 et de l'actine est mesurée et le calcul du rapport NDP52 par l'actine et Tax1BP1 par l'actine permet de déterminer l'efficacité de la déplétion. (B) Les cellules sont infectées 30 min avec 5 000 pp/c de virus WT puis lysées et analysées par western blot pour l'expression de TBK1 sous sa forme phosphorylée (pTBK1) ou total (TBK1), l'actine sert de contrôle de charge. (C) L'expérience est réalisée en triplicat et le rapport, à 30 min post-infection, de pTBK1/TBK1 normalisé par la condition non infectée est reporté dans ce graphique pour les différentes conditions de déplétion. Le graphique présente la moyenne de ces valeurs et les barres d'erreurs correspondent à l'écart à la moyenne (SEM).

Comme précédemment, pour confirmer ces résultats, 3 expériences indépendantes ont été réalisées et la moyenne du rapport pTBK1/TBK1 de ces expériences est représentée sur la **figure 51C**. Ces résultats confirment que ni la déplétion partielle de NDP52, ni celle de Tax1BP1, ni la combinaison des deux ne réduit la phosphorylation de TBK1 qui reste comparable dans chaque cas, voire même plus élevée que dans les cellules contrôles. Ces deux adaptateurs de l'autophagie ne semblent donc pas impliqués dans l'activation de TBK1 induite par l'AdV, contrairement à ce qui est décrit pour les bactéries.

Pour le confirmer, nous avons utilisé l'infectiosité du virus M1 comme marqueur de l'activation de l'autophagie induite par l'AdV. En effet, ce mutant est dégradé par autophagie. Ainsi, si ces adaptateurs sont des facteurs clés de la réponse dirigée contre l'AdV, alors dans les conditions de déplétion de NDP52 et/ou Tax1BP1, le virus M1 ne devrait plus être dégradé et donc être aussi infectieux que le virus WT. Pour cette expérience, les cellules U2OS contrôles ou exprimant des ARN interférents contre ces deux adaptateurs (simple ou double déplétion) sont infectées avec des vecteurs AdV WT ou M1 exprimant la GFP. L'expression de la GFP dans les cellules est ensuite analysée par cytométrie en flux pour déterminer le pourcentage de cellules infectées. L'infectiosité du virus M1 est normalisée par rapport à celle du virus WT (**Figure 52**). Nos résultats confirment le défaut d'infectiosité du mutant M1 dans les conditions contrôles, qui est 7 fois moins infectieux. Ce défaut est identique dans les conditions de déplétion des adaptateurs NDP52 et Tax1BP1, seule ou en combinaison. Ces résultats montrent que ni NDP52, ni Tax1BP1 ne sont indispensables à l'activation de l'autophagie dirigée contre l'AdV et corrélerent avec les résultats précédents du laboratoire sur NDP52 (Montespan et al., 2017).

Notre laboratoire a mis en évidence qu'un autre adaptateur de l'autophagie, p62, est recruté lors de l'infection par l'AdV (Montespan et al., 2017). Cet adaptateur est également recruté lors de l'infection bactérienne et permet d'activer l'autophagie en détectant l'ubiquitination de la bactérie (Pilli et al., 2012), et est phosphorylé par TBK1 (Matsumoto et al., 2015). Pour savoir si p62 est impliqué dans l'activation de TBK1 par l'AdV, les cellules U2OS ont été transfectées avec des ARN interférents dirigés contre p62 (si p62). Afin de s'assurer qu'il n'y a pas d'effet de compensation potentielle entre adaptateurs, cette étude a également été réalisée dans des cellules où l'expression de NDP52 est diminuée (sh NDP52).



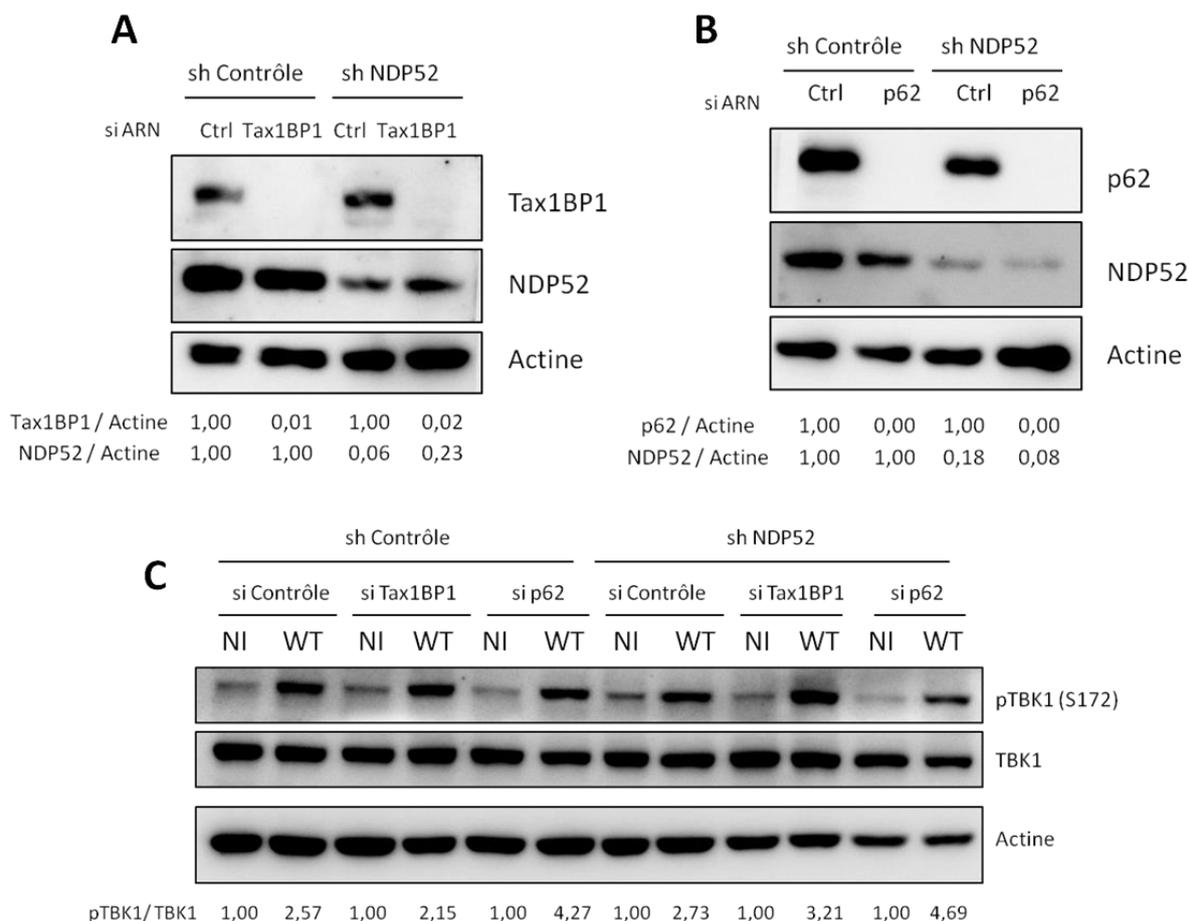
**Figure 52: Etude de l'infectiosité du virus M1 en absence des adaptateurs NDP52 et Tax1BP1**

Les cellules U2OS exprimant des sh ARN contrôle ou ciblant NDP52 sont transfectées avec des si ARN contrôle ou dirigés contre Tax1BP1. Les cellules sont infectées avec 50 pp/c des vecteurs WT (en noir) ou M1 (en rouge). Le pourcentage de cellules exprimant la GFP est déterminé par cytométrie en flux.

n.s = non significatif, \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ .

L'efficacité de la déplétion des différents adaptateurs est déterminée par western blot (**Figures 53A et 53B**). Celle de NDP52 est partielle, alors que celle de Tax1BP1 et p62 est pratiquement totale. Ces cellules sont infectées pendant 30 min avec 5 000 pp/c d'AdV WT puis lysées afin de déterminer le niveau de phosphorylation de TBK1 par western blot (**Figure 53C**). Nos résultats, d'une part, confirment les données précédentes où ni la déplétion de NDP52, ni celle de Tax1BP1 n'a d'effet sur l'activation de TBK1 et d'une autre part, ils montrent que la déplétion de p62 ne diminue pas non plus la phosphorylation de TBK1 induite par l'infection. Au contraire, comme pour NDP52, la déplétion de p62 semble augmenter le niveau de phosphorylation de TBK1 induit par l'AdV.

L'ensemble des résultats démontre que les adaptateurs NDP52, Tax1BP1 et p62 ne sont pas impliqués dans l'activation de TBK1 par l'AdV, contrairement à ce qui est décrit pour la Salmonelle. Bien que présentant des similitudes avec le modèle bactérien, telles que l'activation de TBK1 par la détection des dommages membranaires par Gal8, les mécanismes menant à cette activation semblent différents dans le cas de l'AdV. En effet, les adaptateurs de l'autophagie NDP52, Tax1BP1 et p62 ne sont pas essentiels dans ce processus. En revanche, nos données suggèrent que NDP52 et p62 pourraient être impliqués dans la régulation de l'activation de TBK1. En effet, lorsque ces adaptateurs sont absents ou en quantité limitée, le taux de TBK1 phosphorylé est plus élevé que dans les cellules contrôles. Ceci pourrait indiquer que les adaptateurs, probablement par le biais de l'autophagie, peuvent limiter l'activation de cette kinase en induisant sa propre dégradation par autophagie.

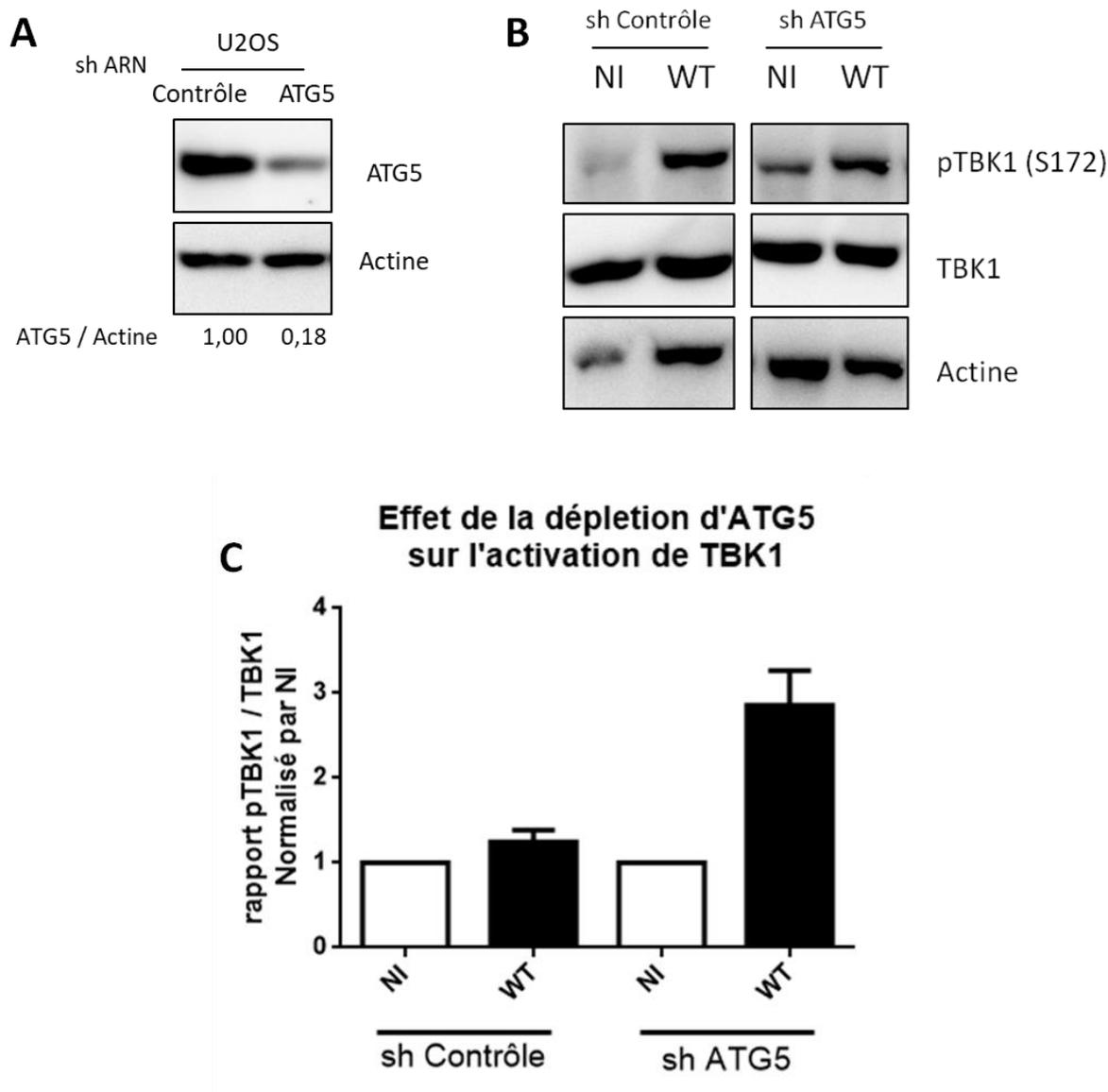


**Figure 53: Etude de la phosphorylation de TBK1 en absence des adaptateurs NDP52, Tax1BP1 et p62**

(A et B) Les cellules U2OS exprimant des sh ARN contrôle ou ciblant NDP52 sont transfectées avec des si ARN contrôle ou dirigés contre Tax1BP1 ou p62. Les cellules sont ensuite lysées et les protéines sont analysées par western blot. L'intensité des bandes des NDP52, de p62, de Tax1BP1 et de l'actine est mesurée et le calcul du rapport NDP52 ou Tax1BP1 ou p62 par l'actine permet de déterminer l'efficacité de la déplétion. (C) Les cellules sont infectées 30 min avec 5 000 pp/c de virus WT puis lysées et analysées par western blot pour l'expression de TBK1 sous sa forme phosphorylée (pTBK1) et total (TBK1), l'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes pTBK1, TBK1 et actine est mesurée et le rapport pTBK1 par TBK1 est calculé.

### **B) Rôle de l'autophagie dans la régulation de l'activation de TBK1**

Afin de déterminer si l'autophagie est impliquée dans le contrôle de l'activation de TBK1, des cellules où l'activation de l'autophagie est limitée par déplétion de la protéine ATG5 (U2OS-shATG5) sont utilisées. Un western blot permet de vérifier l'efficacité de la déplétion d'ATG5, et celle-ci est partielle avec environ 80 % d'efficacité (**Figure 54A**). Ces cellules sont infectées avec 5 000 pp/c d'AdV WT puis lysées 30 min après l'infection, et l'activation de TBK1 est analysée par western blot (**Figure 54B**). L'expérience est répétée trois fois de façon indépendante et les résultats présentés sur la **figure 54C**. Les résultats montrent qu'en absence d'autophagie fonctionnelle (sh ATG5), le taux de TBK1 phosphorylé augmente par rapport aux cellules contrôles. Ces résultats supportent le rôle éventuel de l'autophagie dans le contrôle de l'activation de TBK1. La dégradation par autophagie de TBK1 activé pourrait constituer un rétrocontrôle négatif, limitant l'activation de la kinase ainsi que celle de l'autophagie une fois que le dommage membranaire a été détecté puis éliminé.



### Figure 54: Etude de la phosphorylation de TBK1 en absence d'ATG5

(A) Les cellules U2OS exprimant des sh ARN contrôle ou ciblant ATG5 sont lysées puis l'efficacité de la déplétion est vérifiée par western blot. L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes ATG5 et de l'actine est mesurée et le calcul du rapport ATG5 par l'actine permet de déterminer l'efficacité de la déplétion (B) Les cellules sont infectées 30 min avec 5 000 pp/c de virus WT puis lysées et analysées par western blot pour l'expression de TBK1 sous sa forme phosphorylée (pTBK1) et total (TBK1). L'actine sert de contrôle de charge. (C) L'expérience est réalisée en triplicat et le rapport, à 30 min post-infection, de pTBK1/TBK1 normalisé par la condition non infectée est reporté dans ce graphique pour les différentes conditions de déplétions. Le graphique présente la moyenne de ces valeurs et les barres d'erreurs correspondent à l'écart à la moyenne (SEM).

#### IV- Conclusion générale du chapitre

Au cours de ce chapitre, nous avons pu mettre en évidence que la kinase TBK1 est phosphorylée lors de l'infection par l'AdV. Cette activation est dépendante des ruptures de membrane induites lors de l'entrée du virus dans la cellule et de Gal8. La forme activée de TBK1 est recrutée au niveau des sites de rupture membranaire associés à cette galectine. Les résultats obtenus avec le mutant M1, dégradé par autophagie, laissent supposer que TBK1 pourrait également être impliqué dans ce processus. En effet, contrairement au virus WT, le mutant M1 ne parvient pas à contrôler, ni le recrutement de TBK1 aux membranes endommagées, ni son activation. De plus, l'activation de TBK1 se faisant indépendamment des adaptateurs NDP52, Tax1BP1 et p62, il serait intéressant d'étudier l'implication éventuelle d'adaptateurs non conventionnels afin de mettre en évidence les différences d'activation de TBK1 entre le modèle bactérien et l'activation induite par l'AdV.



## CHAPITRE 4

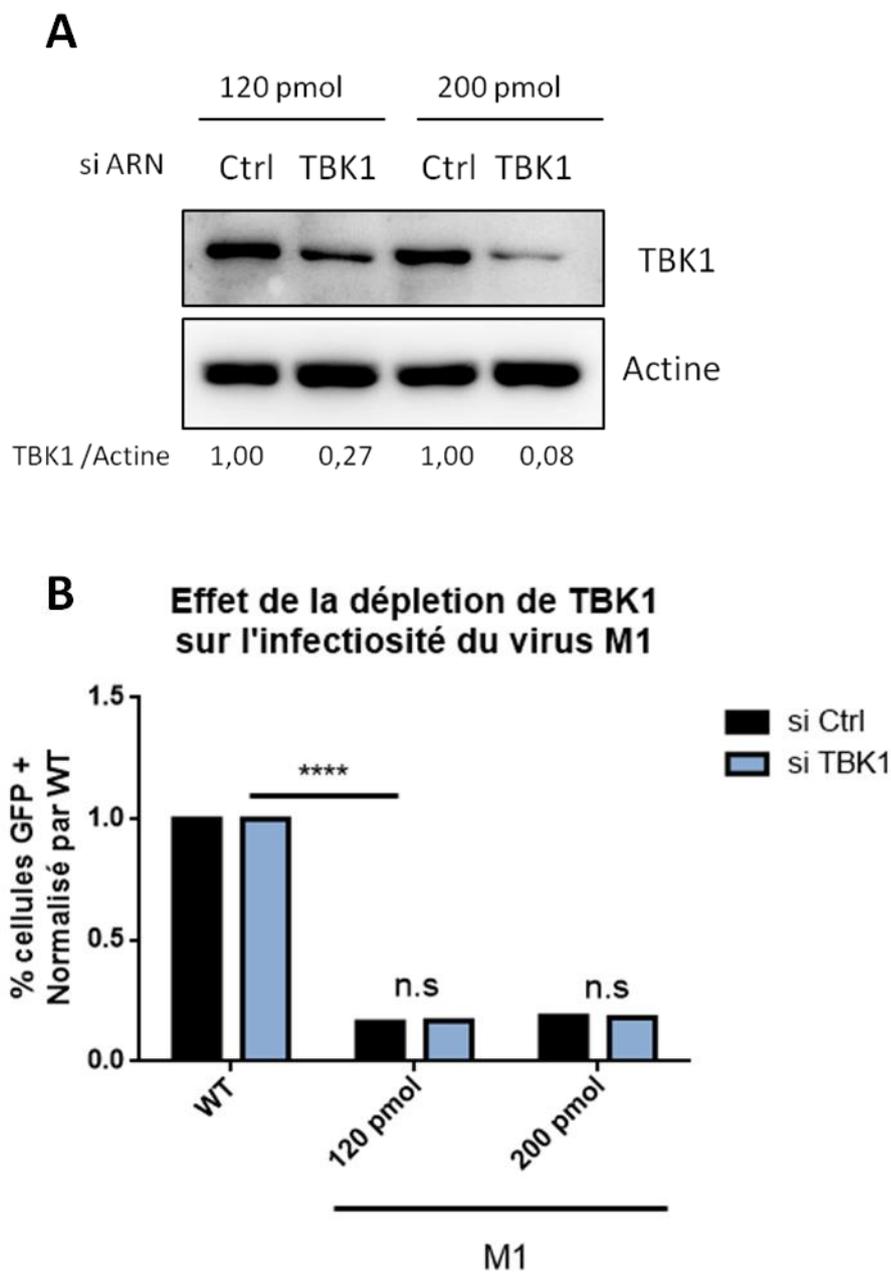
### Etude de l'implication de TBK1 dans l'activation de l'autophagie

L'activation de TBK1 au cours de l'infection par l'AdV semble corrélérer avec les mécanismes d'activation de l'autophagie. En effet, cette activation est dépendante des ruptures de membrane et de Gal8 et elle se fait au niveau des sites de dommage membranaire induits par le virus. De plus, tout comme l'autophagie, l'activation de TBK1 est limitée par le virus WT, mais pas par le virus M1. Ces données suggèrent un lien étroit entre l'activation de TBK1 et l'autophagie induite par l'AdV. Afin de confirmer le rôle de TBK1 dans ce processus, l'activation de l'autophagie induite par le virus a été étudiée en utilisant des ARN interférents afin de limiter l'expression de TBK1 et en utilisant des inhibiteurs fonctionnels de cette kinase. L'étude de l'infectiosité du mutant M1 est utilisée dans ce chapitre comme marqueur de l'activation de l'autophagie dirigée contre le virus, et nous étudierons par la suite l'état de la lipodation de LC3 suite à l'infection afin de confirmer l'implication de TBK1 dans le processus d'autophagie.

#### I- Rôle de TBK1 dans l'infectiosité du mutant M1

##### A) Effet de la déplétion partielle de TBK1

Afin d'étudier l'implication de TBK1 dans l'activation de l'autophagie induite par le virus, l'infectiosité du mutant M1 est suivie. En effet, ce mutant est un marqueur de la dégradation par autophagie et nous permet de déterminer si l'activation de l'autophagie est fonctionnelle. Ainsi, si TBK1 est impliqué dans l'activation de l'autophagie dirigée contre l'AdV, alors sa déplétion devrait restaurer l'infectiosité du mutant M1. Pour étudier cela, l'expression de TBK1 dans les cellules U2OS est diminuée par ARN interférence (si TBK1). L'efficacité de déplétion étant partielle, nous avons voulu l'améliorer en augmentant la concentration des ARN interférents utilisés : avec une concentration d'ARN interférent de 120  $\mu\text{mol}$ , l'efficacité de la déplétion est d'environ 70 % et atteint 90 % avec 200  $\mu\text{mol}$  (**Figure 55A**). La concentration élevée en ARN interférents améliore la déplétion de TBK1, mais celle-ci reste partielle. Les cellules sont infectées avec 50 pp/c des vecteurs d'AdV WT et du virus M1 exprimant le GFP. Les cellules infectées sont dénombrées par cytométrie en flux puis l'infectiosité du virus M1 est normalisée par celle du virus WT. Ce rapport est représenté en fonction des conditions contrôles (colonne noire) ou exprimant des ARN interférents dirigés



**Figure 55: Etude de la déplétion de TBK1 sur l'infectiosité du mutant M1**

(A) Les cellules U2OS exprimant des si ARN contrôle ou ciblant TBK1 sont lysées puis l'efficacité de la déplétion est vérifiée par western blot. L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes TBK1 et de l'actine est mesurée et le calcul du rapport TBK1 par l'actine permet de déterminer l'efficacité de la déplétion. (B) Les cellules contrôles (en noir) ou déplétées pour TBK1 (en bleu clair) sont infectées avec 50 pp/c des vecteurs WT ou M1. Le pourcentage de cellules exprimant la GFP est analysé par cytométrie en flux, puis normalisé par la condition infectée avec le WT.

n.s = non significatif, \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ .

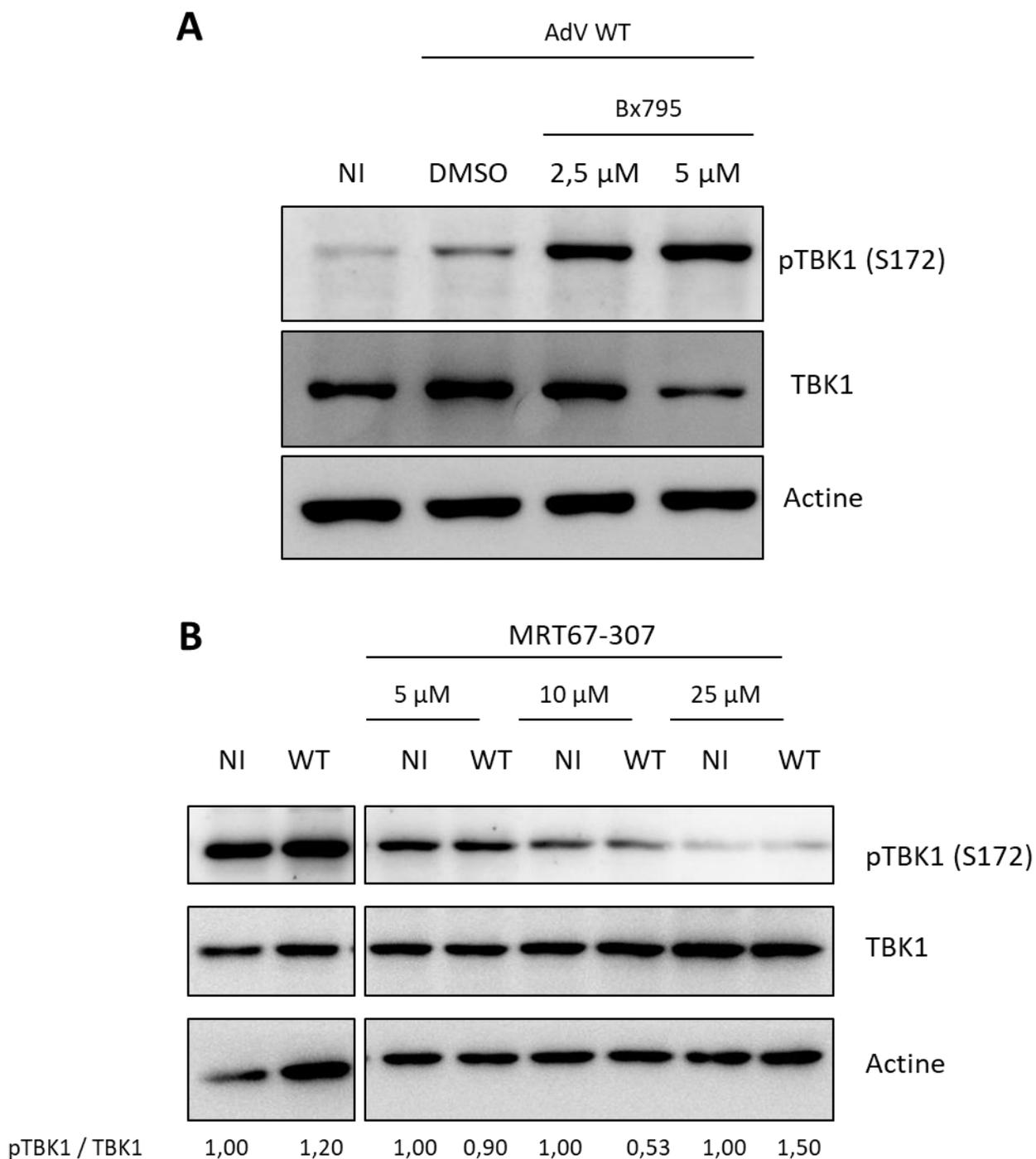
contre TBK1 (colonne bleu clair) (**Figure 55B**). Dans les conditions contrôles, nous retrouvons le défaut d'infectiosité caractéristique du mutant M1, qui est ici 6 fois moins infectieux. Contrairement, à notre hypothèse, lorsque l'expression de TBK1 est réduite (si TBK1), le mutant M1 présente toujours ce défaut d'infectiosité et ce quelque soit l'efficacité de la déplétion. La déplétion de TBK1 restant partielle, une analyse complémentaire a été effectuée en utilisant une inhibition fonctionnelle de la kinase.

## **B) Effet des inhibiteurs Bx795 et MRT67307**

### *1- Vérification de l'inhibition fonctionnelle de TBK1*

Deux inhibiteurs fonctionnels de TBK1 sont couramment utilisés dans la littérature. Il s'agit de Bx795 (Clark et al., 2009) et de MRT67307 (Yu et al., 2015). Malgré leur utilisation, le mécanisme d'inhibition de ces drogues est controversé. En effet, Bx795 est utilisé comme inhibiteur de la phosphorylation de TBK1. Cependant, plusieurs études rapportent au contraire une augmentation de cette phosphorylation en présence de l'inhibiteur (Clark et al., 2009 ; Hasan et al., 2015).

Afin de déterminer l'effet de Bx795 et de MRT67307 dans nos conditions expérimentales, nous avons analysé le niveau de phosphorylation de TBK1 induit par l'infection en présence ou non de ces inhibiteurs. Des cellules U2OS sont traitées pendant 3 h avec 2 concentrations différentes de Bx795 ou 3 concentrations de MRT67307 puis infectées avec 5 000 pp/c d'AdV WT pendant 30 min. Le DMSO et l'eau servent respectivement de contrôles pour Bx795 et MRT67307, du niveau de phosphorylation de TBK1 induit par l'infection seule (**Figure 56**). L'analyse du western blot met en évidence que la phosphorylation de TBK1 est supérieure dans les conditions traitées avec Bx795 comparé aux conditions contrôles (**Figure 56A**). L'inhibiteur MRT67307 n'a quant à lui pas d'effet clair sur la phosphorylation de TBK1 (**Figure 56B**). Nos données pour Bx795 sont en corrélation avec les résultats publiés, nous ne pouvons donc pas utiliser le niveau de phosphorylation de TBK1 comme marqueur de l'efficacité du traitement.



**Figure 56: Etude de l'effet des inhibiteurs de TBK1 sur sa phosphorylation**

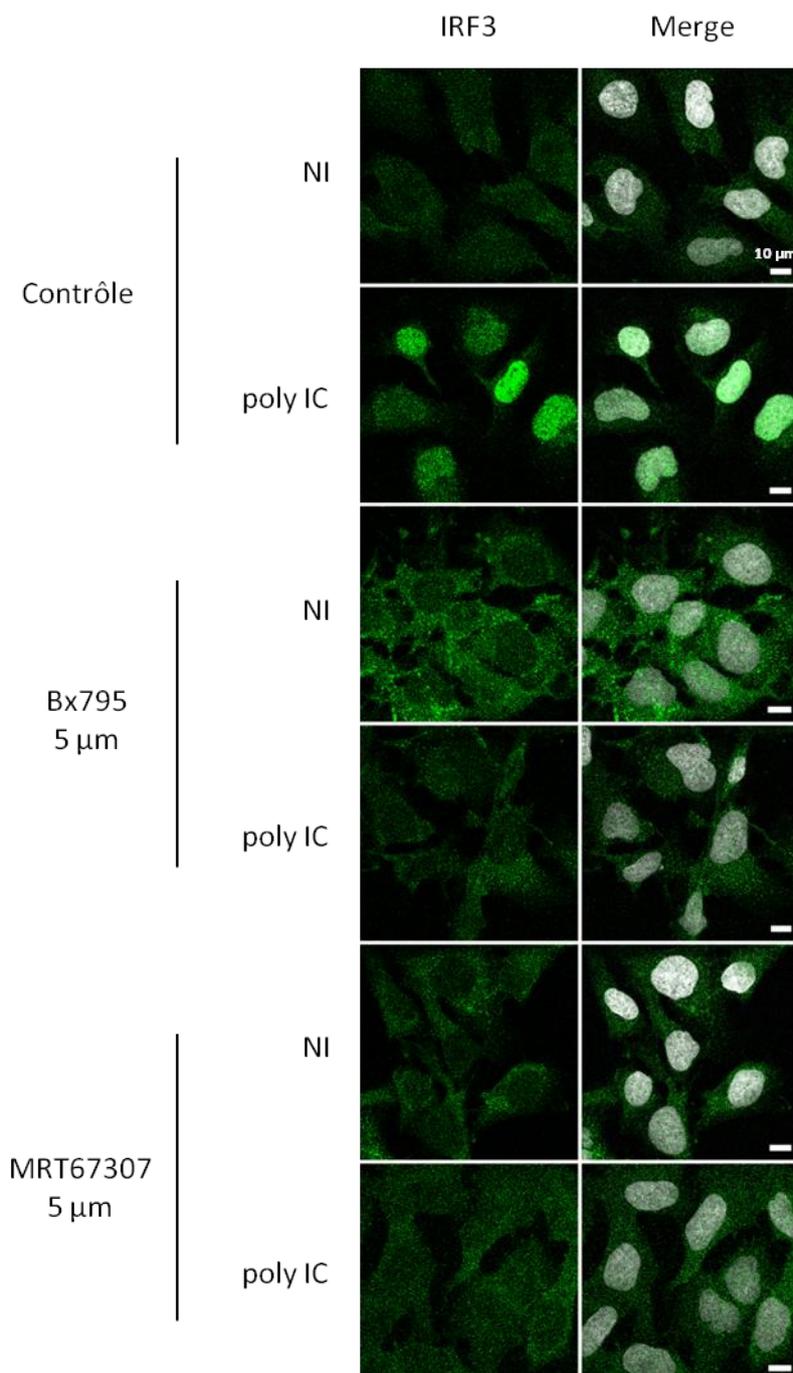
Les cellules U2OS sont prétraitées pendant 3 h avec différentes concentrations de Bx795 (**A**) ou de MRT67307 (**B**) puis sont infectées avec 5 000 pp/c d'AdV WT. Les cellules sont lysées 30 min post-infection puis analysées par western blot pour l'expression de TBK1 sous sa forme phosphorylée (pTBK1) et total (TBK1). L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes pTBK1, TBK1 et actine est mesurée pour MRT67307 et le rapport pTBK1 par TBK1 est calculé.

Pour vérifier l'inhibition fonctionnelle de TBK1 par ces inhibiteurs, nous avons donc testé la translocation nucléaire d'IRF3 suite à son activation par TBK1 en réponse au poly IC. Pour ce faire, une expérience d'immunofluorescence a été réalisée (**Figure 57**). Les cellules U2OS sont prétraitées pendant 3 h avec 5  $\mu$ M de Bx795 ou de MRT67307 et ensuite transfectées ou non avec 2  $\mu$ g/mL de poly IC. Les cellules sont fixées 3 h après la transfection puis l'immunofluorescence est réalisée à l'aide d'anticorps ciblant IRF3 (en vert) et de DAPI pour marquer le noyau. Les images obtenues par microscopie confocale indiquent que le poly IC induit la relocalisation d'IRF3 dans le noyau dans les cellules contrôles (panel du haut). Au contraire, celle-ci est inhibée dans les cellules traitées avec les différents inhibiteurs où IRF3 est détecté seulement dans le cytoplasme même après stimulation par le poly IC. Ces résultats confirment l'inhibition fonctionnelle de TBK1 par ces inhibiteurs qui peuvent donc être utilisés dans nos expériences pour analyser le rôle de TBK1 dans l'activation de l'autophagie. Cependant, ces inhibiteurs ne sont pas spécifiques de TBK1, puisqu'ils limitent également l'activation d'autres kinases telles que AKT et ULK1 (Feldman et al., 2005 ; Petherick et al., 2015 ; Jaishankar et al., 2018). Ainsi, l'effet de ces inhibiteurs sera tout d'abord étudié seul afin d'observer une tendance concernant l'état de l'autophagie suite à l'inhibition fonctionnelle de TBK1. Puis ces données seront reproduites dans des cellules préalablement déplétées pour TBK1 afin de confirmer que l'effet observé est bien dépendant de l'inhibition de TBK1, et non d'un effet aspécifique.

## *2- Effet des inhibiteurs Bx795 et MRT67307 sur l'infectiosité du M1*

Pour tester l'effet de l'inhibition de TBK1 sur l'activation de l'autophagie induite par l'AdV, les cellules U2OS sont prétraitées pendant 3 h avec différentes concentrations de Bx795 (**Figure 58A**) ou de MRT67307 (**Figure 58B**). Les cellules sont infectées avec 50 pp/c des vecteurs WT et M1 exprimant la GFP. Le pourcentage de cellules infectées est déterminé par cytométrie en flux. Deux expériences indépendantes sont réalisées pour chaque inhibiteur et les **figures 58A et 58B** représentent l'infectiosité du virus M1 normalisé par celle du virus WT (obtenu dans les mêmes conditions de traitement) respectivement pour Bx795 et MRT67307.

Pour ce qui est de Bx795, en absence d'inhibiteur, 44 % des cellules sont infectées avec le virus WT, contre 2,6 % avec le virus M1 (données non montrées), soit un virus mutant 17 fois moins infectieux (**Figure 58A**). L'utilisation de Bx795 augmente légèrement l'infectiosité du mutant M1 en fonction de la concentration utilisée.



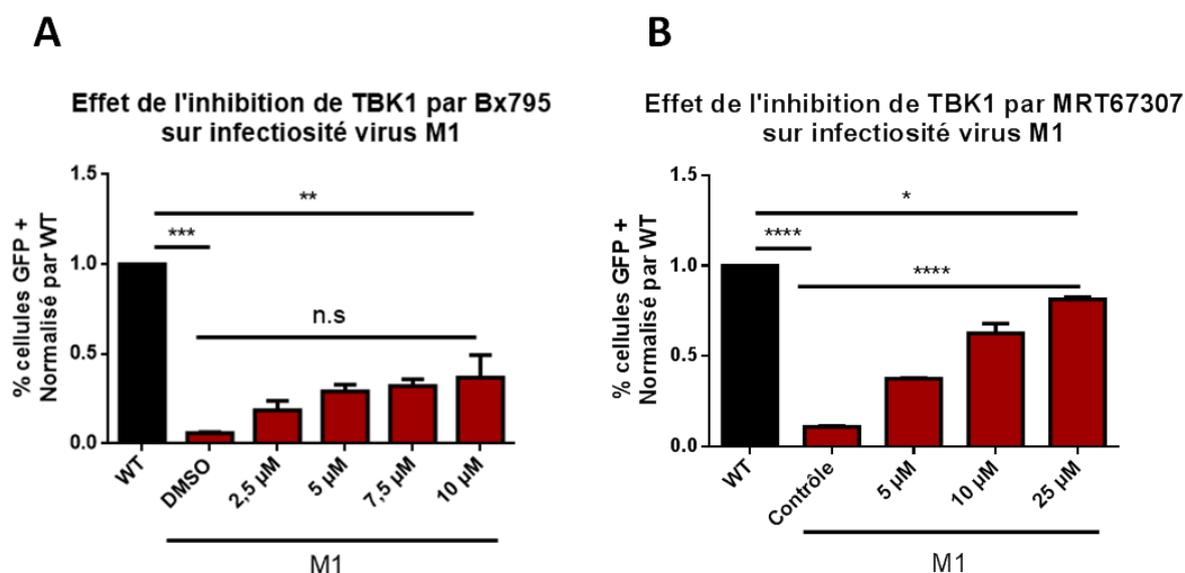
**Figure 57: Etude de la translocation nucléaire d'IRF3 en présence d'inhibiteurs**

Les cellules sont prétraitées pendant 3 h avec du DMSO ou les différents inhibiteurs de TBK1, puis sont transfectées pendant 3 h avec 2 µg/mL de poly IC. Une immunofluorescence est réalisée avec des anticorps ciblant IRF3 (en vert) et le DAPI est utilisé pour marquer le noyau (en gris). Les images sont obtenues par microscopie à fluorescence confocale.

Ainsi, avec la dose la plus faible, 8 % des cellules sont infectées par le virus M1 (41,8 % avec le WT) contre 11,8 % avec la dose la plus élevée (32,6 % avec le WT). Dans cette dernière condition le virus M1 n'est plus que 3 fois moins infectieux que le virus WT. L'infectiosité du virus M1 est donc supérieure en présence de Bx795, alors que celle du WT diminue légèrement. Cependant, les différences observées avec les différentes concentrations de Bx795 ne sont pas significatives. Nous souhaitons donc les confirmer en utilisant l'autre inhibiteur de TBK1.

Avec le MRT67307, l'infectiosité du virus M1 augmente graduellement de façon significative avec le traitement (**Figure 58B**), et celle du WT diminue légèrement de façon non significative (données non montrées). Ainsi, en présence de 25  $\mu\text{M}$  de MRT67307, le mutant M1 n'est plus que 1,5 fois moins infectieux que le WT (contre 10 fois dans les conditions contrôles). Les résultats obtenus avec MRT67307 confirment donc la tendance observée précédemment avec le Bx795.

L'utilisation de ces inhibiteurs fonctionnels de TBK1 semble donc augmenter l'infectiosité du virus M1, qui normalement est dégradé par autophagie. Pour confirmer que cet effet est bien la conséquence de l'inhibition spécifique de TBK1, et non d'un effet des inhibiteurs sur l'autophagie en général, leur utilisation a été couplée à la déplétion de TBK1 par ARN interférence.



**Figure 58 : Etude de l'effet des inhibiteurs de TBK1 sur l'infectiosité du virus M1**

Les cellules U2OS sont prétraitées pendant 3h avec différentes concentrations de Bx795 (**A**) ou de MRT67307 (**B**) puis sont infectées avec 50 pp/c des vecteurs WT ou M1. Le pourcentage de cellules exprimant la GFP est analysé par cytométrie en flux et est normalisé par l'infectiosité du virus WT.

n.s = non significatif, \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ .

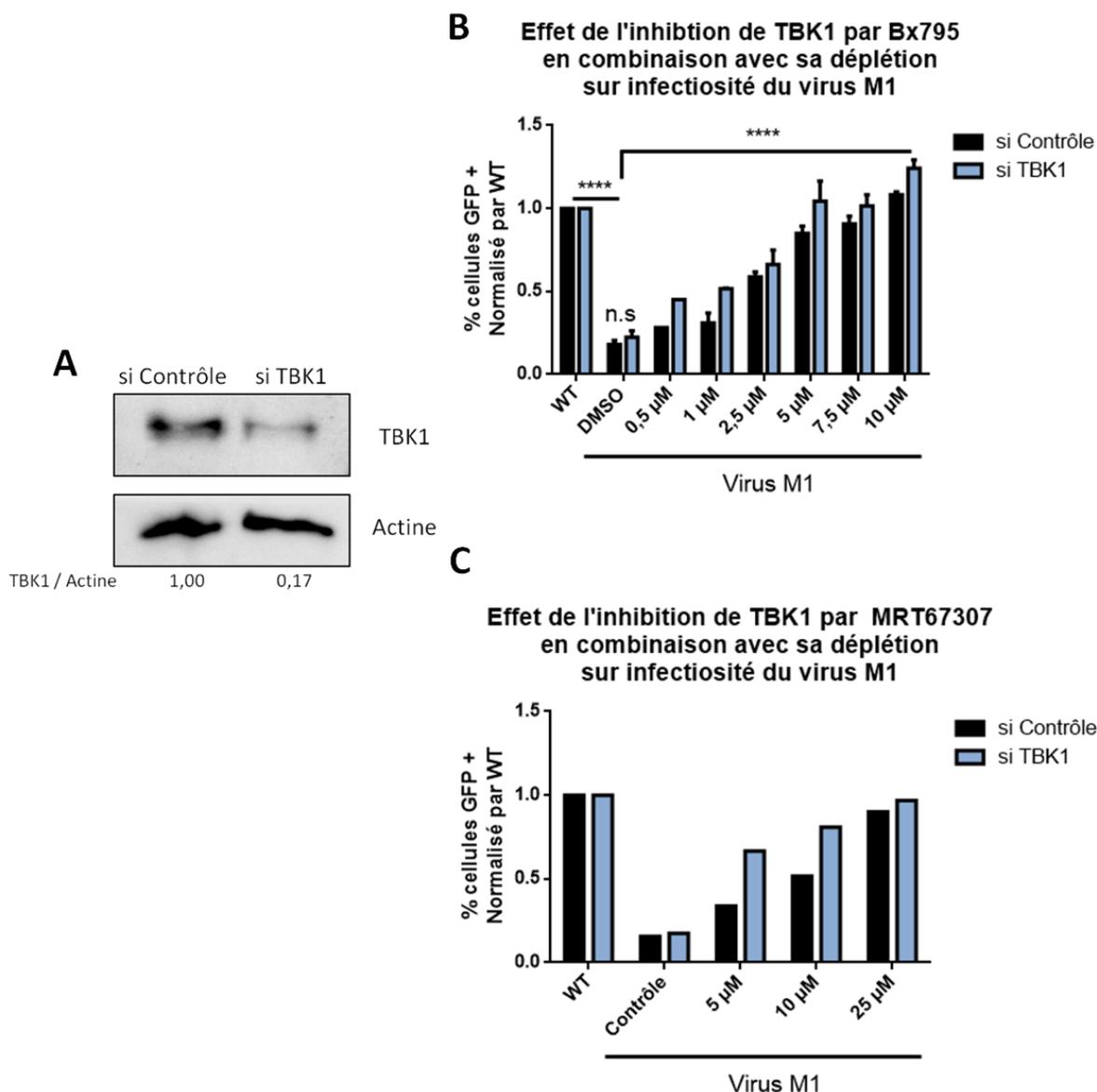
### C) Combinaison de la déplétion partielle et de l'inhibition fonctionnelle de TBK1

Ainsi, pour confirmer l'implication de TBK1, le traitement par l'inhibiteur est combiné avec l'ARN interférence (si TBK1), en supposant que si l'effet inhibiteur est spécifique de TBK1 alors il sera plus efficace dans les cellules où la quantité de TBK1 est diminuée.

Dans cette expérience, les cellules U2OS sont transfectées avec des ARN interférents (si TBK1) et l'expression de TBK1 est vérifiée par western blot, la déplétion restant partielle (**Figure 59A**). Les cellules sont ensuite traitées pendant 3 h avec différentes concentrations de Bx795 (**Figure 59B**) ou de MRT67307 (**Figure 59C**) et sont infectées avec 50 pp/c des vecteurs AdV WT et mutant M1 exprimant la GFP. Les cellules sont analysées par cytométrie en flux, comme précédemment. L'infectiosité du mutant M1 est normalisée par celle du virus WT. Cette expérience est réalisée respectivement 4 et 1 fois pour Bx795 et MRT67307.

Pour Bx795, nous remarquons que pour une même dose d'inhibiteur, l'infectiosité du mutant M1 est plus élevée quand l'expression de TBK1 est limitée (**Figure 59B**). Ainsi à 1  $\mu\text{M}$  10,5 % des cellules contrôles sont infectées par le virus M1 contre 13,6 % des cellules si TBK1. Cet effet se confirme avec toutes les autres concentrations d'inhibiteurs comme par exemple à 10  $\mu\text{M}$  où 30,1 % des cellules contrôles et 35,6 % des cellules si TBK1 sont infectées par le virus M1.

Afin de confirmer ces observations, la même étude est effectuée avec l'inhibiteur MRT67307 (**Figure 59C**). Nous confirmons que la présence de l'inhibiteur augmente l'infectiosité du mutant M1 et que cet effet est plus important lorsque l'expression de TBK1 est réduite. Ainsi, avec un traitement de 5  $\mu\text{M}$  de MRT67307, 13,3 % des cellules contrôles sont infectées par le virus M1 contre 28,8 % des cellules si TBK1. Il serait nécessaire de reproduire cette expérience pour confirmer la tendance observée qui semble indiquer un effet spécifique de TBK1 dans l'infectiosité du M1.



**Figure 59: Etude de l'effet de la combinaison de la déplétion de TBK1 et de son inhibition fonctionnelle**

(A) Les cellules U2OS exprimant des si ARN contrôle ou ciblant TBK1 sont lysées puis l'efficacité de la déplétion est vérifiée par western blot. L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes TBK1 et actine est mesurée et le rapport TBK1 par actine est calculé pour déterminer l'efficacité de la déplétion.

Les cellules contrôles (en noir) ou déplétées pour TBK1 (en bleu clair) sont prétraitées pendant 3 h avec différentes concentrations de Bx795 (B) ou de MRT67307 (C) puis sont infectées avec 50 pp/c des vecteurs WT et M1. Le pourcentage de cellules exprimant la GFP est analysé par cytométrie en flux et est normalisé par l'infectiosité du virus WT.

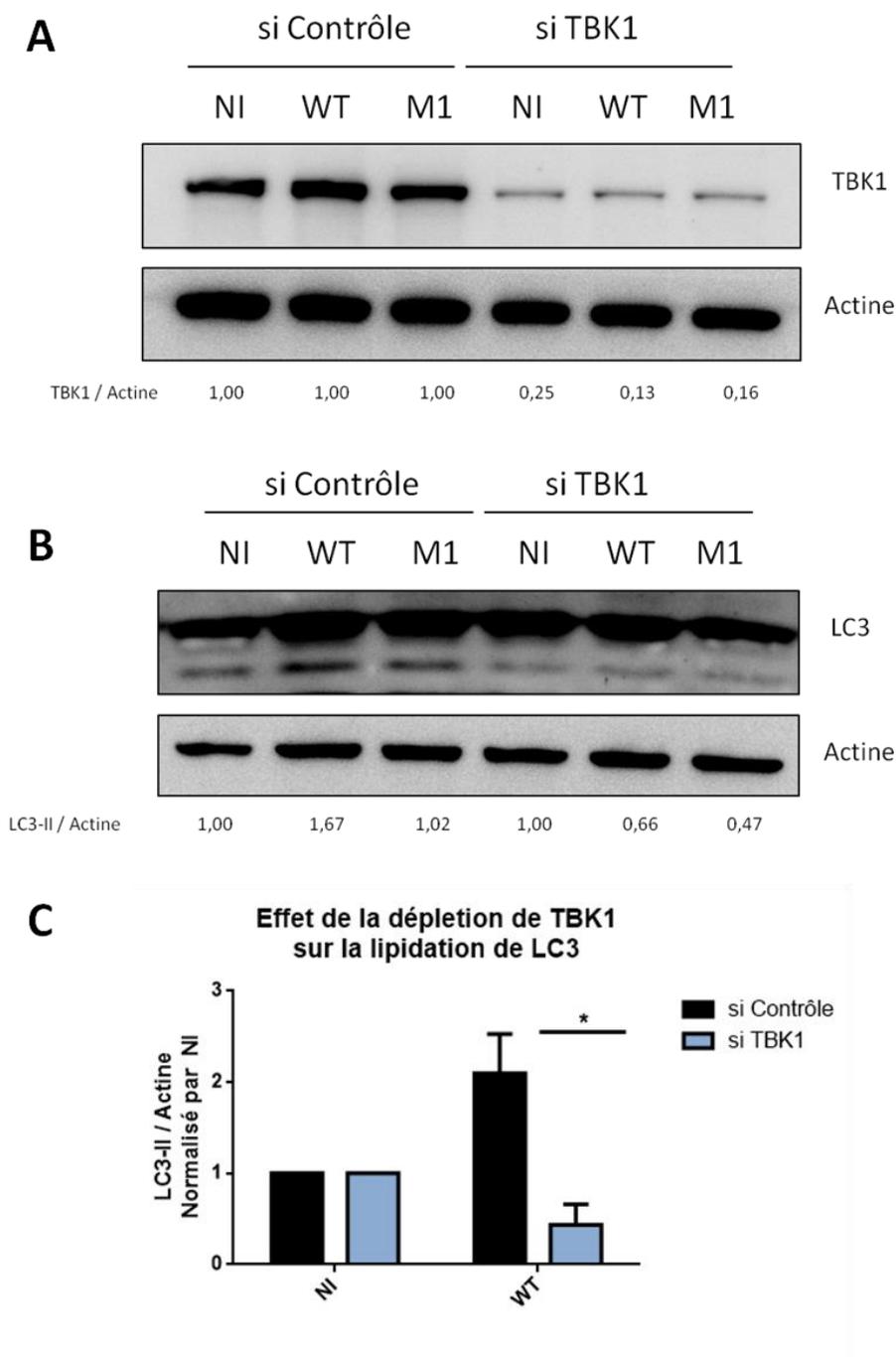
n.s = non significatif, \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ .

Ces données, de façon générale, confirment que TBK1 est impliqué dans l'autophagie qui dégrade le mutant M1.

## II- Effet de TBK1 sur l'activation de l'autophagie

Afin de confirmer l'implication de TBK1 dans l'autophagie induite par le virus, l'état de lipodation de LC3 est suivi comme marqueur du niveau d'activation de l'autophagie (Klionsky et al., 2016). LC3 est présent dans le cytoplasme et est lipidé par un complexe protéique de l'autophagie une fois celle-ci activée. La forme lipidée de LC3 est alors incorporée dans la membrane des autophagosomes et en favorise l'élongation (voir chapitre 2 de l'introduction). Cette forme lipidée de LC3 est nommée LC3-II, par opposition à la forme non lipidée LC3-I. Il est possible de visualiser cette lipodation de LC3 par western blot car elle induit un changement de poids moléculaire de la protéine : LC3-I à 18 kDa et LC3-II à 15 kDa.

Afin d'étudier l'implication de TBK1 dans la lipodation de LC3, son expression est réduite par ARN interférence (si TBK1). Un western blot est effectué, afin de mesurer l'efficacité de la déplétion de TBK1, qui reste partielle (**Figure 60A**). Les cellules sont infectées avec 5 000 pp/c d'AdV WT ou du mutant M1, puis lysées 1 h 30 après l'infection. La lipodation de LC3 est analysée par western blot, comme détaillé précédemment. L'actine sert de contrôle de charge. Le rapport LC3-II/actine, normalisé par la condition non infectée, permet d'étudier le niveau de lipodation de LC3 (**Figure 60B**). Deux expériences indépendantes sont réalisées avec le virus WT et regroupées dans un graphique représentant le rapport LC3-II/actine normalisé par la condition non infectée (**Figure 60C**). L'analyse de ces données confirme que LC3 est lipidée lors de l'infection par l'AdV (colonnes noires), mais que la déplétion partielle de TBK1 (colonnes bleu clair) diminue significativement la lipodation de LC3. Nos résultats confirment le rôle de TBK1 dans l'activation de l'autophagie induite par l'AdV, tout du moins jusqu'à l'étape d'élongation de l'autophagosome.



**Figure 60: Etude de l'effet de la déplétion de TBK1 sur la lipídation de LC3**

(A) Les cellules U2OS exprimant des si ARN contrôle ou ciblant TBK1 sont lysées puis l'efficacité de la déplétion est vérifiée par western blot. L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes TBK1 et de l'actine est mesurée et le calcul du rapport TBK1 par l'actine permet de déterminer l'efficacité de la déplétion. (B) Ces cellules sont infectées 1 h 30 avec 5 000 pp/c de virus WT ou du mutant M1 puis lysées et analysées par western blot pour l'expression de LC3 sous sa forme lipidée (LC3-II) et total (LC3-I). L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes LC3-II et de l'actine est mesurée et le calcul du rapport LC3-II/actine permet de déterminer le niveau de lipídation de LC3. (C) L'expérience est réalisée en duplicat et le rapport LC3-II/actine normalisé par la condition non infectée est reporté dans un graphique pour les cellules contrôles (en noir) ou déplétées pour TBK1 (en bleu clair). Le graphique présente la moyenne de ces valeurs et les barres d'erreur correspondent à l'écart à la moyenne (SEM).

\* = P<0,05.

### III- Conclusion générale du chapitre

Pour étudier le rôle de TBK1 dans l'activation de l'autophagie, nous avons tout d'abord étudié l'effet de sa déplétion et de son inhibition fonctionnelle sur l'infectiosité du mutant M1, ce dernier étant dégradé par autophagie. Nos résultats démontrent que l'absence de TBK1 fonctionnel permet de restaurer partiellement l'infectiosité du mutant M1. Ces données suggèrent que TBK1 non fonctionnel empêche le mutant d'être dégradé par autophagie et donc probablement que cette kinase est impliquée dans l'autophagie dirigée contre le virus, ce que nous avons confirmé en contrôlant le niveau de lipodation de LC3.

Ces données, ainsi que nos données précédentes, confirment donc le rôle de TBK1 dans l'activation de l'autophagie dirigée contre l'AdV. TBK1 est recruté aux sites de dommage membranaire par Gal8 afin d'activer l'autophagie induisant la dégradation du mutant M1. Le virus WT quant à lui parvient à contrôler l'activation et le recrutement de TBK1, ce qui pourrait être un des mécanismes par lequel il inhibe sa dégradation par autophagie.

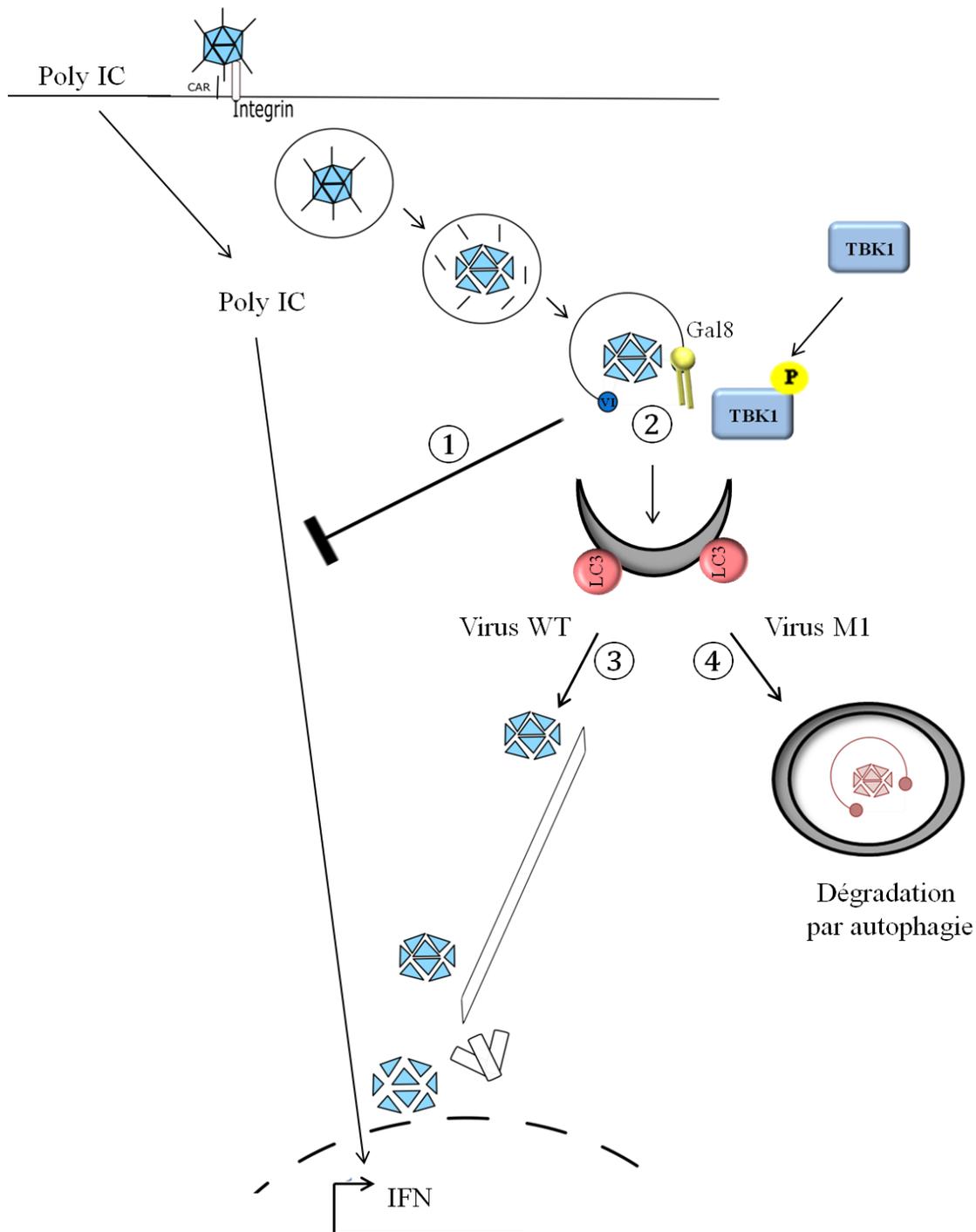
L'ensemble de ces résultats démontre le rôle de TBK1 dans l'activation de l'autophagie induite par l'AdV, qui, selon nos données, semble différente de celle induite par les Salmonelles.

## Conclusion générale

L'objectif de ces travaux était de définir l'impact des dommages membranaires dans l'activation de la réponse antivirale dirigée contre l'AdV et ce, dès son entrée dans la cellule hôte. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'activation de l'IFN $\beta$  et de l'autophagie. Un schéma résumant nos résultats est présenté dans la **figure 61**.

Dans cette étude, nous avons montré que, quelque soit les conditions expérimentales testées, l'AdV n'induit pas l'expression d'IFN $\beta$  dans les cellules humaines non immunitaires. Au contraire, nos résultats indiquent que le virus parvient à limiter l'expression d'IFN $\beta$  induite par le poly IC, et que ceci dépend des ruptures membranaires induites par le virus (**Figure 61, ①**). Nous avons également montré que TBK1 est activé par ces dommages membranaires et que cette kinase est recrutée au niveau des sites de rupture de l'endosome induits par le virus. Nous avons démontré que ce processus est dépendant de Gal8, qui est également recruté au niveau de ces sites (**Figure 61, ②**). Nos expériences ont aussi montré que l'AdV WT limite cette activation de TBK1, mais pas le mutant M1 qui est dégradé par autophagie (**Figure 61, ③ et ④**). L'ensemble de ces données suggère que cette kinase est impliquée dans l'activation de l'autophagie dirigée contre le virus.

La déplétion des adaptateurs NDP52, p62 et Tax1BP1 ne restaure pas l'infectiosité du mutant M1, suggérant qu'ils ne sont pas impliqués dans la dégradation du virus par autophagie. En revanche, l'inhibition fonctionnelle de TBK1 restaure partiellement l'infectiosité du mutant M1. Nos résultats montrent également que cette kinase est impliquée dans la lipidation de LC3 en réponse à l'infection. Ainsi, ces travaux ont permis d'identifier TBK1 comme un nouveau facteur impliqué dans l'activation de l'autophagie en réponse aux dommages membranaires induits par l'AdV.



**Figure 61: Rôle des ruptures membranaires dans l'activation de la réponse anti-adenovirale**

L'AdV pénètre dans la cellule par endocytose et s'échappe de l'endosome en induisant la rupture de la membrane par la protéine VI. L'AdV inhibe l'expression de l'IFN $\beta$  induite par le poly IC. Cet effet nécessite l'étape de la rupture membranaire induite par le virus ①.

Ces dommages induisent également le recrutement de Gal8 qui permet la phosphorylation et le recrutement de TBK1 aux sites de dommage membranaire ②.

Le virus WT parvient à limiter cette activation au cours du temps et poursuit son entrée.③. Le virus M1 limite moins efficacement l'activation de TBK1 et est dégradé par autophagie ④.

## **DISCUSSION**



## CHAPITRE 1

### L'Adénovirus limite l'expression d'interféron $\beta$

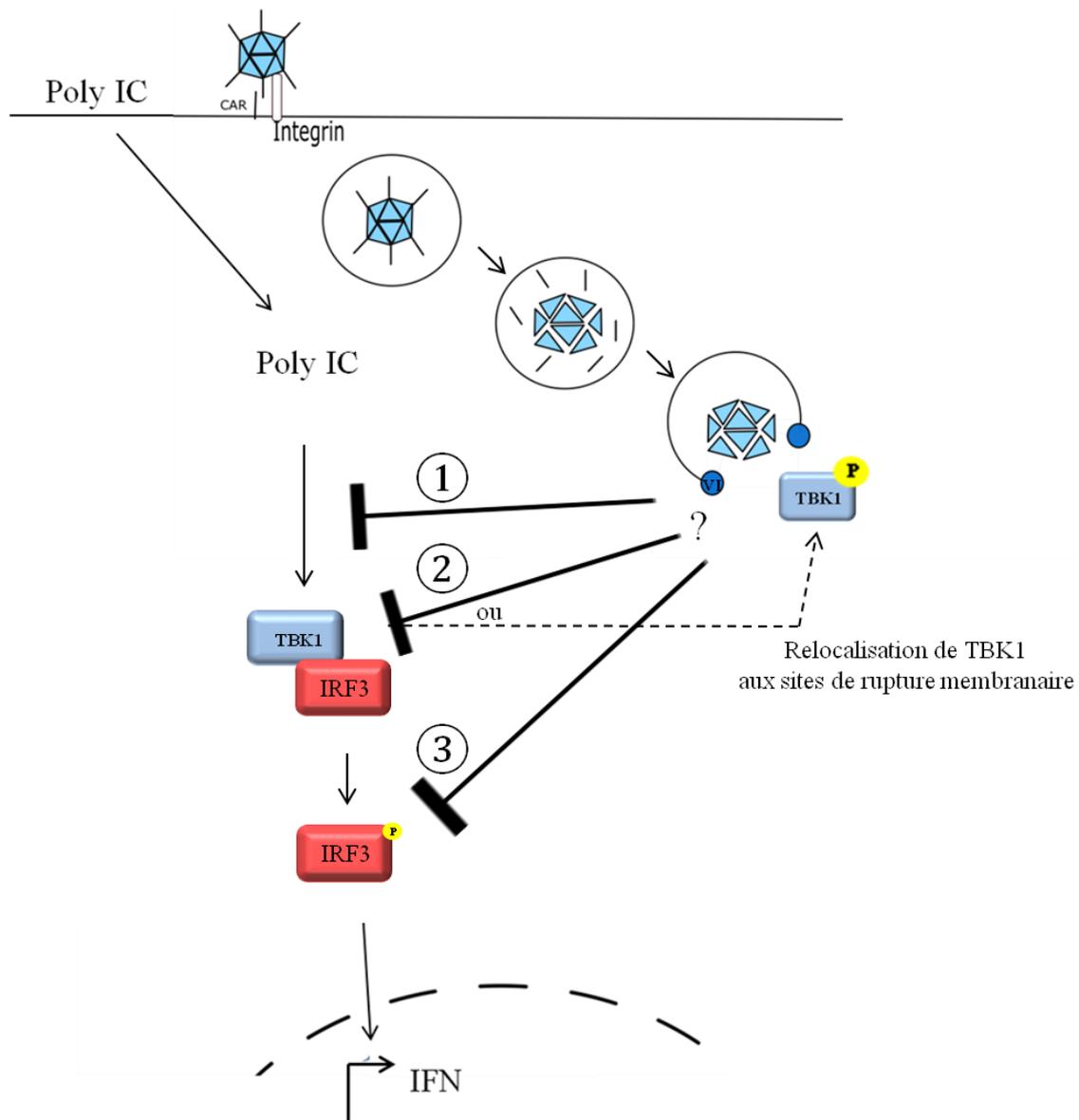
Nos résultats démontrent que l'AdV n'induit pas l'activation d'IFN $\beta$  mais qu'au contraire il inhibe la réponse IFN $\beta$  induite par le poly IC.

#### I- Conditions d'infection et impact sur la réponse IFN $\beta$

Nos résultats diffèrent avec la plupart des publications qui montrent que l'AdV active la réponse IFN $\beta$ . Ces études sont en général effectuées dans des cellules immunitaires murines (ou des souris) infectées avec de fortes doses de virus à des temps d'infection relativement longs, environ 4 h à 24 h post infection (voir Introduction). Ceci explique probablement la différence avec nos résultats.

En effet, nous souhaitons étudier la réponse cellulaire induite lors de l'entrée du virus et pour cela nous avons choisi des temps d'infection courts (3 h post-infection maximum) et avons analysé l'expression d'IFN $\beta$  dans des cellules humaines non immunitaires qui sont la cible primaire de l'infection. Pour étudier l'effet spécifique de l'entrée du virus, nous avons aussi homogénéisé l'infection en effectuant des infections quasi synchronisées, en éliminant les virus libres 30 min après l'infection.

Dans nos conditions expérimentales, comme dans les publications sur ce sujet, la réponse IFN $\beta$  analysée correspond à une réponse globale de l'ensemble d'une population cellulaire. Sachant que le nombre de virus internalisé et la cinétique d'infection varient d'une cellule à l'autre, il serait intéressant d'examiner la réponse cellulaire individuelle à l'infection. Grâce au développement de nouvelles technologies, ce type d'étude est désormais possible. Ainsi, nous envisageons, grâce à des sondes spécifiques, de détecter *in situ* l'expression de l'ARNm de l'IFN $\beta$  en utilisant la technique du RNAscope. En parallèle, l'utilisation d'un virus marqué avec un fluorochrome permettra de normaliser la réponse observée avec l'efficacité de l'infection. Nous pourrions ainsi déterminer, l'impact de l'infection cellule par cellule.



**Figure 62: Mécanisme d'inhibition de la réponse IFN $\beta$  par l'AdV**

L'AdV limite l'activation de la réponse IFN $\beta$  induite par le poly IC par un mécanisme qui nécessite l'étape de rupture membranaire.

- ① Cette inhibition peut se faire par des protéines virales qui ciblent des facteurs en amont de l'activation de TBK1.
- ② TBK1 peut être la cible directe de cette inhibition, et sa relocalisation aux sites de rupture membranaire pourrait entrer en compétition avec sa fonction dans la réponse IFN $\beta$ .
- ③ Le facteur de transcription IRF3 pourrait être la cible de cette inhibition.

Dans cette étude, nous avons utilisé le mutant dIX, délété de la protéine ciment IX. Ce mutant n'induit pas non plus la réponse IFN $\beta$ , mais en plus il limite moins efficacement l'expression induite par le poly IC que le virus WT. Le dIX est caractérisé par la détection, dans le cytoplasme, de la protéine VII normalement associée au génome viral (Thèse Irene Carlon-Andrès), ce qui suggère que, pour ce mutant, l'ADN viral est anormalement exposé dans le cytoplasme. Il faudrait donc dans un premier temps confirmer que l'ADN viral est bien exposé dans le cytoplasme. Il serait également intéressant de savoir si l'ADN est piégé dans des endosomes ou lysosomes. Nous pourrions étudier, par immunofluorescence, si la protéine VII colocalise avec EEA1 ou LAMP2A marquant respectivement les endosomes précoces et les lysosomes.

## II- Mécanisme d'inhibition de la réponse IFN $\beta$

Nos résultats montrent que l'AdV limite la réponse IFN $\beta$  induite par le poly IC de façon dépendante de l'étape de rupture membranaire, nous proposons donc des hypothèses et études complémentaires pour identifier le mécanisme de cette inhibition (**Figure 62**).

Afin de déterminer l'impact de l'entrée du virus sur la réponse IFN $\beta$ , nous avons choisi d'utiliser un virus non répliquatif. En effet, l'AdV exprime des protéines immunomodulatrices qui limitent l'activation de la réponse IFN $\beta$  au cours de son cycle viral (voir Introduction). Dans nos conditions expérimentales, ces protéines ne sont pas exprimées et seul l'effet de l'entrée du virus, et donc la réponse induite par la capsid, est observée. L'effet inhibiteur de la réponse IFN $\beta$  dans nos conditions expérimentales, semble donc impliquer des protéines de structure du virus, déjà présentes et disponibles dès son entrée dans la cellule hôte.

Dans la littérature, de nombreux exemples de virus qui interfèrent avec l'activation de l'immunité innée sont connus (voir Introduction). Quelques études ont ainsi décrit l'implication de protéines de structure dans ces mécanismes de contremesures virales. Par exemple la protéine ICP0, qui serait présente dans le tégment de HSV-1 (Delboy et al., 2010), inhibe la translocation de p65 en interagissant avec son domaine RHD (Zhang et al., 2013). L'EBV présente également dans son tégment la protéine BPLF1 qui est une déubiquitineuse inhibant l'activation de TRAF6 et donc les signaux en aval. Cependant, le rôle de BPLF1 ici dépendrait de son expression *de novo* (Saito et al., 2013). D'autres protéines virales sont impliquées dans l'inhibition des signaux en amont des facteurs de transcription,

comme ICP34.5 du HSV-1 et ORF45 du KSHV qui inhibent TBK1 (Christensen and Paludan, 2017).

Afin de déterminer la cible potentielle de l'inhibition de l'IFN $\beta$  par l'AdV, il serait intéressant d'étudier si l'effet inhibiteur du virus est spécifique à l'activation par le poly IC. En effet, la transfection de cet analogue de l'ARN double brin, stimule l'activation des senseurs spécifiques à l'ARN (MDA5, RIG-1...). Nous pourrions étudier l'effet de l'infection sur l'expression d'IFN $\beta$  induite par d'autres stimuli, comme par exemple l'exposition d'ADN cytoplasmique. Ceci nous permettra d'une part d'étudier l'effet de l'AdV sur des voies activées au cours de l'infection, et d'une autre part de mieux comprendre le mécanisme de contremesure mis en place par l'AdV. Si l'AdV parvient à limiter la réponse IFN $\beta$  induite par différentes voies d'activation, alors on peut supposer que le virus cible un facteur commun à ces différentes voies et ainsi élucider le mécanisme de contremesure.

Les différents facteurs conservés entre les voies d'activation sont majoritairement les facteurs de transcription. Nos données préliminaires indiquent que l'AdV pourrait limiter l'activation de NF- $\kappa$ B induite par le TNF $\alpha$ . Il serait donc intéressant de reproduire ces données et d'identifier si l'AdV parvient également à limiter la translocation nucléaire d'IRF3 induite par le poly IC (**Figure 62**). Nous pourrions également étudier l'effet de l'infection sur l'activation des facteurs en amont de NF- $\kappa$ B et IRF3 (TBK1, TRAF...), en étudiant, par western blot, leur état de phosphorylation ou d'ubiquitination.

En effet, nous avons montré que TBK1 est activé au cours de l'infection et que cette activation diminue rapidement avec le virus WT, suggérant que le virus pourrait limiter l'activation de TBK1. De plus, nous avons aussi montré que TBK1 participe à l'activation de l'autophagie induite par l'AdV et que TBK1 favorise l'infectiosité du virus WT. Ceci laisse supposer que le recrutement de TBK1 pour sa fonction dans l'autophagie entre en compétition avec son rôle dans l'activation d'IFN $\beta$ , et que c'est en redirigeant l'activité catalytique de TBK1 que l'infection limite l'activation de l'IFN $\beta$ , ce qui favorise l'infectiosité du virus WT.

## CHAPITRE 2

### Les mécanismes d'activation de TBK1 par l'Adénovirus

TBK1 est activé par les dommages membranaires induits par l'AdV. Nous avons montré que cette activation dépend de Gal8. Cette Gal est nécessaire pour le recrutement et la phosphorylation de TBK1 sur ces sites. Nous avons comparé cette activation de TBK1 avec ce qui est décrit pour les bactéries et étudié le rôle des adaptateurs NDP52, Tax1BP1 et p62. Cependant, aucun de ces adaptateurs n'est nécessaire pour induire la phosphorylation de TBK1 induite par l'AdV. Pour la suite, il serait donc intéressant d'identifier le mécanisme par lequel Gal8 induit l'activation de TBK1 en s'intéressant au mode de recrutement et de phosphorylation de cette kinase.

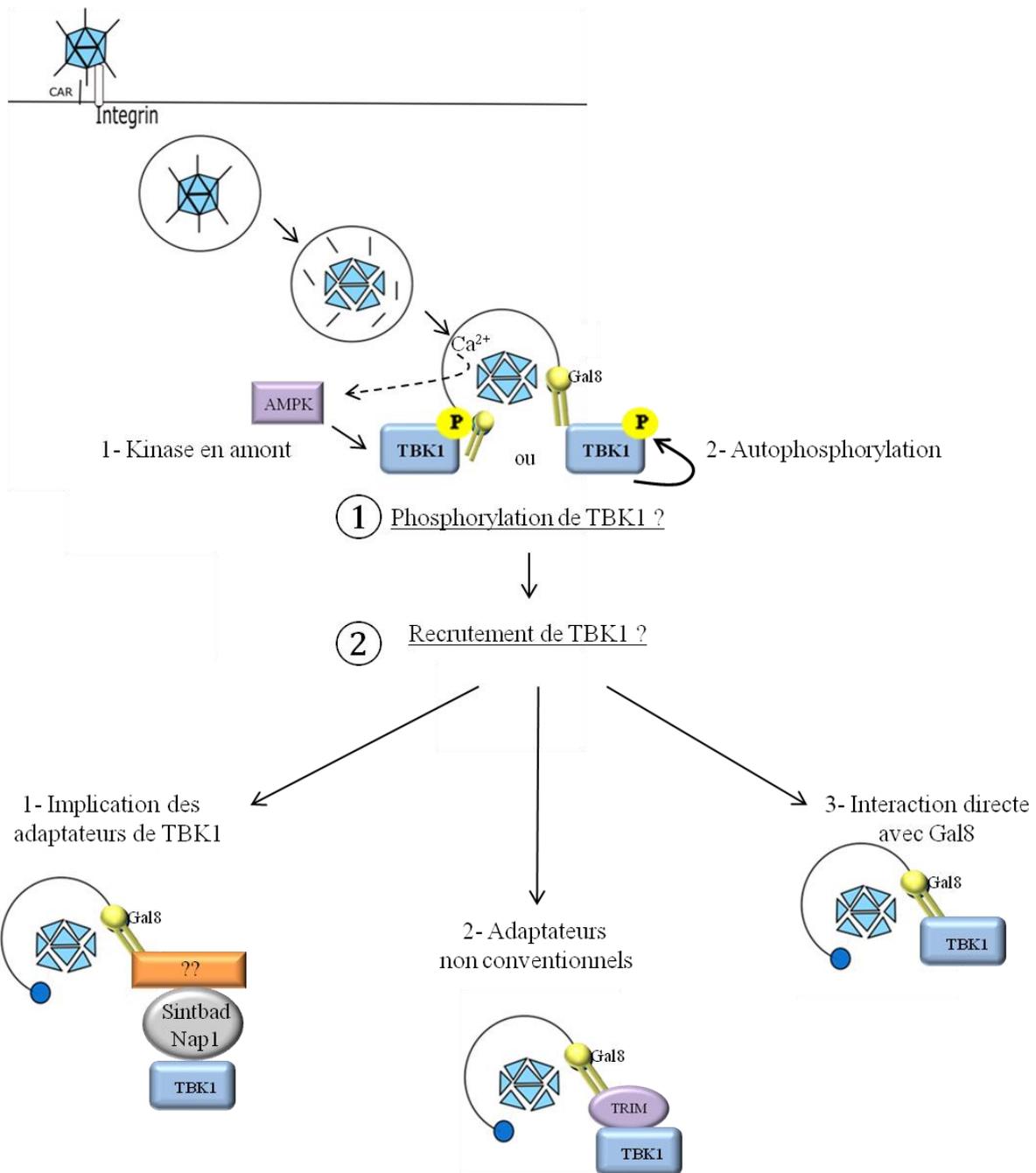
L'ensemble des hypothèses pouvant mener à cette activation est regroupée dans la **figure 63**.

#### I- Recrutement de TBK1

Si l'on se réfère au modèle bactérien, le recrutement de TBK1 au site d'infection par NDP52 se fait de façon indirecte via l'interaction avec les adaptateurs Nap1 et Sintbad. Nous pourrions donc étudier si ces adaptateurs sont nécessaires pour le recrutement et la phosphorylation de TBK1 dans le cas de l'AdV (**Figure 63**).

Puisque nous avons montré que les adaptateurs conventionnels de l'autophagie dirigée contre les bactéries (NDP52, Tax1BP1 et p62) ne sont pas impliqués pour la réponse à l'AdV, nous avons supposé que des adaptateurs non conventionnels pouvaient intervenir. Parmi eux, nous avons supposé que les protéines TRIM seraient de bons candidats car leur rôle dans l'autophagie sélective est de plus en plus décrit (voir Introduction) (**Figure 64**). C'est le cas notamment des TRIM16, TRIM21, TRIM23 et TRIM27.

TRIM16, bien que n'interagissant pas directement avec les Gal est indispensable pour activer l'autophagie en réponse aux dommages de la membrane lysosomale induits par traitement chimique (LLOMe). TRIM16 interagit avec ULK1 et forme un complexe avec Gal3 qui permet de détecter et d'éliminer les dommages membranaires induits artificiellement, mais également ceux induits au cours de l'infection par des agents pathogènes comme *M. tuberculosis* (Chauhan et al., 2016).



**Figure 63: Activation de TBK1 par les dommages membranaires induits par l'AdV**

Les dommages membranaires induits au cours de l'entrée du virus sont reconnus par Gal8 et TBK1.

① La phosphorylation de TBK1 peut être induite :

1- par une kinase en amont, comme AMPK qui pourrait être activée par un influx de calcium venant de l'endosome,

2- par transautophosphorylation suite à sa multimérisation aux sites de dommage membranaire.

② Le recrutement de TBK1 au niveau des sites de rupture membranaire peut :

1- dépendre des adaptateurs Nap1 et Sintbad.

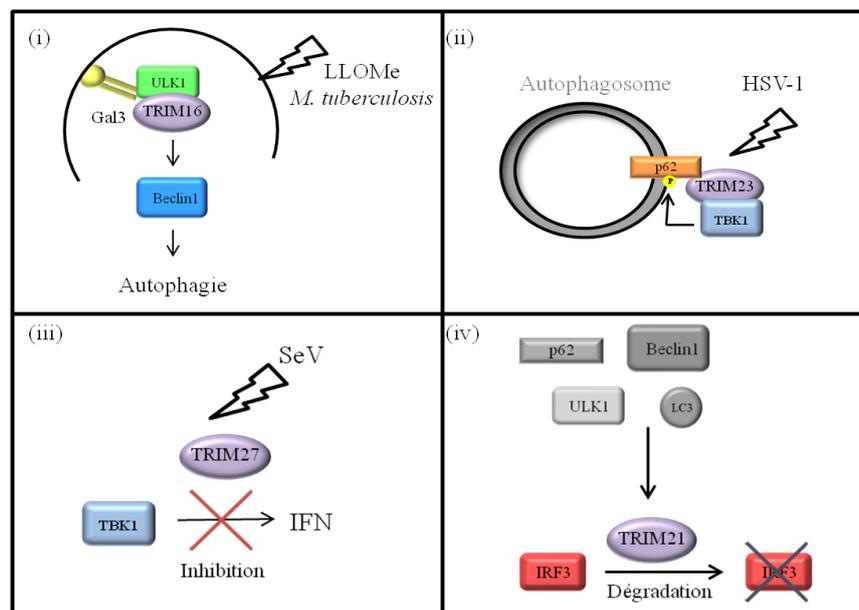
2- être induits par des adaptateurs non conventionnels de l'autophagie (TRIM ?).

3- être dû à une interaction directe avec Gal8.

Quant à TRIM23, il est décrit pour induire la dégradation du HSV-1 par autophagie. En effet, au cours de l'infection par ce virus, TRIM23 est recruté au niveau des autophagosomes où il interagit avec p62 et avec TBK1, ce qui permet son activation par transautophosphorylation. TBK1 induit alors la phosphorylation de p62, ce qui favorise la lipidation de LC3 et l'activation de l'autophagie (Sparrer et al., 2017).

Lors de l'infection par SeV, TRIM27 interagit avec TBK1 et induit son ubiquitination menant à la dégradation de TBK1 (Cai et al., 2018).

Finalement, d'autres TRIM sont impliqués dans une régulation plus générale de l'immunité, comme TRIM21. Cette protéine interagit avec de nombreux facteurs de l'autophagie comme ULK1, Beclin1, p62 et LC3. TRIM21 induit la dégradation par autophagie d'IRF3 sous forme de dimère limitant ainsi la production d'IFN (Kimura et al., 2015).



**Figure 64: Rôle des TRIM dans l'autophagie sélective et de précision**

(i) TRIM16 reconnaît les dommages membranaires en interagissant indirectement avec Gal3, via ULK1, ce qui permet le recrutement de Beclin1 et l'activation de l'autophagie.

(ii) Lors d'une infection par HSV-1, TRIM23 recrute TBK1 et p62. TBK1 s'autophosphoryle pour induire l'activation de p62 et de l'autophagie.

(iii) Lors d'une infection par SeV, TRIM27 régule l'activation d'IFN en induisant l'ubiquitination et la dégradation de TBK1.

(iv) TRIM21 interagit avec de nombreux facteurs de l'autophagie tels que ULK1, Beclin1, p62 ou encore LC3. Il induit la dégradation d'IRF3 par un mécanisme peu connu mais impliquant l'autophagie.

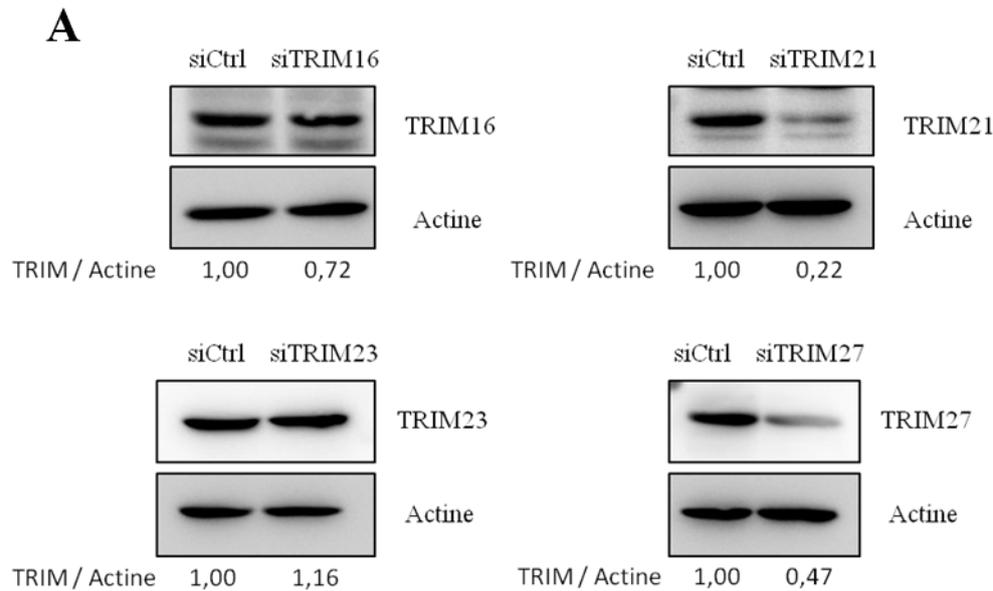
Selon leur rôle, ces TRIM pourraient donc favoriser (TRIM16, TRIM23) ou limiter (TRIM27) l'activation de l'autophagie dirigée contre l'AdV, s'ils sont impliqués. Pour le savoir, dans des expériences préliminaires, nous avons étudié l'infectiosité du mutant M1 dans des cellules où l'expression de ces différents TRIM a été diminuée par ARN interférence (**Figure 65**). La déplétion des TRIM est partielle pour TRIM21 et TRIM27, faible pour TRIM16 et nulle pour TRIM23.

Nos résultats préliminaires indiquent que la déplétion des TRIM16, TRIM21 ou TRIM27 n'impacte pas l'infectiosité du mutant M1, suggérant qu'ils ne sont pas impliqués dans l'activation de l'autophagie dirigée contre l'AdV.

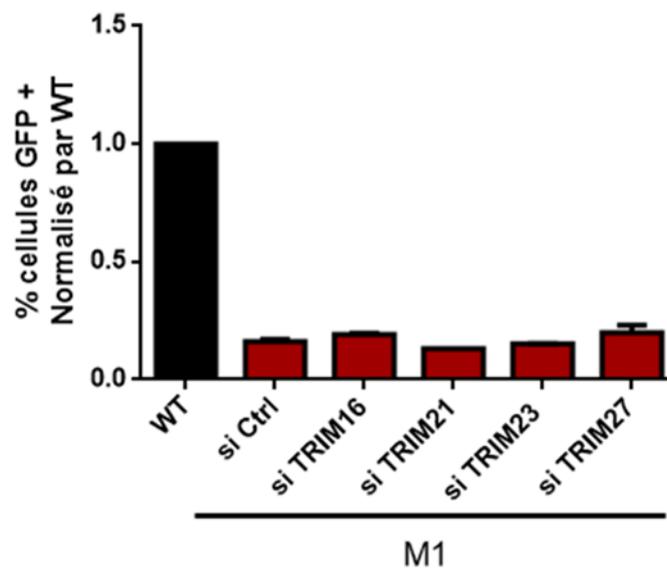
Afin d'étudier le rôle de TRIM23, nous avons suivi sa localisation cellulaire au cours de l'infection par immunofluorescence (**Figure 66**). Nous souhaitons identifier si TRIM23 pourrait jouer le rôle d'adaptateur permettant de recruter TBK1 aux sites de dommage membranaire. Pour cela, nous avons étudié si TRIM23 lui-même est recruté au niveau de ces structures. Les colocalisations entre TRIM23 et la protéine VI ont donc été quantifiées à différents temps post-infection. Nos résultats préliminaires montrent que TRIM23 n'est pas recruté significativement aux sites de dommage membranaire induits par le virus. Il semble donc peu probable que TRIM23 soit impliqué dans le recrutement de TBK1.

Avec ces premières données, nous pouvons suggérer que les TRIM étudiés ne sont pas impliqués dans l'activation de l'autophagie dirigée contre l'AdV.

Finalement nous ne pouvons pas exclure que TBK1 interagisse directement avec Gal8 (**Figure 63**). Des études de co-immunoprécipitations avec des protéines purifiées permettraient de distinguer la capacité de ces 2 protéines à interagir.

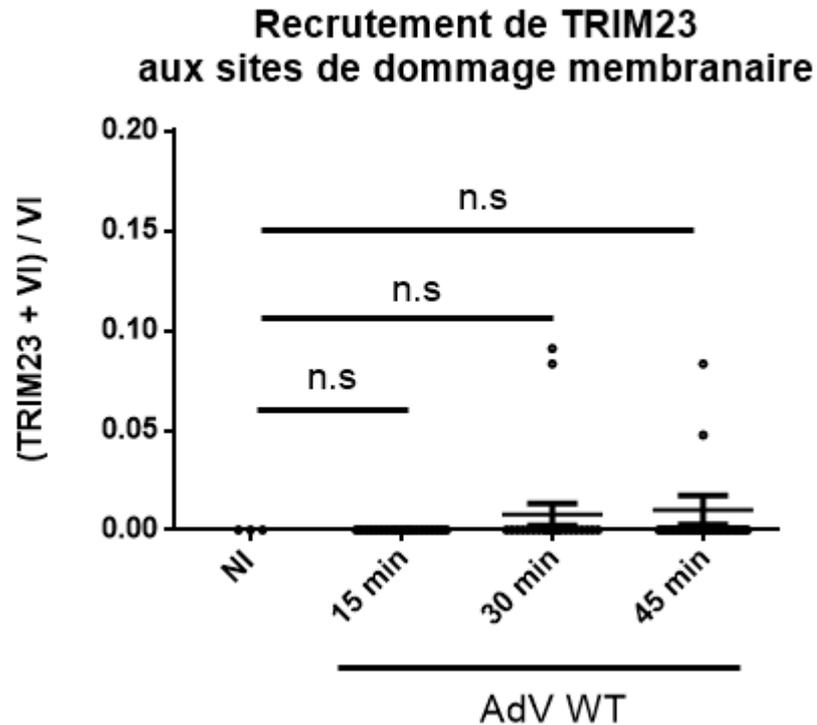


**B** **Effet de la déplétion de TRIM sur l'infectiosité du virus M1**



**Figure 65: Etude de l'implication des TRIM dans l'autophagie dirigée contre l'AdV**

(A) Les cellules sont traitées avec des si ARN dirigés contre TRIM16, 21, 23, 27 puis lysées afin d'analyser par western blot l'expression de ces TRIM. L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes est mesurée et le rapport TRIM / Actine est calculé pour déterminer l'efficacité de la déplétion. (B) Les cellules U2OS déplétées pour les TRIM sont infectées avec 50 pp/c des vecteurs WT ou M1. Le lendemain, le pourcentage de cellules infectées est analysé par cytométrie en flux. L'infectiosité du virus M1 est normalisée par celle du WT dans les mêmes conditions.



**Figure 66: Etude du recrutement de TRIM23 aux sites de dommage membranaire**

Les cellules U2OS sont infectées avec 5 000 pp/c d'AdV WT puis fixées à différents temps post-infection. Une immunofluorescence est réalisée avec des anticorps ciblant la protéine VI, TRIM23 et l'hexon. Les images obtenues par microscopie confocale, sont analysées avec le logiciel Image J et les colocalisations entre la protéine VI et TRIM23 sont quantifiées. Elles sont ensuite normalisées par le nombre de protéines VI détectées pour déterminer le pourcentage d'endosomes rompus positifs pour TRIM23. Le graphique représente ce rapport à différents temps post-infection. n.s = non significatif.

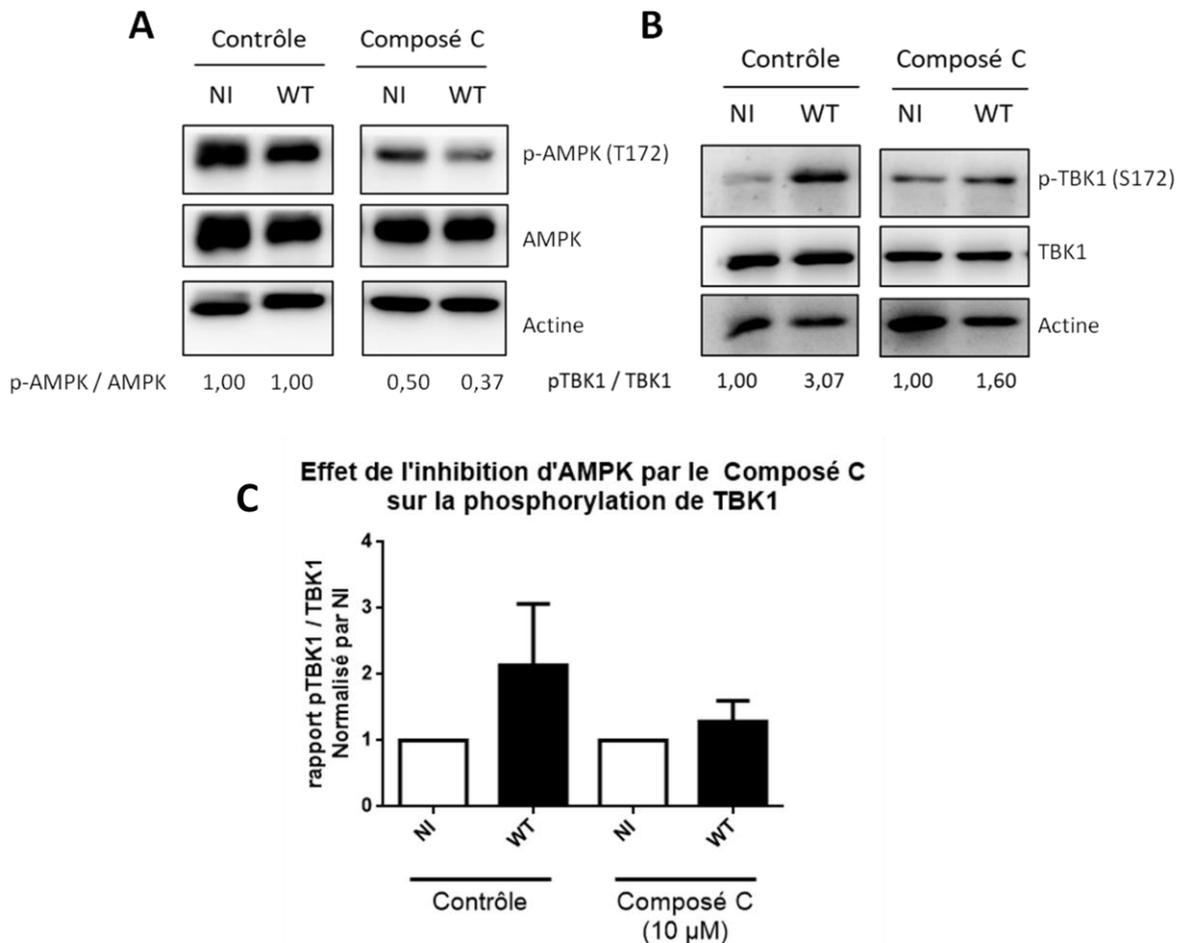
## II- Phosphorylation de TBK1

Plusieurs études suggèrent que TBK1 est activé via son recrutement par transautophosphorylation (Ma et al., 2012). Ainsi l'interaction, directe ou non, avec Gal8 permettrait une régulation spatio-temporelle de l'activation de TBK1 aux sites de dommage membranaire induits par l'AdV (**Figure 63**). Cependant, d'autres kinases sont également décrites pour induire l'activation de TBK1, parmi elles AMPK (Zhao et al., 2018). Cette kinase est activée par un influx de calcium et cette activation induit l'autophagie (Bootman et al., 2018). Or, l'équipe de Urs Greber a montré que la rupture de membrane induite par l'AdV induit un influx de calcium (Luisoni et al., 2015). Il serait donc intéressant d'étudier si ce signal est nécessaire à l'activation d'AMPK.

Pour savoir si AMPK est impliqué dans la phosphorylation de TBK1, nous avons analysé l'effet du Composé C, un inhibiteur fonctionnel d'AMPK, sur le niveau de phosphorylation de TBK1 (**Figure 67**). Dans un premier temps l'effet de cet inhibiteur sur le niveau d'activation d'AMPK a été étudié en suivant sa phosphorylation par western blot. Nos données confirment que le composé C induit une inhibition d'AMPK.

L'effet du composé C sur la phosphorylation de TBK1 a donc été suivi. Les cellules U2OS ont été prétraitées pendant 3 h avec le composé C puis infectées 30 min avec 5 000 pp/c d'AdV WT. L'expérience est réalisée en duplicat et le niveau de phosphorylation est suivi par western blot afin de calculer le rapport pTBK1/TBK1, normalisé par la condition non infectée. La moyenne de ces rapports est présentée dans le graphique. Ces données, encore préliminaires, indiquent que la présence du composé C diminue la phosphorylation de TBK1, suggérant que la kinase AMPK pourrait être impliquée dans l'activation de TBK1.

Il serait intéressant de confirmer ces données et d'examiner si AMPK est effectivement recruté aux sites de dommage membranaire induits par l'AdV, sites où la kinase pourrait alors activer TBK1.



### Figure 67: Etude de l'effet de l'inhibition d'AMPK sur la phosphorylation de TBK1

(A) Les cellules U2OS sont prétraitées ou non pendant 3 h avec 10  $\mu$ M de Composé C puis infectées avec 5 000 pp/c de virus WT. Les cellules sont lysées puis analysées par western blot pour l'expression d'AMPK sous les formes phosphorylée et totale. L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes est mesurée. Le rapport pAMPK / AMPK permet de mesurer le niveau de phosphorylation d'AMPK. (B) Les cellules U2OS sont prétraitées ou non pendant 3 h avec 10  $\mu$ M de Composé C puis infectées avec 5 000 pp/c de virus WT. Les cellules sont lysées puis analysées par western blot pour l'expression de TBK1 sous les formes phosphorylée et totale. L'actine sert de contrôle de charge. L'intensité des bandes est mesurée. Le rapport pTBK1/ TBK1 permet de définir le niveau de phosphorylation de TBK1. (C) L'expérience est réalisée en duplicat et le rapport pTBK1/TBK1 normalisé par la condition non infectée est reporté dans le graphique pour les cellules contrôles ou traitées avec le Composé C.

### III- Régulation de l'activation de TBK1 et rôle de l'autophagie

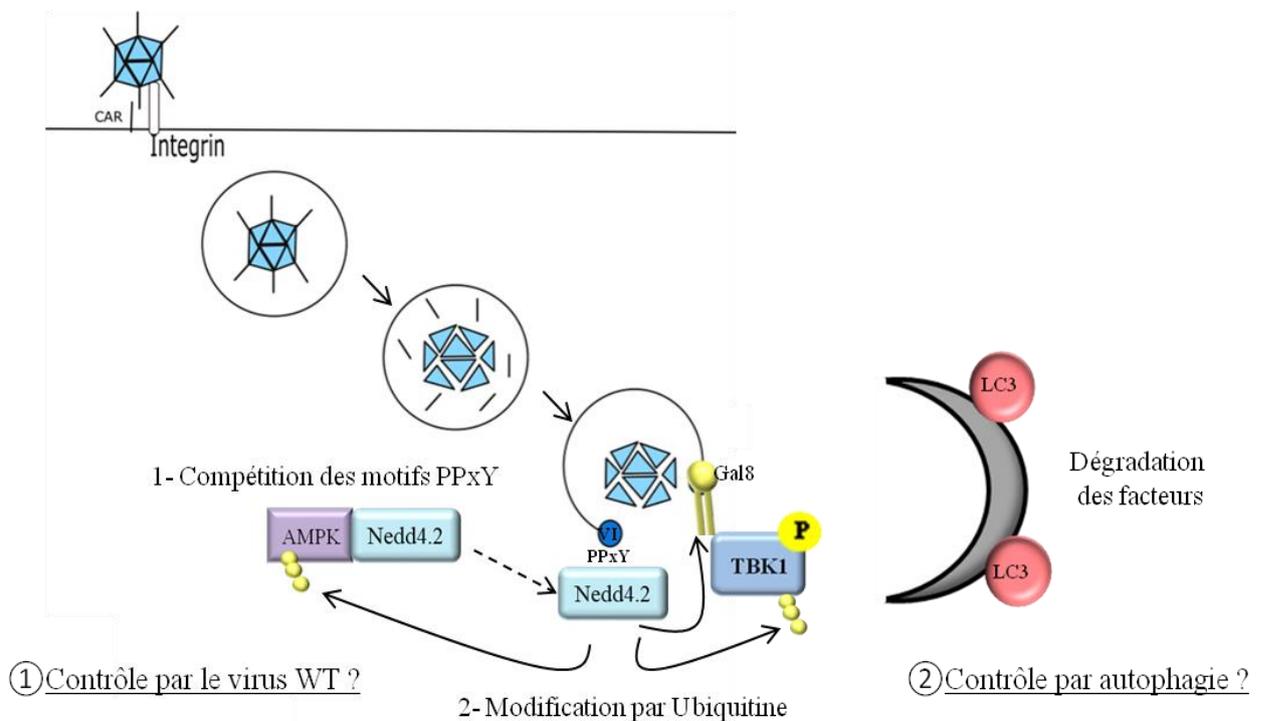
Nous avons constaté une différence d'activation de TBK1 au cours du temps entre le virus WT et le virus M1, suggérant que la capacité du virus à contrôler l'autophagie est liée à sa capacité à limiter le recrutement et la phosphorylation de TBK1. Différentes hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce mécanisme. En effet, il peut s'agir d'un mécanisme direct où le virus va, grâce à ses protéines de structure interférer avec le recrutement et la phosphorylation de TBK1, mais cela peut également être un mécanisme indirect où TBK1 est dégradé par l'autophagie dirigée contre la membrane rompue. Nos observations supportent l'une et l'autre de ces hypothèses (**Figure 68**).

En effet, le virus WT pourrait agir directement sur TBK1 car lors de l'infection, le recrutement de TBK1 aux sites de dommage membranaire et sa phosphorylation sont limités, par rapport au virus M1. Ceci suggère que le virus WT peut interférer avec son activation. Nous pouvons supposer que le virus pourrait induire la relocalisation de TBK1 hors des endosomes rompus ou pourrait limiter son activation en interférant avec des facteurs essentiels à cette dernière (Gal 8 ? AMPK ?).

La différence entre le virus WT et le virus M1 réside dans sa protéine de structure VI. En effet, cette dernière présente un motif PPxY permettant l'interaction avec l'ubiquitine ligase cellulaire Nedd4.2. Au contraire, chez le M1 ce motif PPxY est muté en PGAA et la protéine VI ne peut plus interagir avec Nedd4.2. Cette ubiquitine ligase pourrait ainsi jouer un rôle essentiel dans la régulation de TBK1. On peut supposer que Nedd4.2, une fois recruté par la protéine VI sauvage, pourrait induire l'ubiquitination et éventuellement la dégradation de facteurs de l'autophagie (TBK1 ? AMPK ? Gal8 ?...) (**Figure 68**).

Nous pouvons également supposer que la protéine VI en séquestrant Nedd4.2 pourrait empêcher sa liaison avec un substrat naturel. En effet, certains facteurs de l'autophagie comme AMPK présentent un motif PPxY et pourraient donc interagir avec Nedd4.2. Si AMPK est impliquée dans l'activation de TBK1, on peut imaginer que la liaison de Nedd4.2 au PPxY de la protéine VI pourrait empêcher son interaction avec le PPxY d'AMPK, et que ceci permettrait de limiter l'activation de cette kinase et par conséquent celle de TBK1 (**Figure 68**).

Il serait donc intéressant d'étudier le niveau de phosphorylation de TBK1 et AMPK en absence de Nedd4.2, ceci permettrait de conclure quant au rôle de cette protéine dans la régulation directe de l'activation de ces kinases.



**Figure 68: Mécanisme d'inhibition de TBK1 par l'AdV**

① L'AdV pourrait directement contrôler l'activation de TBK1 en recrutant l'ubiquitine ligase cellulaire Nedd4.2, par le domaine PPxY de sa protéine VI.

1- cette interaction pourrait limiter l'interaction de Nedd4.2 avec d'autres substrats présentant un PPxY, comme AMPK.

2- Ainsi recrutée, Nedd4.2 pourrait ubiquitiner soit des facteurs en amont de TBK1 (Gal8 ? AMPK ?), soit directement TBK1 et induire la dégradation de ces protéines modifiées.

② L'autophagie pourrait également limiter l'activation de TBK1 en induisant la dégradation de sa forme phosphorylée ou des facteurs en amont nécessaires à son activation (Gal8 ? AMPK ?).

D'un autre côté, nous constatons que l'activation de TBK1 semble être régulée par autophagie. En effet, en absence d'ATG5 et de certains des adaptateurs de l'autophagie (NDP52, p62) la phosphorylation de TBK1 est plus élevée que dans les conditions contrôles. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas détecté de diminution de la quantité totale de TBK1 jusqu'à 3 h après l'infection, suggérant que TBK1 n'est pas dégradé.

Mais, nous pouvons suggérer que TBK1, sous sa forme phosphorylée, pourrait être un substrat de l'autophagie. TBK1 sous cette forme activée resterait ainsi associé aux sites de dommage membranaire et serait dégradé (**Figure 68**).

Pour le savoir, il serait intéressant de déterminer si le virus WT parvient toujours à limiter cette activation dans des conditions où l'autophagie est inhibée par la chloroquine ou encore la bafilomycine. Ceci permettrait de compléter nos données préliminaires sur le rôle de l'autophagie dans la régulation de TBK1.

Des facteurs essentiels à l'activation de TBK1 (Gal8, AMPK...) pourraient eux-mêmes être substrat de l'autophagie, limitant ainsi de façon indirecte l'activation de la kinase (**Figure 68**).

Ce mécanisme de dégradation de facteurs de l'autophagie par cette dernière est déjà décrit pour p62, il serait donc intéressant de comparer ce mécanisme avec celui pouvant mener au contrôle de l'activation de TBK1 (Bjørkøy et al., 2009).



### CHAPITRE 3

#### L'activation de TBK1 par l'Adénovirus : rôle proviral ou antiviral ?

TBK1 est phosphorylé et recruté au cours de l'infection et son inhibition fonctionnelle restaure significativement l'infectiosité du mutant M1, normalement dégradé par autophagie et diminue légèrement l'infectiosité du virus WT. Ces données suggèrent que TBK1 pourrait jouer un rôle à la fois antiviral et proviral au cours du cycle d'infection.

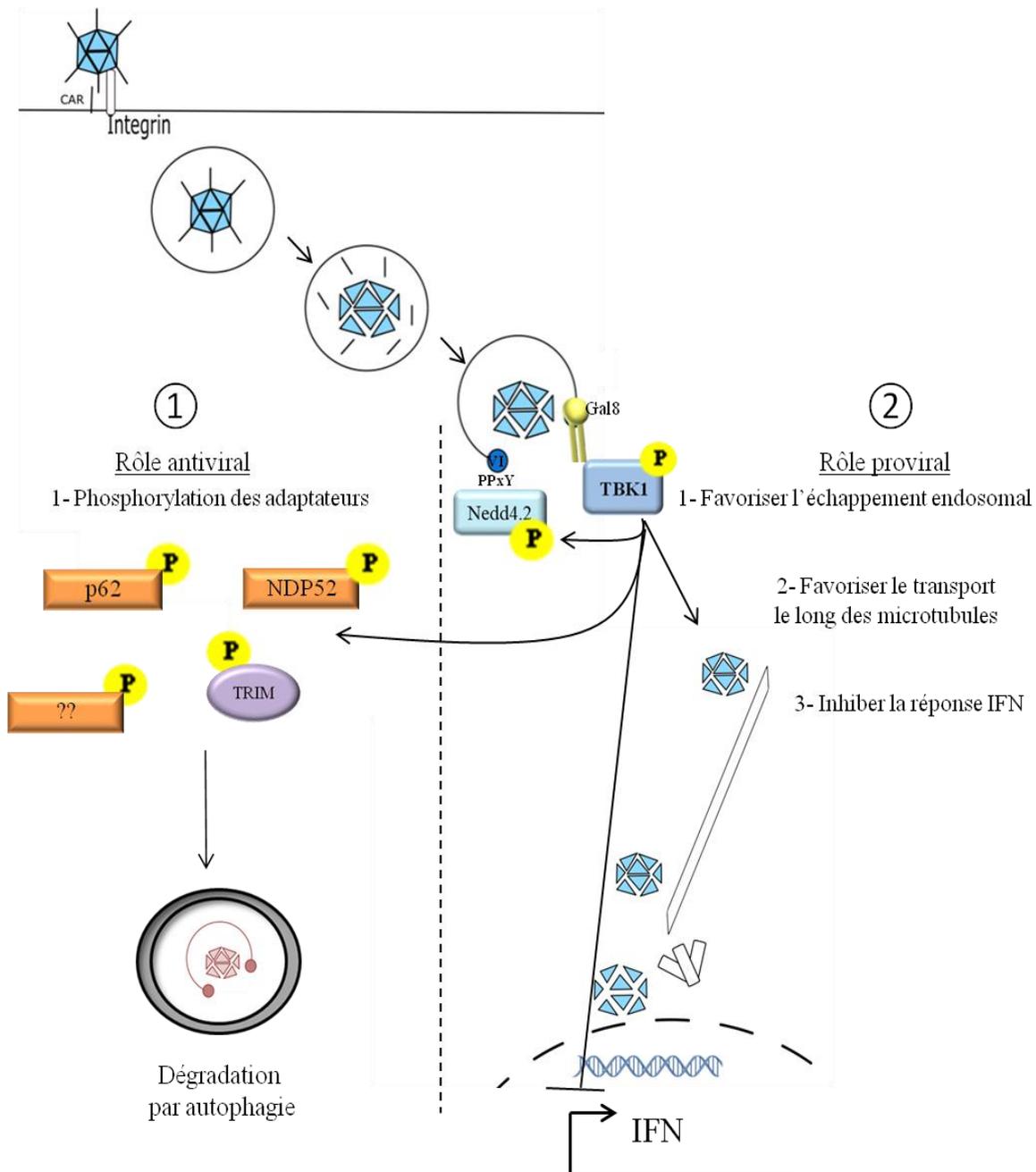
Nous pouvons ainsi supposer qu'en réponse aux dommages membranaires, TBK1 aura un effet antiviral permettant d'induire l'autophagie afin de dégrader le virus (cas du mutant M1), mais plus tard, TBK1 pourrait favoriser l'infection. En effet, des données préliminaires du laboratoire indiquent que l'autophagie faciliterait le transport du virus vers le noyau (cas du virus WT).

##### I- Rôle antiviral de TBK1

Afin d'étudier les différentes fonctions de TBK1 lors de l'infection par l'AdV, une lignée cellulaire U2OS KO pour TBK1 (par CRISPR-Cas9) est en cours de développement au laboratoire. Cette lignée nous permettra de confirmer les résultats obtenus avec l'inhibition fonctionnelle de TBK1. Elle nous permettra également de restaurer l'expression de TBK1 avec des formes mutées afin de déterminer l'implication des différents domaines dans l'activation de l'autophagie et le rôle proviral ou antiviral de TBK1 (**Figure 69**).

##### A) Implication de la phosphorylation

Dans un premier temps, puisque nous avons mis en évidence que TBK1 est phosphorylé au cours de l'infection, il serait intéressant d'étudier l'impact de cette activation sur l'infectiosité du virus. La sérine 172 est le site de phosphorylation de TBK1, et cette activation est nécessaire à l'activité kinase de TBK1. Ainsi, en mutant la sérine 172 ou en utilisant un mutant sans activité catalytique, nous pourrions déterminer l'impact de l'activation de TBK1 pour l'autophagie dirigée contre l'AdV. Les formes mutées de TBK1 S172A (non phosphorylable), S172E (mimant une phosphorylation constitutive) et K38M (site catalytique muté) seront exprimées dans les cellules U2OS KO TBK1 et l'infectiosité du mutant M1 sera déterminée.



### Figure 69: Fonctions antivirales et provirales de TBK1

Au cours de l'infection par l'AdV, TBK1 semble jouer autant un rôle antiviral que proviral.

① Son rôle antiviral mène à l'activation de l'autophagie et à la dégradation du mutant M1. TBK1 pourrait induire la phosphorylation de certains adaptateurs, comme p62, NDP52 ou les TRIM, ce qui renforcerait leur fonction antivirale dans l'autophagie.

② Son rôle proviral permet au virus WT de poursuivre son cycle infectieux. TBK1 pourrait ainsi phosphoryler Nedd4.2, pour l'échappement endosomal ou le transport du virus le long des microtubules mécanisme déjà décrit pour dépendre de l'autophagie.

L'inhibition de la réponse IFN $\beta$  induite par l'AdV pourrait également dépendre du rôle de TBK1 dans l'autophagie, et favoriserait alors l'infection en limitant la réponse antivirale.

Par la suite, si l'activité kinase de TBK1 est nécessaire, il faudra ensuite identifier le substrat de cette phosphorylation. TBK1 est décrit pour induire la phosphorylation des adaptateurs de l'autophagie dont p62 et NDP52 ce qui renforce leur rôle dans l'autophagie. Bien que ces adaptateurs ne soient pas nécessaires pour la phosphorylation de TBK1, nous avons démontré qu'ils étaient recrutés aux sites de dommages membranaires induits par le virus (Montespan et al., 2017). D'autres adaptateurs pourraient également être recrutés au niveau des sites de dommage membranaire. Il serait donc intéressant d'étudier leur niveau de phosphorylation au cours de l'infection et si phosphorylation il y a, de démontrer qu'elle est dépendante de TBK1. Nous pouvons supposer que le virus WT en limitant l'activation de TBK1 parvient à inhiber la phosphorylation d'adaptateurs, ou d'autres facteurs de l'autophagie.

### **B) Rôle des interactions avec des adaptateurs**

Pour savoir si l'interaction de TBK1 avec des facteurs de l'autophagie est nécessaire pour son activation par l'AdV, nous pourrions analyser l'effet d'un mutant dont le domaine d'interaction avec les adaptateurs Nap1 et Sintbad a été délété (TBK1 $\Delta$ C). Ceci nous permettra d'identifier le rôle de ces interactions pour son activation mais également son rôle dans l'autophagie en examinant l'infectiosité du mutant M1.

A partir de cette forme mutée, nous pourrions construire des protéines de fusion entre TBK1 et différents facteurs de l'autophagie. Par exemple, dans des cellules déplétées pour Gal8 l'expression d'une protéine de fusion TBK1-Gal8 afin de confirmer la fonctionnalité de cette interaction. Gal3 interagit également avec les dommages membranaires induits par le virus, une protéine de fusion TBK1-Gal3 pourra également être construite afin de déterminer si le recrutement seul de TBK1 favorise son activation ou si Gal8 présente d'autres fonctions nécessaires pour l'activation de TBK1.

Afin d'identifier, de façon plus générale, les partenaires de TBK1 nous pourrions réaliser des expériences de « pull down » de TBK1 suivi par une analyse par spectrométrie de masse. Ces études nous permettront ainsi de mieux identifier les partenaires et mécanismes de son rôle dans l'autophagie dirigée contre l'AdV.

## II- Rôle proviral de TBK1

### **A) Implication de la phosphorylation**

Nous avons précédemment évoqué le rôle de la phosphorylation de TBK1 et de son activité kinase dans la fonction antivirale de la protéine, mais cette activité pourrait également induire la phosphorylation de facteurs nécessaires pour induire l'échappement endosomal du virus et ainsi avoir un rôle proviral. Le virus WT, contrairement au mutant M1, recrute l'ubiquitine ligase cellulaire Nedd4.2 et cette interaction est nécessaire pour l'échappement endosomal du virus. Il serait donc intéressant d'étudier si Nedd4.2 est un substrat de la phosphorylation par TBK1 et si cela impacte le rôle de Nedd4.2 dans l'échappement endosomal. En effet, une étude a montré que la phosphorylation de Nedd4.2 favorise son activité ubiquitine ligase (Persaud et al., 2014). Nedd4.2 pourrait ainsi ubiquitiner des facteurs de l'autophagie, dans un mécanisme dépendant de son activation par TBK1. Nous pourrions donc suivre dans les cellules U2OS KO TBK1 le niveau de phosphorylation de Nedd4.2.

### **B) Fonction dans le transport du virus**

L'inhibition fonctionnelle de TBK1 réduit légèrement l'infectiosité du virus WT, ce qui corrèle avec des études précédentes du laboratoire démontrant que la déplétion d'ATG5 diminue également l'infectiosité du virus. L'ensemble de ces données suggère que TBK1 et l'autophagie joueraient un rôle proviral au cours de l'infection. Ce rôle pourrait être lié à l'efficacité du transport du virus le long des microtubules (Montespan et al., 2017). TBK1 est en effet impliqué dans la dynamique des microtubules, au cours de la mitose (Pillai et al., 2015), et pourrait lors de l'infection par l'AdV phosphoryler des substrats impliqués dans le transport rétrograde le long des microtubules.

Pour le savoir, nous pourrions déterminer la localisation des capsides au cours du temps dans les cellules U2OS-KO TBK1, afin d'en déduire l'implication de TBK1 dans le transport du virus au niveau du MTOC. Ainsi si le virus WT parvient à contrôler TBK1, il peut alors utiliser cette protéine cellulaire pour son propre transport jusqu'au MTOC.

### **C) Fonction dans l'inhibition d'IFN $\beta$**

Le recrutement de TBK1 et l'activation de l'autophagie, pourraient également permettre au virus de limiter la réponse IFN $\beta$ . En effet, ces deux mécanismes de défense se contrôlent mutuellement (voir Introduction). L'autophagie dirigée contre l'AdV pourrait donc limiter la réponse IFN $\beta$  induite par ce dernier. En effet, il a récemment été mis en évidence que TBK1

induit la phosphorylation de p62 afin de mener à la dégradation de STING, limitant ainsi la réponse IFN $\beta$  (Prabakaran et al., 2018). Un mécanisme similaire pourrait être développé par l'AdV, où l'activation de TBK1 par autophagie permet de limiter la réponse IFN $\beta$ . Il serait donc intéressant d'étudier si l'AdV parvient toujours à contrôler la réponse IFN $\beta$  lorsque l'autophagie est inhibée.

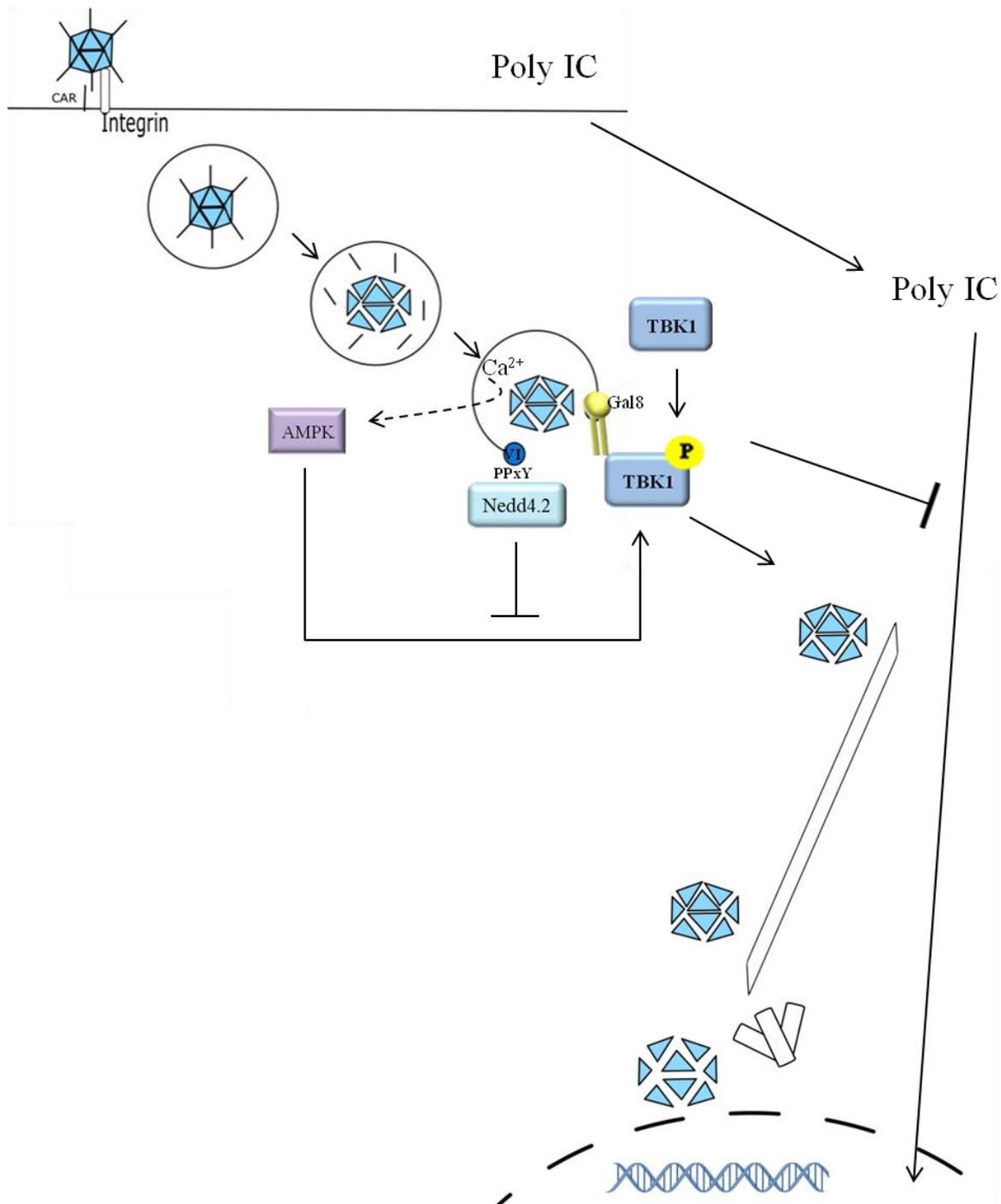


## CHAPITRE 4

### Modèle d'activation

Avec l'ensemble de ces données et hypothèses, nous proposons un modèle d'activation de TBK1 au cours de l'infection par l'AdV (**Figure 70**). Dans ce modèle, AMPK serait activé par un influx de calcium, induit par les dommages membranaires dus à l'entrée du virus. Ces signaux de danger seraient reconnus par Gal8 qui interagit avec les  $\beta$ -galactosides exposés. Gal8 induirait alors (directement ou non ?) le recrutement de TBK1 à ces sites de dommage membranaire. Cette relocalisation de TBK1 pourrait induire sa phosphorylation par AMPK. L'activation de TBK1 favoriserait ainsi l'autophagie dirigée contre le virus et mènerait à la dégradation du mutant M1. Au contraire, le virus WT, limiterait l'activation de TBK1 probablement via sa protéine VI et la protéine cellulaire Nedd4.2. Cela empêcherait la phosphorylation ou le recrutement de TBK1. Le virus profiterait alors de TBK1 pour promouvoir son cycle viral, en favorisant son transport ou son échappement endosomal. En parallèle, la relocalisation de TBK1 aux sites de dommage membranaire, et sa fonction dans l'autophagie, pourrait interférer avec son rôle dans l'activation d'IFN $\beta$ , et ceci inhiberait cette réponse.

Ces travaux de thèse ont confirmé le rôle des dommages membranaires comme signaux de danger. Nous avons montré qu'ils sont reconnus par la cellule pour induire le recrutement et l'activation de TBK1. Ceci active la dégradation du virus par autophagie, si ce dernier ne s'échappe pas des endosomes rompus. Nos résultats mettent en évidence l'originalité de la réponse cellulaire dirigée contre l'AdV, qui diffère du modèle bactérien. Des études complémentaires sur les mécanismes d'activation et d'inhibition de TBK1 par l'AdV nous permettront de mieux comprendre le rôle de cette kinase dans l'autophagie et comment les pathogènes limitent leur dégradation par cette voie.



### Figure 70: Modèle d'activation

L'AdV entre dans la cellule par endocytose, il s'échappe de l'endosome en induisant des dommages membranaires via la protéine VI. Cette rupture pourrait induire un influx de calcium menant à l'activation d'AMPK. En parallèle, des  $\beta$ -galactosides sont exposés et reconnus par Gal8 qui induit le recrutement direct ou indirect de TBK1. AMPK pourrait ainsi induire l'activation de TBK1.

Le virus en interagissant avec Nedd4.2 limiterait cette activation. TBK1 aurait alors un rôle proviral favorisant le transport du virus jusqu'au noyau.

Les ruptures membranaires induites par le virus sont également nécessaires pour inhiber la réponse IFN $\beta$ , la relocalisation de la fonction catalytique de TBK1 vers son rôle dans l'autophagie pourrait expliquer cette inhibition et participait au rôle proviral de TBK1.

## **ANNEXES**



## ABBREVIATIONS

### A

**AD** : Adenoid Degenerating agent  
**ADN** : Acide desoxyribonucléique  
**AdV** : Adénovirus  
**AIM** : Absent In Melanoma 2 like receptor  
**AMPK** : AMP activated Kinase  
**API1** : Activating Protein-1  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**ARNm** : ARN messenger  
**ASC** : Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD  
**ATF-2** : Activating Transcription Factor 2  
**ATG** : Autophagy related Genes  
**ATP** : Adénosine-Triphosphate

### B

**BSA** : Bovine Serum Albumin  
**Bcl-2** : B-cell lymphoma 2  
**BKV** : Virus BK (polyomavirus)

### C

**CAMKK2** : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2

**CAR** : Coxsackievirus et Adenovirus Receptor  
**CARD** : Caspase Activation and Recruitment Domain  
**CBP** : CREB-binding protein  
**CD46** : Cluster of Differentiation 46  
**CDN** : Cyclic dinucléotide  
**cGAMP** : Cyclic Guanosine monophosphate – Adenosine monophosphate  
**cGAS** : Cyclic GAMP synthase  
**CMA** : Chaperone Mediated Autophagy  
**CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
**CRM1** : Chromosome region maintenance 1  
**Cryo-EM** : Cryo-microscopie électronique  
**CsCl** : Chlorure de Césium  
**CYLD** : Cylindromatosis Tumor Suppressor Protein

### D

**DAI** : DNA dependent Activator of IRF  
**DAMP** : Danger Associated Molecular Pattern  
**DAPI** : 4',6-diamidino-2-phenylindole  
**DBD** : DNA binding domain  
**DC** : Dendritic cells  
**dCMP** : Deoxycytidine monophosphate  
**DD** : Death Domain  
**DENV** : Virus de la Dengue  
**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
**DMSO** : Dimethyl sulfoxide  
**dNTP** : Déoxynucleotide  
**DO** : Densité optique  
**DSG-2** : Desmoglein-2

### E

**eiF2 $\alpha$**  : Eukaryotic Initiation Factor 2  
**ESCRT** : Endosomal Sorting Complex Required for Transport

### F

**FIP200** : FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa  
**FOXO3** : Forkhead box O3

## G

**GABARAP** : Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein

**Gal** : Galectine

**GFP** : Green Fluorescent Protein

**GON** : Group of Nine

**GOS** : Group of Six

**GTP** : Guanosine triphosphate

## H

**HCMV** : Cytomegalovirus humain

**HCV** : Virus de l'hépatite C

**HEK293** : Human embryonic kidney 293

**HFF** : Human Foreskin Fibroblast

**HIN200** : Hematopoietic interferon (IFN)-inducible nuclear protein with the 200-amino-acid repeat

**HPV** : Human Papillomavirus

**Hsc-70** : Heat shock cognate 70

**HSV-1** : Herpes Simplex virus 1

## I

**IAD** : IRF Associated Domain

**ICP** : Infected Cell Protein

**IF** : Immunofluorescence

**IFN** : Interféron

**I $\kappa$ B** : NF- $\kappa$ B Inhibitor

**IKK** : I $\kappa$ B Kinase

**IRAK** : Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase

**IRF** : Interferon Regulatory Family

**ISG** : Interferon-Stimulated Gene

**ISGF3** : Interferon-Stimulated Gene Factor 3

**ISRE** : IFN stimulated Response Element

**ITR** : Séquences terminales inverses répétées

## J

**JEV** : Virus de l'encéphalite japonaise

**JAK** : Janus family of tyrosine kinase

## K

**KD** : Kinase Domain

**KSHV** : Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus

## L

**LAMP2A** : Lysosomal-associated membrane protein-2A

**LC3** : Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B

**LIR** : LC3 Interacting Region

**LKB1** : Liver kinase B1

**LPS** : Lipopolysaccharide

**LRSAM1** : Leucine rich repeat and sterile alpha motif containing 1.

**LRR** : Leucine Rich Repeat

## M

**3'-MA** : 3-méthyladenine

**MAPK** : Mitogen-activated protein kinases

**MARV** : Virus Marburg

**MAVS** : Mitochondrial antiviral-signaling protein

**MOI** : Multiplicity Of Infection

**MDA5** : Melanoma Differentiation-Associated protein 5

**mDC** : myeloid Dendritic Cells

**MLP** : Major Late Promotor

**MTOC** : Microtubule organizing center

**mTOR** : mammalian target of rapamycin

**Myd88** : Myeloid differentiation primary response 88

## N

**NBR1** : Neighbor of BRCA1 gene 1

**Nedd4** : Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4

**NDP52** : Nuclear Dot Protein 52

**NEMO** : NF- $\kappa$ B Essential Modulator

**NES** : Nuclear Export Signal

**NF- $\kappa$ B** : Nuclear Factor Kappa B

**NK** : Natural Killer

**NLRP** : nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors

**NLS** : Nuclear Localisation Signal

**NPC** : Nuclear Pore Complex

**NTase** : Nucleotidyl transferase

**Nup** : Nucleoporin

## O

**OAS** : 2'-5' oligoadénylate synthase

**OPTN** : Optineurine

## **P**

**PAMP** : Pathogen Associated Molecular Pattern

**PAS** : Phagophore Assembly Site

**pb** : Paire de base

**PCR** : Polymerase chain reaction

**PE** : Phosphatidyl-Ethanolamine

**Pfu** : Plaque forming unit

**pDC** : plasmacytoid Dendritic Cells

**PI(3)P** : Phosphatidylinositol-3-phosphate

**PKR** : Protein Kinase R

**PMSF** : Phenylmethylsulfonyl fluoride

**poly IC** : Acide polyinosinique-polycytidylique

**pp** : Particules physiques

**PRD** : Positive Regulatory Domain

**PRR** : Pattern Recognition Receptor

**PYD** : Pyrin Domain

## **R**

**RB1CC1** : RB1-inducible coiled-coil protein 1

**RE** : Reticulum Endoplasmique

**RHD** : Rel Homology Domain

**RI-67** : Respiratory Illness agent

**RIG-1** : Retinoic acid-Inducible Gene I

**RT** : Reverse Transcription

**Rubicon** : RUN domain and cystein-rich domain containing Beclin-1 interacting protein

## **S**

**SCV** : Salmonella Containing Vacuole

**SDS-PAGE** : Sodium Dodecyl Sulfate–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

**SLR** : Sequestosome-1 Like Receptor

**SNARE** : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor

**sh ARN** : Short hairpin ARN

**si ARN** : Small interfering ARN

**SMURF1** : SMAD Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 1

**SOCS** : Suppressor of cytokines signaling

**STAT** : Signal Transducer and Activator of Transcription

**STING** : Stimulator of Interferon Genes

## **T**

**Tax1BP1** : Tax1-binding protein 1

**TBK1** : Tank-binding kinase 1

**TIR** : Toll/IL-1 Receptor

**TLR** : Toll Like Receptor

**TNF $\alpha$**  : Tumour necrosis factor  $\alpha$

**TP** : Terminal Protein

**TRAF** : Tumour necrosis factor receptor associated factor

**TRIF** : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$

**TRIM** : Tripartite motif

## **U**

**U2OS** : Osteosarcome humain

**UBA** : Ubiquitin-associated domains

**ULK1** : Uncoordinated-51 like kinase 1

**USP** : Ubiquitin specific peptidase

**UVRAG** : UV Radiation Resistance Associated

## **V**

**VIH** : Virus Immunodéficience Humaine

**VPS 34** : Vacuolar Protein Sorting 34

**VSV** : Vesicular stomatitis virus

## **W**

**WIPI** : WD-repeat protein Interacting with PhosphoInositides



## **BIBLIOGRAPHIE**

- Abe, T., and Barber, G.N. (2014). Cytosolic-DNA-Mediated, STING-Dependent Proinflammatory Gene Induction Necessitates Canonical NF- $\kappa$ B Activation through TBK1. *J. Virol.* 88, 5328–5341.
- Aguirre, S., Maestre, A.M., Pagni, S., Patel, J.R., Savage, T., Gutman, D., Maringer, K., Bernal-Rubio, D., Shabman, R.S., Simon, V., et al. (2012). DENV Inhibits Type I IFN Production in Infected Cells by Cleaving Human STING. *PLoS Pathog.* 8.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732–738.
- Alnemri, E.S. (2010). Sensing cytoplasmic danger signals by the inflammasome. *J. Clin. Immunol.* 30, 512–519.
- Amaravadi, R.K., Yu, D., Lum, J.J., Bui, T., Christophorou, M.A., Evan, G.I., Thomas-Tikhonenko, A., and Thompson, C.B. (2007). Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J. Clin. Invest.* 117, 326–336.
- Anderson, C.W., Young, M.E., and Flint, S.J. (1989). Characterization of the adenovirus 2 virion protein, mu. *Virology* 172, 506–512.
- Andrade, W.A., Firon, A., Schmidt, T., Hornung, V., Fitzgerald, K.A., Kurt-Jones, E.A., Trieu-Cuot, P., Golenbock, D.T., and Kaminski, P.A. (2016). Group B Streptococcus Degrades Cyclic-di-AMP to Modulate STING-Dependent Type I Interferon Production., Group B Streptococcus degrades cyclic-di-AMP to modulate STING-dependent type I interferon production. *Cell Host Microbe* 20, 20, 49, 49–59.
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M.T., Michel, P.P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E.C., and Agid, Y. (1997). Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol. Histopathol.* 12, 25–31.
- Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M.S., Bachelier, F., Thomas, D., and Hay, R.T. (1995). Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2689–2696.
- Arnberg, N., Edlund, K., Kidd, A.H., and Wadell, G. (2000). Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *J. Virol.* 74, 42–48.
- Bailey, C.J., Crystal, R.G., and Leopold, P.L. (2003). Association of adenovirus with the microtubule organizing center. *J. Virol.* 77, 13275–13287.
- Bansal, M., Moharir, S.C., Sailasree, S.P., Sirohi, K., Sudhakar, C., Sarathi, D.P., Lakshmi, B.J., Buono, M., Kumar, S., and Swarup, G. (2018). Optineurin promotes autophagosome formation by recruiting the autophagy-related Atg12-5-16L1 complex to phagophores containing the Wipi2 protein. *J. Biol. Chem.* 293, 132–147.
- Barlan, A.U., Griffin, T.M., McGuire, K.A., and Wiethoff, C.M. (2011). Adenovirus membrane penetration activates the NLRP3 inflammasome. *J. Virol.* 85, 146–155.
- Barnard, P., and McMillan, N.A. (1999). The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology* 259, 305–313.
- Beale, R., Wise, H., Stuart, A., Ravenhill, B.J., Digard, P., and Randow, F. (2014). A LC3-interacting motif in the influenza A virus M2 protein is required to subvert autophagy and maintain virion stability. *Cell Host Microbe* 15, 239–247.

- Béládi, I., and Pusztai, R. (1967). Interferon-like substance produced in chick fibroblast cells inoculated with human adenoviruses. *Z. Naturforsch. B* 22, 165–169.
- Bell, J.L., Malyukova, A., Kavallaris, M., Marshall, G.M., and Cheung, B.B. (2013). TRIM16 inhibits neuroblastoma cell proliferation through cell cycle regulation and dynamic nuclear localization. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 889–898.
- Bergamini, E., Cavallini, G., Donati, A., and Gori, Z. (2007). The role of autophagy in aging: its essential part in the anti-aging mechanism of caloric restriction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1114, 69–78.
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., and Finberg, R.W. (1997). Isolation of a common receptor for Cocksackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275, 1320–1323.
- Berget, S.M., Moore, C., and Sharp, P.A. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 3171–3175.
- Bieback, K., Lien, E., Klagge, I.M., Avota, E., Schneider-Schaulies, J., Duprex, W.P., Wagner, H., Kirschning, C.J., Ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (2002). Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J. Virol.* 76, 8729–8736.
- Binder, A.M., Biggs, H.M., Haynes, A.K., Chommanard, C., Lu, X., Erdman, D.D., Watson, J.T., and Gerber, S.I. (2017). Human Adenovirus Surveillance - United States, 2003-2016. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 66, 1039–1042.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., and Johansen, T. (2009). Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol.* 452, 181–197.
- Blair, G.E., Dixon, S.C., Griffiths, S.A., and Zajdel, M.E. (1989). Restricted replication of human adenovirus type 5 in mouse cell lines. *Virus Res.* 14, 339–346.
- Blanchet, F.P., Moris, A., Nikolic, D.S., Lehmann, M., Cardinaud, S., Stalder, R., Garcia, E., Dinkins, C., Leuba, F., Wu, L., et al. (2010). Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunoamphisomes in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses. *Immunity* 32, 654–669.
- Bodur, C., Kazyken, D., Huang, K., Ekim Ustunel, B., Siroky, K.A., Tooley, A.S., Gonzalez, I.E., Foley, D.H., Acosta-Jaquez, H.A., Barnes, T.M., et al. (2018). The IKK-related kinase TBK1 activates mTORC1 directly in response to growth factors and innate immune agonists. *EMBO J.* 37, 19–38.
- Boland, B., Kumar, A., Lee, S., Platt, F.M., Wegiel, J., Yu, W.H., and Nixon, R.A. (2008). Autophagy Induction and Autophagosome Clearance in Neurons: Relationship to Autophagic Pathology in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 6926–6937.
- Bootman, M.D., Chehab, T., Bultynck, G., Parys, J.B., and Rietdorf, K. (2018). The regulation of autophagy by calcium signals: Do we have a consensus? *Cell Calcium* 70, 32–46.
- Bordigoni, P., Carret, A.S., Venard, V., Witz, F., and Le Faou, A. (2001). Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 32, 1290–1297.
- Borgland, S.L., Bowen, G.P., Wong, N.C., Libermann, T.A., and Muruve, D.A. (2000). Adenovirus vector-induced expression of the C-X-C chemokine IP-10 is mediated through capsid-dependent activation of NF-kappaB. *J. Virol.* 74, 3941–3947.

- Boyle, K.B., and Randow, F. (2013). The role of “eat-me” signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* *16*, 339–348.
- Boyle, K.B., Thurston, T.L.M., and Randow, F. (2016). TBK1 directs WIPI2 against Salmonella. *Autophagy* *12*, 2508–2509.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248–254.
- Bremner, K.H., Scherer, J., Yi, J., Vershinin, M., Gross, S.P., and Vallee, R.B. (2009). Adenovirus transport via direct interaction of cytoplasmic dynein with the viral capsid hexon subunit. *Cell Host Microbe* *6*, 523–535.
- Broz, P., and Dixit, V.M. (2016). Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 407–420.
- Burckhardt, C.J., Suomalainen, M., Schoenenberger, P., Boucke, K., Hemmi, S., and Greber, U.F. (2011). Drifting motions of the adenovirus receptor CAR and immobile integrins initiate virus uncoating and membrane lytic protein exposure. *Cell Host Microbe* *10*, 105–117.
- Cai, J., Chen, H.-Y., Peng, S.-J., Meng, J.-L., Wang, Y., Zhou, Y., Qian, X.-P., Sun, X.-Y., Pang, X.-W., Zhang, Y., et al. (2018). USP7-TRIM27 axis negatively modulates antiviral type I IFN signaling. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *32*, 5238–5249.
- Cai, X., Chiu, Y.-H., and Chen, Z.J. (2014). The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. *Mol. Cell* *54*, 289–296.
- Campbell, E.M., Perez, O., Anderson, J.L., and Hope, T.J. (2008). Visualization of a proteasome-independent intermediate during restriction of HIV-1 by rhesus TRIM5alpha. *J. Cell Biol.* *180*, 549–561.
- Casanova, J.E. (2017). Bacterial Autophagy: Offense and Defense at the Host–Pathogen Interface. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* *4*, 237–243.
- Cassany, A., Ragues, J., Guan, T., Bégu, D., Wodrich, H., Kann, M., Nemerow, G.R., and Gerace, L. (2015). Nuclear import of adenovirus DNA involves direct interaction of hexon with an N-terminal domain of the nucleoporin Nup214. *J. Virol.* *89*, 1719–1730.
- Celli, J. (2012). LRSAM1, an E3 Ubiquitin Ligase with a Sense for Bacteria. *Cell Host Microbe* *12*, 735–736.
- Cemma, M., Kim, P.K., and Brumell, J.H. (2011). The ubiquitin-binding adaptor proteins p62/SQSTM1 and NDP52 are recruited independently to bacteria-associated microdomains to target Salmonella to the autophagy pathway. *Autophagy* *7*, 341–345.
- Cerullo, V., Seiler, M.P., Mane, V., Brunetti-Pierri, N., Clarke, C., Bertin, T.K., Rodgers, J.R., and Lee, B. (2007). Toll-like receptor 9 triggers an innate immune response to helper-dependent adenoviral vectors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *15*, 378–385.
- Chakrabarti, S., Mautner, V., Osman, H., Collingham, K.E., Fegan, C.D., Klapper, P.E., Moss, P.A.H., and Milligan, D.W. (2002). Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood* *100*, 1619–1627.

- Chang, T.H., Liao, C.L., and Lin, Y.L. (2006). Flavivirus induces interferon-beta gene expression through a pathway involving RIG-I-dependent IRF-3 and PI3K-dependent NF-kappaB activation. *Microbes Infect.* 8, 157–171.
- Chatterjee, P.K., Vayda, M.E., and Flint, S.J. (1985). Interactions among the three adenovirus core proteins. *J. Virol.* 55, 379–386.
- Chau, T.-L., Gioia, R., Gatot, J.-S., Patrascu, F., Carpentier, I., Chapelle, J.-P., O'Neill, L., Beyaert, R., Piette, J., and Chariot, A. (2008). Are the IKKs and IKK-related kinases TBK1 and IKK-epsilon similarly activated? *Trends Biochem. Sci.* 33, 171–180.
- Chauhan, S., Kumar, S., Jain, A., Ponpuak, M., Mudd, M.H., Kimura, T., Choi, S.W., Peters, R., Mandell, M., Bruun, J.-A., et al. (2016). TRIMs and Galectins Globally Cooperate and TRIM16 and Galectin-3 Co-direct Autophagy in Endomembrane Damage Homeostasis. *Dev. Cell* 39, 13–27.
- Chen, J., Morral, N., and Engel, D.A. (2007). Transcription releases protein VII from adenovirus chromatin. *Virology* 369, 411–422.
- Choi, Y., Bowman, J.W., and Jung, J.U. (2018). Autophagy during viral infection - a double-edged sword. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 341–354.
- Chow, L.T., Gelinas, R.E., Broker, T.R., and Roberts, R.J. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12, 1–8.
- Choy, A., Dancourt, J., Mugo, B., O'Connor, T.J., Isberg, R.R., Melia, T.J., and Roy, C.R. (2012). The Legionella effector RavZ inhibits host autophagy through irreversible Atg8 deconjugation. *Science* 338, 1072–1076.
- Christensen, M.H., and Paludan, S.R. (2017). Viral evasion of DNA-stimulated innate immune responses. *Cell. Mol. Immunol.* 14, 4–13.
- Christian, F., Smith, E.L., and Carmody, R.J. (2016). The Regulation of NF-κB Subunits by Phosphorylation. *Cells* 5.
- Chroboczek, J., Ruigrok, R.W., and Cusack, S. (1995). Adenovirus fiber. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 199 ( Pt 1), 163–200.
- Clark, K., Plater, L., Peggie, M., and Cohen, P. (2009). Use of the Pharmacological Inhibitor BX795 to Study the Regulation and Physiological Roles of TBK1 and IκB Kinase ε. *J. Biol. Chem.* 284, 14136–14146.
- Clark, K., Takeuchi, O., Akira, S., and Cohen, P. (2011). The TRAF-associated protein TANK facilitates cross-talk within the IκappaB kinase family during Toll-like receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 17093–17098.
- Clemens, M.J., and Williams, B.R.G. (1978). Inhibition of cell-free protein synthesis by pppA2' p5' A2' p5' A: a novel oligonucleotide synthesized by interferon-treated L cell extracts. *Cell* 13, 565–572.
- Colamonici, O.R., Domanski, P., Sweitzer, S.M., Lerner, A., and Buller, R.M. (1995). Vaccinia virus B18R gene encodes a type I interferon-binding protein that blocks interferon alpha transmembrane signaling. *J. Biol. Chem.* 270, 15974–15978.
- Colby, W.W., and Shenk, T. (1981). Adenovirus type 5 virions can be assembled in vivo in the absence of detectable polypeptide IX. *J. Virol.* 39, 977–980.

- Collins, S.E., and Mossman, K.L. (2014). Danger, diversity and priming in innate antiviral immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 525–531.
- Collins, C.A., Mazière, A.D., Dijk, S. van, Carlsson, F., Klumperman, J., and Brown, E.J. (2009). Atg5-Independent Sequestration of Ubiquitinated Mycobacteria. *PLOS Pathog.* 5, e1000430.
- Cotten, M., and Weber, J.M. (1995). The adenovirus protease is required for virus entry into host cells. *Virology* 213, 494–502.
- Coyne, C.B., and Bergelson, J.M. (2005). CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 869–882.
- Crow, M.K. (2014). Type I Interferon in the Pathogenesis of Lupus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192, 5459–5468.
- Crystal, R.G. (2014). Adenovirus: The First Effective In Vivo Gene Delivery Vector. *Hum. Gene Ther.* 25, 3–11.
- Cui, J., Zhu, L., Xia, X., Wang, H.Y., Legras, X., Hong, J., Ji, J., Shen, P., Zheng, S., Chen, Z.J., et al. (2010). NLRC5 negatively regulates the NF-kappaB and type I interferon signaling pathways. *Cell* 141, 483–496.
- Cupelli, K., and Stehle, T. (2011). Viral attachment strategies: the many faces of adenoviruses. *Curr. Opin. Virol.* 1, 84–91.
- Cusack, S. (2005). Adenovirus complex structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 237–243.
- Dalrymple, N.A., Cimica, V., and Mackow, E.R. (2015). Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant. *MBio* 6, e00553-00515.
- Das, A., Dinh, P.X., and Pattnaik, A.K. (2015). Trim21 regulates Nmi-IFI35 complex-mediated inhibition of innate antiviral response. *Virology* 485, 383–392.
- Delboy, M.G., Siekavizza-Robles, C.R., and Nicola, A.V. (2010). Herpes Simplex Virus Tegument ICP0 Is Capsid Associated, and Its E3 Ubiquitin Ligase Domain Is Important for Incorporation into Virions. *J. Virol.* 84, 1637–1640.
- Delgado, M.A., Elmaoued, R.A., Davis, A.S., Kyei, G., and Deretic, V. (2008). Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J.* 27, 1110–1121.
- Deosaran, E., Larsen, K.B., Hua, R., Sargent, G., Wang, Y., Kim, S., Lamark, T., Jauregui, M., Law, K., Lippincott-Schwartz, J., et al. (2013). NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes. *J. Cell Sci.* 126, 939–952.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., and Silverman, R.H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15623–15628.
- Deretic, V. (2006). Autophagy as an immune defense mechanism. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 375–382.
- Deretic, V. (2011). Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunol. Rev.* 240, 92–104.
- Deretic, V., Saitoh, T., and Akira, S. (2013). Autophagy in infection, inflammation, and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 722–737.

Deschamps, T., and Kalamvoki, M. (2017). Impaired STING Pathway in Human Osteosarcoma U2OS Cells Contributes to the Growth of ICP0-Null Mutant Herpes Simplex Virus. *J. Virol.* *91*, e00006-17.

Deter, R.L., and de Duve, C. (1967). INFLUENCE OF GLUCAGON, AN INDUCER OF CELLULAR AUTOPHAGY, ON SOME PHYSICAL PROPERTIES OF RAT LIVER LYSOSOMES. *J. Cell Biol.* *33*, 437–449.

Di Paolo, N.C., Miao, E.A., Iwakura, Y., Murali-Krishna, K., Aderem, A., Flavell, R.A., Papayannopoulou, T., and Shayakhmetov, D.M. (2009). Virus binding to a plasma membrane receptor triggers interleukin-1 alpha-mediated proinflammatory macrophage response in vivo. *Immunity* *31*, 110–121.

Diebold, S.S., Montoya, M., Unger, H., Alexopoulou, L., Roy, P., Haswell, L.E., Al-Shamkhani, A., Flavell, R., Borrow, P., and Reis e Sousa, C. (2003). Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* *424*, 324–328.

Diner, B.A., Lum, K.K., and Cristea, I.M. (2015). The emerging role of nuclear viral DNA sensors. *J. Biol. Chem.* *290*, 26412–26421.

Dooley, H.C., Razi, M., Polson, H.E.J., Girardin, S.E., Wilson, M.I., and Tooze, S.A. (2014). WIPI2 Links LC3 Conjugation with PI3P, Autophagosome Formation, and Pathogen Clearance by Recruiting Atg12–5-16L1. *Mol. Cell* *55*, 238–252.

Dreux, M., and Chisari, F.V. (2010). Viruses and the autophagy machinery. *Cell Cycle Georget. Tex* *9*, 1295–1307.

Düesberg, U., von dem Bussche, A., Kirschning, C., Miyake, K., Sauerbruch, T., and Spengler, U. (2002). Cell activation by synthetic lipopeptides of the hepatitis C virus (HCV)--core protein is mediated by toll like receptors (TLRs) 2 and 4. *Immunol. Lett.* *84*, 89–95.

Dupont, N., Lacas-Gervais, S., Bertout, J., Paz, I., Freche, B., Van Nhieu, G.T., van der Goot, F.G., Sansonetti, P.J., and Lafont, F. (2009). Shigella phagocytic vacuolar membrane remnants participate in the cellular response to pathogen invasion and are regulated by autophagy. *Cell Host Microbe* *6*, 137–149.

Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S.R., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., et al. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* *331*, 456–461.

El Bakkouri, M., Fabry, C.-M., Fender, P., and Schoehn, G. (2008). Structure des Adénovirus. *Virologie* *12*, 275–292.

Enders, J.F., Bell, J.A., Dingle, J.H., Francis, T., Hilleman, M.R., Huebner, R.J., and Payne, A.M. (1956). Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science* *124*, 119–120.

Epperson, D.E., Arnold, D., Spies, T., Cresswell, P., Pober, J.S., and Johnson, D.R. (1992). Cytokines increase transporter in antigen processing-1 expression more rapidly than HLA class I expression in endothelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *149*, 3297–3301.

Escalante, C.R., Nistal-Villán, E., Shen, L., García-Sastre, A., and Aggarwal, A.K. (2007). Structure of IRF-3 bound to the PRDIII-I regulatory element of the human interferon-beta enhancer. *Mol. Cell* *26*, 703–716.

Escamilla-Tilch, M., Filio-Rodríguez, G., García-Rocha, R., Mancilla-Herrera, I., Mitchison, N.A., Ruiz-Pacheco, J.A., Sánchez-García, F.J., Sandoval-Borrego, D., and Vázquez-Sánchez, E.A. (2013).

- Eskelinen, E.-L., and Saftig, P. (2009). Autophagy: A lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1793, 664–673.
- Espert, L., Degols, G., Gongora, C., Blondel, D., Williams, B.R., Silverman, R.H., and Mechti, N. (2003). ISG20, a new interferon-induced RNase specific for single-stranded RNA, defines an alternative antiviral pathway against RNA genomic viruses. *J. Biol. Chem.* 278, 16151–16158.
- Espert, L., Degols, G., Lin, Y.-L., Vincent, T., Benkirane, M., and Mechti, N. (2005). Interferon-induced exonuclease ISG20 exhibits an antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* 86, 2221–2229.
- Everett, R.D. (2001). DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene* 20, 7266–7273.
- Fejer, G., Drechsel, L., Liese, J., Schleicher, U., Ruzsics, Z., Imelli, N., Greber, U.F., Keck, S., Hildenbrand, B., Krug, A., et al. (2008). Key role of splenic myeloid DCs in the IFN- $\alpha$  response to adenoviruses in vivo. *PLoS Pathog.* 4, e1000208.
- Feldman, R.I., Wu, J.M., Polokoff, M.A., Kochanny, M.J., Dinter, H., Zhu, D., Biroc, S.L., Aliche, B., Bryant, J., Yuan, S., et al. (2005). Novel small molecule inhibitors of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1. *J. Biol. Chem.* 280, 19867–19874.
- Feng, Y., and Klionsky, D.J. (2017). Autophagic membrane delivery through ATG9. *Cell Res.* 27, 161–162.
- Fessler, S.P., and Young, C.S.H. (1998). Control of Adenovirus Early Gene Expression during the Late Phase of Infection. *J. Virol.* 72, 4049–4056.
- Fimia, G.M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., et al. (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 447, 1121–1125.
- Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.-M., and Maniatis, T. (2003). IKK $\epsilon$  and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4, 491–496.
- Fliss, P.M., Jowers, T.P., Brinkmann, M.M., Holstermann, B., Mack, C., Dickinson, P., Hohenberg, H., Ghazal, P., and Brune, W. (2012). Viral mediated redirection of NEMO/IKK $\gamma$  to autophagosomes curtails the inflammatory cascade. *PLoS Pathog.* 8, e1002517.
- Forster, S.C., Tate, M.D., and Hertzog, P.J. (2015). MicroRNA as Type I Interferon-Regulated Transcripts and Modulators of the Innate Immune Response. *Front. Immunol.* 6.
- Fracchiolla, D., Sawa-Makarska, J., Zens, B., Rüter, A. de, Zaffagnini, G., Brezovich, A., Romanov, J., Runggatscher, K., Kraft, C., Zagrovic, B., et al. (2016). Mechanism of cargo-directed Atg8 conjugation during selective autophagy. *ELife* 5.
- Friedman, J.M., and Horwitz, M.S. (2002). Inhibition of tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation by the adenovirus E3-10.4/14.5K complex. *J. Virol.* 76, 5515–5521.
- Friedman, C.S., O'Donnell, M.A., Legarda-Addison, D., Ng, A., Cárdenas, W.B., Yount, J.S., Moran, T.M., Basler, C.F., Komuro, A., Horvath, C.M., et al. (2008). The tumour suppressor CYLD is a negative regulator of RIG-I-mediated antiviral response. *EMBO Rep.* 9, 930–936.

- Fu, Y.-Z., Su, S., Gao, Y.-Q., Wang, P.-P., Huang, Z.-F., Hu, M.-M., Luo, W.-W., Li, S., Luo, M.-H., Wang, Y.-Y., et al. (2017). Human Cytomegalovirus Tegument Protein UL82 Inhibits STING-Mediated Signaling to Evade Antiviral Immunity. *Cell Host Microbe* 21, 231–243.
- Fuchs, S.Y. (2013). Hope and fear for interferon: the receptor-centric outlook on the future of interferon therapy. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 33, 211–225.
- Fujita, F., Taniguchi, Y., Kato, T., Narita, Y., Furuya, A., Ogawa, T., Sakurai, H., Joh, T., Itoh, M., Delhase, M., et al. (2003). Identification of NAP1, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7780–7793.
- Furcinitti, P.S., van Oostrum, J., and Burnett, R.M. (1989). Adenovirus polypeptide IX revealed as capsid cement by difference images from electron microscopy and crystallography. *EMBO J.* 8, 3563–3570.
- Gaggar, A., Shayakhmetov, D.M., and Lieber, A. (2003). CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat. Med.* 9, 1408–1412.
- Ganapathi, L., Arnold, A., Jones, S., Patterson, A., Graham, D., Harper, M., and Levy, O. (2016). Use of cidofovir in pediatric patients with adenovirus infection. *F1000Research* 5, 758.
- Gannagé, M., Schmid, D., Albrecht, R., Dengjel, J., Torossi, T., Rämer, P.C., Lee, M., Strowig, T., Arrey, F., Conenello, G., et al. (2009). Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe* 6, 367–380.
- Garber, K. (2006). China Approves World's First Oncolytic Virus Therapy For Cancer Treatment. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 98, 298–300.
- García-Sastre, A. (2017). Ten Strategies of Interferon Evasion by Viruses. *Cell Host Microbe* 22, 176–184.
- Garnett, C.T., Erdman, D., Xu, W., and Gooding, L.R. (2002). Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. *J. Virol.* 76, 10608–10616.
- Gastaldelli, M., Imelli, N., Boucke, K., Amstutz, B., Meier, O., and Greber, U.F. (2008). Infectious adenovirus type 2 transport through early but not late endosomes. *Traffic Cph. Den.* 9, 2265–2278.
- Génin, P., Cuvelier, F., Lambin, S., Côte-Real Filipe, J., Autrusseau, E., Laurent, C., Laplantine, E., and Weil, R. (2015). Optineurin regulates the interferon response in a cell cycle-dependent manner. *PLoS Pathog.* 11, e1004877.
- Geoffroy, M.-C., and Chelbi-Alix, M.K. (2011). Role of promyelocytic leukemia protein in host antiviral defense. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 31, 145–158.
- Gilmore, T.D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25, 6680–6684.
- Ginn, S.L., Amaya, A.K., Alexander, I.E., Edelstein, M., and Abedi, M.R. (2018). Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J. Gene Med.* 20, e3015.
- Gleason, C.E., Ordureau, A., Gourlay, R., Arthur, J.S.C., and Cohen, P. (2011). Polyubiquitin Binding to Optineurin Is Required for Optimal Activation of TANK-binding Kinase 1 and Production of Interferon  $\beta$ . *J. Biol. Chem.* 286, 35663–35674.
- Glick, D., Barth, S., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 221, 3–12.

- Gomes, L.C., and Dikic, I. (2014). Autophagy in antimicrobial immunity. *Mol. Cell* 54, 224–233.
- Goncalves, A., Bürckstümmer, T., Dixit, E., Scheicher, R., Górná, M.W., Karayel, E., Sugar, C., Stukalov, A., Berg, T., Kralovics, R., et al. (2011). Functional Dissection of the TBK1 Molecular Network. *PLOS ONE* 6, e23971.
- Goodfellow, I. (2011). The genome-linked protein VPg of vertebrate viruses - a multifaceted protein. *Curr. Opin. Virol.* 1, 355–362.
- Gorman, J.J., Wallis, T.P., Whelan, D.A., Shaw, J., and Both, G.W. (2005). LH3, a “homologue” of the mastadenoviral E1B 55-kDa protein is a structural protein of atadenoviruses. *Virology* 342, 159–166.
- Gough, N.R. (2014). Autophagy Limits Innate Immune Signaling. *Sci Signal* 7, ec267–ec267.
- Graff, J.W., Ewen, J., Ettayebi, K., and Hardy, M.E. (2007). Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. *J. Gen. Virol.* 88, 613–620.
- Greber, U.F., Webster, P., Weber, J., and Helenius, A. (1996). The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO J.* 15, 1766–1777.
- Green, M., Wold, W.S., Mackey, J.K., and Rigden, P. (1979). Analysis of human tonsil and cancer DNAs and RNAs for DNA sequences of group C (serotypes 1, 2, 5, and 6) human adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 6606–6610.
- Grumati, P., and Dikic, I. (2018). Ubiquitin signaling and autophagy. *J. Biol. Chem.* 293, 5404–5413.
- Gu, W., Gallagher, G.R., Dai, W., Liu, P., Li, R., Trombly, M.I., Gammon, D.B., Mello, C.C., Wang, J.P., and Finberg, R.W. (2015). Influenza A virus preferentially snatches noncoding RNA caps. *RNA* 21, 2067–2075.
- Gupta, S., Mangel, W.F., McGrath, W.J., Perek, J.L., Lee, D.W., Takamoto, K., and Chance, M.R. (2004). DNA binding provides a molecular strap activating the adenovirus proteinase. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 3, 950–959.
- Gustin, K.E., and Imperiale, M.J. (1998). Encapsidation of viral DNA requires the adenovirus L1 52/55-kilodalton protein. *J. Virol.* 72, 7860–7870.
- Gutierrez, M.G., Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I., and Deretic, V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 119, 753–766.
- Gyurcsik, B., Haruki, H., Takahashi, T., Mihara, H., and Nagata, K. (2006). Binding modes of the precursor of adenovirus major core protein VII to DNA and template activating factor I: implication for the mechanism of remodeling of the adenovirus chromatin. *Biochemistry* 45, 303–313.
- Häcker, H., and Karin, M. (2006). Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2006, re13.
- Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K., and Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141, 656–667.
- Hall, J.C., and Rosen, A. (2010). Type I interferons: crucial participants in disease amplification in autoimmunity. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6, 40–49.

- Hansen, K., Prabakaran, T., Laustsen, A., Jørgensen, S.E., Rahbæk, S.H., Jensen, S.B., Nielsen, R., Leber, J.H., Decker, T., Horan, K.A., et al. (2014). *Listeria monocytogenes* induces IFN $\beta$  expression through an IFI16-, cGAS- and STING-dependent pathway. *EMBO J.* 33, 1654–1666.
- Hao, Y.-H., Doyle, J.M., Ramanathan, S., Gomez, T.S., Jia, D., Xu, M., Chen, Z.J., Billadeau, D.D., Rosen, M.K., and Potts, P.R. (2013). Regulation of WASH-dependent actin polymerization and protein trafficking by ubiquitination. *Cell* 152, 1051–1064.
- Hare, D., and Mossman, K.L. (2013). Novel paradigms of innate immune sensing of viral infections. *Cytokine* 63, 219–224.
- Hare, D.N., Collins, S.E., Mukherjee, S., Loo, Y.-M., Gale, M., Janssen, L.J., and Mossman, K.L. (2015). Membrane Perturbation-Associated Ca<sup>2+</sup> Signaling and Incoming Genome Sensing Are Required for the Host Response to Low-Level Enveloped Virus Particle Entry. *J. Virol.* 90, 3018–3027.
- Harrach, B. (2014). *Adenoviruses: General Features* ☆. (Elsevier), p.
- Haruki, H., Okuwaki, M., Miyagishi, M., Taira, K., and Nagata, K. (2006). Involvement of template-activating factor I/SET in transcription of adenovirus early genes as a positive-acting factor. *J. Virol.* 80, 794–801.
- Hasan, M., Dobbs, N., Khan, S., White, M.A., Wakeland, E.K., Li, Q.-Z., and Yan, N. (2015). Cutting Edge: Inhibiting TBK1 by Compound II Ameliorates Autoimmune Disease in Mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 195, 4573–4577.
- Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18, 1926–1945.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18, 2195–2224.
- Hayden, M.S., West, A.P., and Ghosh, S. (2006). NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25, 6758–6780.
- Helgason, E., Phung, Q.T., and Dueber, E.C. (2013). Recent insights into the complexity of Tank-binding kinase 1 signaling networks: the emerging role of cellular localization in the activation and substrate specificity of TBK1. *FEBS Lett.* 587, 1230–1237.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740–745.
- Hendrix, R.M., Lindner, J.L., Benton, F.R., Monteith, S.C., Tuchscherer, M.A., Gray, G.C., and Gaydos, J.C. (1999). Large, persistent epidemic of adenovirus type 4-associated acute respiratory disease in U.S. army trainees. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 798–801.
- Hierholzer, J.C. (1992). Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 262–274.
- Hilleman, M.R., and Werner, J.H. (1954). Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 85, 183–188.
- Hindley, C.E., Lawrence, F.J., and Matthews, D.A. (2007). A role for transportin in the nuclear import of adenovirus core proteins and DNA. *Traffic Cph. Den.* 8, 1313–1322.
- Ho, M., and Köhler, K. (1967). Studies on human adenoviruses as inducers of interferon in chick cells. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 22, 69–78.

- Hommel, D.W., Peppelenbosch, M.P., and Deventer, S.J.H. van (2003). Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* 52, 144–151.
- Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., and Taniguchi, T. (2005). Spatiotemporal regulation of MyD88–IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* 434, 1035–1040.
- Honda, K., Takaoka, A., and Taniguchi, T. (2006). Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* 25, 349–360.
- Hong, S.S., Szolajski, E., Schoehn, G., Franqueville, L., Myhre, S., Lindholm, L., Ruigrok, R.W.H., Boulanger, P., and Chroboczek, J. (2005). The 100K-chaperone protein from adenovirus serotype 2 (Subgroup C) assists in trimerization and nuclear localization of hexons from subgroups C and B adenoviruses. *J. Mol. Biol.* 352, 125–138.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.-K., Schlee, M., et al. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314, 994–997.
- Hornung, V., Barchet, W., Schlee, M., and Hartmann, G. (2008). RNA recognition via TLR7 and TLR8. *Handb. Exp. Pharmacol.* 71–86.
- Horvath, J., Palkonyay, L., and Weber, J. (1986). Group C adenovirus DNA sequences in human lymphoid cells. *J. Virol.* 59, 189–192.
- Hoshino, K., Sugiyama, T., Matsumoto, M., Tanaka, T., Saito, M., Hemmi, H., Ohara, O., Akira, S., and Kaisho, T. (2006). IkappaB kinase-alpha is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature* 440, 949–953.
- Hou, F., Sun, L., Zheng, H., Skaug, B., Jiang, Q.-X., and Chen, Z.J. (2011). MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* 146, 448–461.
- Huett, A., Heath, R.J., Begun, J., Sassi, S.O., Baxt, L.A., Vyas, J.M., Goldberg, M.B., and Xavier, R.J. (2012). The LRR and RING domain protein LRSAM1 is an E3 ligase crucial for ubiquitin-dependent autophagy of intracellular *Salmonella Typhimurium*. *Cell Host Microbe* 12, 778–790.
- Humar, A., Kumar, D., Mazzulli, T., Razonable, R.R., Moussa, G., Paya, C.V., Covington, E., Alecock, E., Pescovitz, M.D., and PV16000 Study Group (2005). A surveillance study of adenovirus infection in adult solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5, 2555–2559.
- Ichimura, Y., Imamura, Y., Emoto, K., Umeda, M., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2004). In vivo and in vitro reconstitution of Atg8 conjugation essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* 279, 40584–40592.
- Ikeda, K., and Inoue, S. (2013). TRIM PROTEINS AS RING FINGER E3 UBIQUITIN LIGASES (Landes Bioscience).
- Imperiale, M.J. (2008). Keeping adenovirus away from the liver. *Cell Host Microbe* 3, 119–120.
- Inomata, M., Niida, S., Shibata, K., and Into, T. (2012). Regulation of Toll-like receptor signaling by NDP52-mediated selective autophagy is normally inactivated by A20. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 69, 963–979.
- Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 147, 258–267.

- Ishikawa, H., and Barber, G.N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* *455*, 674–678.
- Ishikawa, H., Ma, Z., and Barber, G.N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* *461*, 788–792.
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., and Mizushima, N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* *151*, 1256–1269.
- Ivashkiv, L.B., and Donlin, L.T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 36–49.
- Izaguirre, A., Barnes, B.J., Amrute, S., Yeow, W.-S., Megjugorac, N., Dai, J., Feng, D., Chung, E., Pitha, P.M., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (2003). Comparative analysis of IRF and IFN- $\alpha$  expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* *74*, 1125–1138.
- Jäger, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., and Eskelinen, E.-L. (2004). Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J. Cell Sci.* *117*, 4837–4848.
- Jaishankar, D., Yakoub, A.M., Yadavalli, T., Agelidis, A., Thakkar, N., Hadigal, S., Ames, J., and Shukla, D. (2018). An off-target effect of BX795 blocks herpes simplex virus type 1 infection of the eye. *Sci. Transl. Med.* *10*.
- Jia, J., Abudu, Y.P., Claude-Taupin, A., Gu, Y., Kumar, S., Choi, S.W., Peters, R., Mudd, M.H., Allers, L., Salemi, M., et al. (2018). Galectins Control mTOR in Response to Endomembrane Damage. *Mol. Cell* *70*, 120-135.e8.
- Jiang, R., Ye, J., Zhu, B., Song, Y., Chen, H., and Cao, S. (2014). Roles of TLR3 and RIG-I in Mediating the Inflammatory Response in Mouse Microglia following Japanese Encephalitis Virus Infection.
- Jiang, Z., Ninomiya-Tsuji, J., Qian, Y., Matsumoto, K., and Li, X. (2002). Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 7158–7167.
- Jo, E.-K., Yuk, J.-M., Shin, D.-M., and Sasakawa, C. (2013). Roles of autophagy in elimination of intracellular bacterial pathogens. *Front. Immunol.* *4*, 97.
- Jones, R.G. (2009). The roles, mechanisms, and controversies of autophagy in mammalian biology. *F1000 Biol. Rep.* *1*, 68.
- de Jong, R.N., Meijer, L. a. T., and van der Vliet, P.C. (2003). DNA binding properties of the adenovirus DNA replication priming protein pTP. *Nucleic Acids Res.* *31*, 3274–3286.
- Joo, C.H., Shin, Y.C., Gack, M., Wu, L., Levy, D., and Jung, J.U. (2007). Inhibition of interferon regulatory factor 7 (IRF7)-mediated interferon signal transduction by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral IRF homolog vIRF3. *J. Virol.* *81*, 8282–8292.
- Joubert, P.-E., Meiffren, G., Grégoire, I.P., Pontini, G., Richetta, C., Flacher, M., Azocar, O., Vidalain, P.-O., Vidal, M., Lotteau, V., et al. (2009). Autophagy induction by the pathogen receptor CD46. *Cell Host Microbe* *6*, 354–366.
- Jounai, N., Takeshita, F., Kobiyama, K., Sawano, A., Miyawaki, A., Xin, K.-Q., Ishii, K.J., Kawai, T., Akira, S., Suzuki, K., et al. (2007). The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 14050–14055.

- Judith, D., Mostowy, S., Bourai, M., Gangneux, N., Lelek, M., Lucas-Hourani, M., Cayet, N., Jacob, Y., Prévost, M.-C., Pierre, P., et al. (2013). Species-specific impact of the autophagy machinery on Chikungunya virus infection. *EMBO Rep.* *14*, 534–544.
- Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1992–2003.
- Kanayama, M., and Shinohara, M.L. (2016). Roles of Autophagy and Autophagy-Related Proteins in Antifungal Immunity. *Front. Immunol.* *7*.
- Kanneganti, T.-D. (2010). Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 688–698.
- Karanasios, E., Stapleton, E., Manifava, M., Kaizuka, T., Mizushima, N., Walker, S.A., and Ktistakis, N.T. (2013). Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J. Cell Sci.* *126*, 5224–5238.
- Karanasios, E., Walker, S.A., Okkenhaug, H., Manifava, M., Hummel, E., Zimmermann, H., Ahmed, Q., Domart, M.-C., Collinson, L., and Ktistakis, N.T. (2016). Autophagy initiation by ULK complex assembly on ER tubulovesicular regions marked by ATG9 vesicles. *Nat. Commun.* *7*, 12420.
- Karen, K.A., and Hearing, P. (2011). Adenovirus core protein VII protects the viral genome from a DNA damage response at early times after infection. *J. Virol.* *85*, 4135–4142.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* *441*, 101–105.
- Kawai, T., and Akira, S. (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* *13*, 460–469.
- Kawasaki, T., and Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.* *5*.
- Kayagaki, N., Phung, Q., Chan, S., Chaudhari, R., Quan, C., O'Rourke, K.M., Eby, M., Pietras, E., Cheng, G., Bazan, J.F., et al. (2007). DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production. *Science* *318*, 1628–1632.
- Khanal, S., Ghimire, P., and Dhamoon, A.S. (2018). The Repertoire of Adenovirus in Human Disease: The Innocuous to the Deadly. *Biomedicines* *6*.
- Kim, J., and Guan, K.-L. (2011). Regulation of the autophagy initiating kinase ULK1 by nutrients: roles of mTORC1 and AMPK. *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 1337–1338.
- Kim, J.Y., and Ozato, K. (2009). The sequestosome 1/p62 attenuates cytokine gene expression in activated macrophages by inhibiting IFN regulatory factor 8 and TNF receptor-associated factor 6/NF-kappaB activity. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *182*, 2131–2140.
- Kim, B.-W., Hong, S.B., Kim, J.H., Kwon, D.H., and Song, H.K. (2013). Structural basis for recognition of autophagic receptor NDP52 by the sugar receptor galectin-8. *Nat. Commun.* *4*, 1613.
- Kim, J., Dalton, V.M., Eggerton, K.P., Scott, S.V., and Klionsky, D.J. (1999). Apg7p/Cvt2p Is Required for the Cytoplasm-to-Vacuole Targeting, Macroautophagy, and Peroxisome Degradation Pathways. *Mol. Biol. Cell* *10*, 1337–1351.

- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* *13*, 132–141.
- Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct. Funct.* *33*, 109–122.
- Kimura, T., Jain, A., Choi, S.W., Mandell, M.A., Schroder, K., Johansen, T., and Deretic, V. (2015). TRIM-mediated precision autophagy targets cytoplasmic regulators of innate immunity. *J. Cell Biol.* *210*, 973–989.
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.* *151*, 263–276.
- Kishore, N., Huynh, Q.K., Mathialagan, S., Hall, T., Rouw, S., Creely, D., Lange, G., Carroll, J., Reitz, B., Donnelly, A., et al. (2002). IKK-i and TBK-1 are enzymatically distinct from the homologous enzyme IKK-2: comparative analysis of recombinant human IKK-i, TBK-1, and IKK-2. *J. Biol. Chem.* *277*, 13840–13847.
- Klein, S.R., Jiang, H., Hossain, M.B., Fan, X., Gumin, J., Dong, A., Alonso, M.M., Gomez-Manzano, C., and Fueyo, J. (2016). Critical Role of Autophagy in the Processing of Adenovirus Capsid-Incorporated Cancer-Specific Antigens. *PloS One* *11*, e0153814.
- Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., et al. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell* *5*, 539–545.
- 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., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* *12*, 1–222.
- Knorr, R.L., Lipowsky, R., and Dimova, R. (2015). Autophagosome closure requires membrane scission. *Autophagy* *11*, 2134–2137.
- Kohler, L.J., and Roy, C.R. (2017). Autophagic targeting and avoidance in intracellular bacterial infections. *Curr. Opin. Microbiol.* *35*, 36–41.
- Kojaoghlanian, T., Flomenberg, P., and Horwitz, M.S. (2003). The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev. Med. Virol.* *13*, 155–171.
- Kollewe, C., Mackensen, A.-C., Neumann, D., Knop, J., Cao, P., Li, S., Wesche, H., and Martin, M.U. (2004). Sequential autophosphorylation steps in the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 regulate its availability as an adapter in interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.* *279*, 5227–5236.
- Komatsu, T., Haruki, H., and Nagata, K. (2011). Cellular and viral chromatin proteins are positive factors in the regulation of adenovirus gene expression. *Nucleic Acids Res.* *39*, 889–901.
- Komatsu, T., Dacheux, D., Kreppel, F., Nagata, K., and Wodrich, H. (2015). A Method for Visualization of Incoming Adenovirus Chromatin Complexes in Fixed and Living Cells. *PloS One* *10*, e0137102.
- Komatsu, T., Will, H., Nagata, K., and Wodrich, H. (2016). Imaging analysis of nuclear antiviral factors through direct detection of incoming adenovirus genome complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *473*, 200–205.

- Konno, H., Konno, K., and Barber, G.N. (2013). Cyclic dinucleotides trigger ULK1 (ATG1) phosphorylation of STING to prevent sustained innate immune signaling. *Cell* *155*, 688–698.
- Korolchuk, V.I., and Rubinsztein, D.C. (2011). Regulation of autophagy by lysosomal positioning. *Autophagy* *7*, 927–928.
- Kowalinski, E., Lunardi, T., McCarthy, A.A., Louber, J., Brunel, J., Grigorov, B., Gerlier, D., and Cusack, S. (2011). Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell* *147*, 423–435.
- Kremer, E.J., and Nemerow, G.R. (2015). Adenovirus tales: from the cell surface to the nuclear pore complex. *PLoS Pathog.* *11*, e1004821.
- Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., Walsh, E.E., Freeman, M.W., Golenbock, D.T., Anderson, L.J., et al. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* *1*, 398–401.
- Kurt-Jones, E.A., Chan, M., Zhou, S., Wang, J., Reed, G., Bronson, R., Arnold, M.M., Knipe, D.M., and Finberg, R.W. (2004). Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 1315–1320.
- Kuznetsov, S.A., and Gelfand, V.I. (1987). 18 kDa microtubule-associated protein: identification as a new light chain (LC-3) of microtubule-associated protein 1 (MAP-1). *FEBS Lett.* *212*, 145–148.
- Kwon, D.H., and Song, H.K. (2018). A Structural View of Xenophagy, a Battle between Host and Microbes. *Mol. Cells* *41*, 27–34.
- Kyei, G.B., Dinkins, C., Davis, A.S., Roberts, E., Singh, S.B., Dong, C., Wu, L., Kominami, E., Ueno, T., Yamamoto, A., et al. (2009). Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J. Cell Biol.* *186*, 255–268.
- Lam, E., and Falck-Pedersen, E. (2014). Unabated Adenovirus Replication following Activation of the cGAS/STING-Dependent Antiviral Response in Human Cells. *J. Virol.* *88*, 14426–14439.
- Lam, E., Stein, S., and Falck-Pedersen, E. (2014). Adenovirus detection by the cGAS/STING/TBK1 DNA sensing cascade. *J. Virol.* *88*, 974–981.
- Lamark, T., Perander, M., Outzen, H., Kristiansen, K., Øvervatn, A., Michaelsen, E., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2003). Interaction codes within the family of mammalian Phox and Bem1p domain-containing proteins. *J. Biol. Chem.* *278*, 34568–34581.
- Lamb, C.A., Yoshimori, T., and Tooze, S.A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 759–774.
- Lamkanfi, M. (2011). Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 213–220.
- Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* *157*, 1013–1022.
- Larabi, A., Devos, J.M., Ng, S.-L., Nanao, M.H., Round, A., Maniatis, T., and Panne, D. (2013). Crystal structure and mechanism of activation of TANK-binding kinase 1. *Cell Rep.* *3*, 734–746.
- Laredj, L.N., and Beard, P. (2011). Adeno-associated virus activates an innate immune response in normal human cells but not in osteosarcoma cells. *J. Virol.* *85*, 13133–13143.

- Latré de Laté, P., Pineda, M., Harnett, M., Harnett, W., Besteiro, S., and Langsley, G. (2017). Apicomplexan autophagy and modulation of autophagy in parasite-infected host cells. *Biomed. J.* *40*, 23–30.
- Latz, E., Xiao, T.S., and Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 397–411.
- Lau, L., Gray, E.E., Brunette, R.L., and Stetson, D.B. (2015). DNA tumor virus oncogenes antagonize the cGAS-STING DNA-sensing pathway. *Science* *350*, 568–571.
- Launer-Felty, K., and Cole, J.L. (2014). Domain interactions in Adenovirus VAI RNA mediate high affinity PKR binding. *J. Mol. Biol.* *426*, 1285–1295.
- Lazear, H.M., Nice, T.J., and Diamond, M.S. (2015). Interferon- $\lambda$ : immune functions at barrier surfaces and beyond. *Immunity* *43*, 15–28.
- Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., and Tough, D.F. (2003). Cross-priming of CD8<sup>+</sup> T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat. Immunol.* *4*, 1009–1015.
- Lee, G.C., Yi, H.A., and Lee, C.H. (2006). Stimulation of interferon-beta gene expression by human cytomegalovirus via nuclear factor kappa B and phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Virus Res.* *117*, 209–214.
- Lee, H.K., Lund, J.M., Ramanathan, B., Mizushima, N., and Iwasaki, A. (2007). Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* *315*, 1398–1401.
- 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., et al. (2009). FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1355–1362.
- Leen, A.M., and Rooney, C.M. (2005). Adenovirus as an emerging pathogen in immunocompromised patients. *Br. J. Haematol.* *128*, 135–144.
- Leen, A.M., Sili, U., Vanin, E.F., Jewell, A.M., Xie, W., Vignali, D., Piedra, P.A., Brenner, M.K., and Rooney, C.M. (2004). Conserved CTL epitopes on the adenovirus hexon protein expand subgroup cross-reactive and subgroup-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* *104*, 2432–2440.
- Lenaerts, L., and Naesens, L. (2006). Antiviral therapy for adenovirus infections. *Antiviral Res.* *71*, 172–180.
- Lenman, A., Liaci, A.M., Liu, Y., Årdahl, C., Rajan, A., Nilsson, E., Bradford, W., Kaeshammer, L., Jones, M.S., Frångsmyr, L., et al. (2015). Human adenovirus 52 uses sialic acid-containing glycoproteins and the coxsackie and adenovirus receptor for binding to target cells. *PLoS Pathog.* *11*, e1004657.
- Leonard, G.T., and Sen, G.C. (1996). Effects of adenovirus E1A protein on interferon-signaling. *Virology* *224*, 25–33.
- Leyva-Paredes, K., Castrejón-Jiménez, N.S., IvánArrieta-Oliva, H., and EstelaGarcía-Pérez, S.L.B.-U. and B. (2016). Choosing Lunch: The Role of Selective Autophagy Adaptor Proteins. *Autophagy Curr. Trends Cell. Physiol. Pathol.*
- Li, K., Foy, E., Ferreón, J.C., Nakamura, M., Ferreón, A.C.M., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale, M., and Lemon, S.M. (2005a). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 2992–2997.

- Li, S., Wang, L., Berman, M., Kong, Y.-Y., and Dorf, M.E. (2011). Mapping a dynamic innate immunity protein interaction network regulating type I interferon production. *Immunity* 35, 426–440.
- Li, X., Shu, C., Yi, G., Chaton, C.T., Shelton, C.L., Diao, J., Zuo, X., Kao, C.C., Herr, A.B., and Li, P. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is activated by double-stranded DNA-induced oligomerization. *Immunity* 39, 1019–1031.
- Li, X., Yang, M., Yu, Z., Tang, S., Wang, L., Cao, X., and Chen, T. (2017). The tyrosine kinase Src promotes phosphorylation of the kinase TBK1 to facilitate type I interferon production after viral infection. *Sci Signal* 10, ea435.
- Li, X.-D., Sun, L., Seth, R.B., Pineda, G., and Chen, Z.J. (2005b). Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17717–17722.
- Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B.-H., and Jung, J.U. (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell Biol.* 8, 688–699.
- Liang, C., Lee, J., Inn, K., Gack, M.U., Li, Q., Roberts, E.A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., et al. (2008). Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat. Cell Biol.* 10, 776–787.
- Liang, Q., Chang, B., Brulois, K.F., Castro, K., Min, C.-K., Rodgers, M.A., Shi, M., Ge, J., Feng, P., Oh, B.-H., et al. (2013). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus K7 Modulates Rubicon-Mediated Inhibition of Autophagosome Maturation. *J. Virol.* 87, 12499–12503.
- 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., et al. (2014). Crosstalk between the cGAS DNA sensor and Beclin-1 autophagy protein shapes innate antimicrobial immune responses. *Cell Host Microbe* 15, 228–238.
- Liang, X.H., Kleeman, L.K., Jiang, H.H., Gordon, G., Goldman, J.E., Berry, G., Herman, B., and Levine, B. (1998). Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J. Virol.* 72, 8586–8596.
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402, 672–676.
- Lin, R.-J., Chang, B.-L., Yu, H.-P., Liao, C.-L., and Lin, Y.-L. (2006). Blocking of interferon-induced Jak-Stat signaling by Japanese encephalitis virus NS5 through a protein tyrosine phosphatase-mediated mechanism. *J. Virol.* 80, 5908–5918.
- Lin, S.-C., Lo, Y.-C., and Wu, H. (2010). Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 465, 885–890.
- Lindert, S., Silvestry, M., Mullen, T.-M., Nemerow, G.R., and Stewart, P.L. (2009). Cryo-electron microscopy structure of an adenovirus-integrin complex indicates conformational changes in both penton base and integrin. *J. Virol.* 83, 11491–11501.
- Litvak, V., Ratushny, A.V., Lampano, A.E., Schmitz, F., Huang, A.C., Raman, A., Rust, A.G., Berghaler, A., Aitchison, J.D., and Aderem, A. (2012). A FOXO3-IRF7 gene regulatory circuit limits inflammatory sequelae of antiviral responses. *Nature* 490, 421–425.
- Liu, F., Niu, Q., Fan, X., Liu, C., Zhang, J., Wei, Z., Hou, W., Kanneganti, T.-D., Robb, M.L., Kim, J.H., et al. (2017). Priming and Activation of Inflammasome by Canarypox Virus Vector ALVAC via the cGAS/IFI16-STING-Type I IFN Pathway and AIM2 Sensor. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 199, 3293–3305.

- Liu, H., Jin, L., Koh, S.B.S., Atanasov, I., Schein, S., Wu, L., and Zhou, Z.H. (2010). Atomic structure of human adenovirus by cryo-EM reveals interactions among protein networks. *Science* 329, 1038–1043.
- Liu, Q., Zaiss, A.K., Colarusso, P., Patel, K., Haljan, G., Wickham, T.J., and Muruve, D.A. (2003). The role of capsid-endothelial interactions in the innate immune response to adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* 14, 627–643.
- Liu, S., Cai, X., Wu, J., Cong, Q., Chen, X., Li, T., Du, F., Ren, J., Wu, Y.-T., Grishin, N.V., et al. (2015). Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science* 347, aaa2630.
- Liu, X., Qin, H., and Xu, J. (2016). The role of autophagy in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Int. Immunopharmacol.* 40, 351–361.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408.
- Lonberg-Holm, K., Crowell, R.L., and Philipson, L. (1976). Unrelated animal viruses share receptors. *Nature* 259, 679–681.
- Loo, Y.-M., and Gale, M. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 34, 680–692.
- Look, D.C., Roswit, W.T., Frick, A.G., Gris-Alevy, Y., Dickhaus, D.M., Walter, M.J., and Holtzman, M.J. (1998). Direct suppression of Stat1 function during adenoviral infection. *Immunity* 9, 871–880.
- Lortat-Jacob, H., Chouin, E., Cusack, S., and van Raaij, M.J. (2001). Kinetic analysis of adenovirus fiber binding to its receptor reveals an avidity mechanism for trimeric receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 276, 9009–9015.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., and Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145–151.
- Luisoni, S., Suomalainen, M., Boucke, K., Tanner, L.B., Wenk, M.R., Guan, X.L., Grzybek, M., Coskun, Ü., and Greber, U.F. (2015). Co-option of Membrane Wounding Enables Virus Penetration into Cells. *Cell Host Microbe* 18, 75–85.
- Luo, D., Ding, S.C., Vela, A., Kohlway, A., Lindenbach, B.D., and Pyle, A.M. (2011). Structural insights into RNA recognition by RIG-I. *Cell* 147, 409–422.
- Ma, H.-C., and Hearing, P. (2011). Adenovirus structural protein IIIa is involved in the serotype specificity of viral DNA packaging. *J. Virol.* 85, 7849–7855.
- Ma, X., Helgason, E., Phung, Q.T., Quan, C.L., Iyer, R.S., Lee, M.W., Bowman, K.K., Starovasnik, M.A., and Dueber, E.C. (2012). Molecular basis of Tank-binding kinase 1 activation by transautophosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 9378–9383.
- Mackey, J.K., Rigden, P.M., and Green, M. (1976). Do highly oncogenic group A human adenoviruses cause human cancer? Analysis of human tumors for adenovirus 12 transforming DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 4657–4661.
- Maier, O., Galan, D.L., Wodrich, H., and Wiethoff, C.M. (2010). An N-terminal domain of adenovirus protein VI fragments membranes by inducing positive membrane curvature. *Virology* 402, 11–19.
- Maier, O., Marvin, S.A., Wodrich, H., Campbell, E.M., and Wiethoff, C.M. (2012). Spatiotemporal dynamics of adenovirus membrane rupture and endosomal escape. *J. Virol.* 86, 10821–10828.

- Maizel, J.V., White, D.O., and Scharff, M.D. (1968). The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology* *36*, 115–125.
- Malakhova, O.A., Yan, M., Malakhov, M.P., Yuan, Y., Ritchie, K.J., Kim, K.I., Peterson, L.F., Shuai, K., and Zhang, D.-E. (2003). Protein ISGylation modulates the JAK-STAT signaling pathway. *Genes Dev.* *17*, 455–460.
- Mamane, Y., Heylbroeck, C., Génin, P., Algarté, M., Servant, M.J., LePage, C., DeLuca, C., Kwon, H., Lin, R., and Hiscott, J. (1999). Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* *237*, 1–14.
- Man, S.M., and Kanneganti, T.-D. (2015). Regulation of inflammasome activation. *Immunol. Rev.* *265*, 6–21.
- Mancino, A., and Natoli, G. (2016). Specificity and Function of IRF Family Transcription Factors: Insights from Genomics. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* *36*, 462–469.
- Mandell, M.A., Jain, A., Arko-Mensah, J., Chauhan, S., Kimura, T., Dinkins, C., Silvestri, G., Münch, J., Kirchhoff, F., Simonsen, A., et al. (2014). TRIM proteins regulate autophagy and can target autophagic substrates by direct recognition. *Dev. Cell* *30*, 394–409.
- Mangel, W.F., McGrath, W.J., Toledo, D.L., and Anderson, C.W. (1993). Viral DNA and a viral peptide can act as cofactors of adenovirus virion proteinase activity. *Nature* *361*, 274–275.
- Mangel, W.F., Baniecki, M.L., and McGrath, W.J. (2003). Specific interactions of the adenovirus proteinase with the viral DNA, an 11-amino-acid viral peptide, and the cellular protein actin. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *60*, 2347–2355.
- Mankouri, J., Fragkoudis, R., Richards, K.H., Wetherill, L.F., Harris, M., Kohl, A., Elliott, R.M., and Macdonald, A. (2010). Optineurin negatively regulates the induction of IFN $\beta$  in response to RNA virus infection. *PLoS Pathog.* *6*, e1000778.
- Manzanillo, P.S., Ayres, J.S., Watson, R.O., Collins, A.C., Souza, G., Rae, C.S., Schneider, D.S., Nakamura, K., Shiloh, M.U., and Cox, J.S. (2013). The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. *Nature* *501*, 512–516.
- Mao, K., and Klionsky, D.J. (2011). AMPK Activates Autophagy by Phosphorylating ULK1. *Circ. Res.* *108*, 787–788.
- Martens, S. (2016). No ATG8s, no problem? How LC3/GABARAP proteins contribute to autophagy. *J Cell Biol* jcb.201611116.
- Martinez, R., Burrage, A.M., Wiethoff, C.M., and Wodrich, H. (2013). High temporal resolution imaging reveals endosomal membrane penetration and escape of adenoviruses in real time. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1064*, 211–226.
- Martinez, R., Schellenberger, P., Vasishtan, D., Akin, C., Austin, S., Dacheux, D., Rayne, F., Siebert, A., Ruzsics, Z., Gruenewald, K., et al. (2015). The amphipathic helix of adenovirus capsid protein VI contributes to penton release and postentry sorting. *J. Virol.* *89*, 2121–2135.
- Martín-Vicente, M., Medrano, L.M., Resino, S., García-Sastre, A., and Martínez, I. (2017). TRIM25 in the Regulation of the Antiviral Innate Immunity. *Front. Immunol.* *8*, 1187.

- Marttila, M., Persson, D., Gustafsson, D., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P., Wadell, G., and Arnberg, N. (2005). CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. *J. Virol.* *79*, 14429–14436.
- Matsumoto, G., Shimogori, T., Hattori, N., and Nukina, N. (2015). TBK1 controls autophagosomal engulfment of polyubiquitinated mitochondria through p62/SQSTM1 phosphorylation. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 4429–4442.
- Matsunaga, K., Morita, E., Saitoh, T., Akira, S., Ktistakis, N.T., Izumi, T., Noda, T., and Yoshimori, T. (2010). Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J. Cell Biol.* *190*, 511–521.
- Matsushita, K., Takeuchi, O., Standley, D.M., Kumagai, Y., Kawagoe, T., Miyake, T., Satoh, T., Kato, H., Tsujimura, T., Nakamura, H., et al. (2009). Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature* *458*, 1185–1190.
- McGrath, W.J., Ding, J., Didwania, A., Sweet, R.M., and Mangel, W.F. (2003). Crystallographic structure at 1.6-Å resolution of the human adenovirus proteinase in a covalent complex with its 11-amino-acid peptide cofactor: insights on a new fold. *Biochim. Biophys. Acta* *1648*, 1–11.
- McWhirter, S.M., Fitzgerald, K.A., Rosains, J., Rowe, D.C., Golenbock, D.T., and Maniatis, T. (2004). IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 233–238.
- Meiffren, G., Joubert, P.-E., Grégoire, I.P., Codogno, P., Roubourdin-Combe, C., and Faure, M. (2010). Pathogen recognition by the cell surface receptor CD46 induces autophagy. *Autophagy* *6*, 299–300.
- Metlagel, Z., Otomo, C., Ohashi, K., Takaesu, G., and Otomo, T. (2014). Structural insights into E2-E3 interaction for LC3 lipidation. *Autophagy* *10*, 522–523.
- Mihaylova, M.M., and Shaw, R.J. (2011). The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, & metabolism. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1016–1023.
- Mijaljica, D., Prescott, M., and Devenish, R.J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* *7*, 673–682.
- Miller, S., and Krijnse-Locker, J. (2008). Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 363–374.
- Miller, D.M., Rahill, B.M., Boss, J.M., Lairmore, M.D., Durbin, J.E., Waldman, J.W., and Sedmak, D.D. (1998). Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *J. Exp. Med.* *187*, 675–683.
- Mistchenko, A.S., Diez, R.A., Mariani, A.L., Robaldo, J., Maffey, A.F., Bayley-Bustamante, G., and Grinstein, S. (1994). Cytokines in adenoviral disease in children: association of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor alpha levels with clinical outcome. *J. Pediatr.* *124*, 714–720.
- Mitchell, G., Cheng, M.I., Chen, C., Nguyen, B.N., Whiteley, A.T., Kianian, S., Cox, J.S., Green, D.R., McDonald, K.L., and Portnoy, D.A. (2018). *Listeria monocytogenes* triggers noncanonical autophagy upon phagocytosis, but avoids subsequent growth-restricting xenophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, E210–E217.
- Mittereder, N., March, K.L., and Trapnell, B.C. (1996). Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J. Virol.* *70*, 7498–7509.

- Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T., and Taniguchi, T. (1988). Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell* 54, 903–913.
- Mizushima, N. (2009). Physiological functions of autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 335, 71–84.
- Mohamud, Y., Qu, J., Xue, Y.C., Liu, H., Deng, H., and Luo, H. (2018). CALCOCO2/NDP52 and SQSTM1/p62 differentially regulate coxsackievirus B3 propagation. *Cell Death Differ.*
- Molinier-Frenkel, V., and Boulanger, P. (2003). Les adénovirus : de la structure à la vectorisation de gènes et à la vaccinologie. I. Virologie des adénovirus et des adénovirus recombinants. *Virologie* 7, 267–279.
- Momper, J.D., Zhao, Y., Shapiro, R., Schonder, K.S., Yao, G., Randhawa, P.S., and Venkataramanan, R. (2013). Pharmacokinetics of low-dose cidofovir in kidney transplant recipients with BK virus infection. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* 15.
- Montespan, C., Marvin, S.A., Austin, S., Burrage, A.M., Roger, B., Rayne, F., Faure, M., Campell, E.M., Schneider, C., Reimer, R., et al. (2017). Multi-layered control of Galectin-8 mediated autophagy during adenovirus cell entry through a conserved PPxY motif in the viral capsid. *PLoS Pathog.* 13, e1006217.
- Montespan, C., Wiethoff, C.M., and Wodrich, H. (2017). A Small Viral PPxY Peptide Motif To Control Antiviral Autophagy. *J. Virol.* 91.
- Mori, M., Yoneyama, M., Ito, T., Takahashi, K., Inagaki, F., and Fujita, T. (2004). Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J. Biol. Chem.* 279, 9698–9702.
- Moscat, J., and Diaz-Meco, M.T. (2009). p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell* 137, 1001–1004.
- Münz, C. (2011). Beclin-1 targeting for viral immune escape. *Viruses* 3, 1166–1178.
- Münz, C. (2016). Autophagy Beyond Intracellular MHC Class II Antigen Presentation. *Trends Immunol.* 37, 755–763.
- Muruve, D.A., Cotter, M.J., Zaiss, A.K., White, L.R., Liu, Q., Chan, T., Clark, S.A., Ross, P.J., Meulenbroek, R.A., Maelandsmo, G.M., et al. (2004). Helper-dependent adenovirus vectors elicit intact innate but attenuated adaptive host immune responses in vivo. *J. Virol.* 78, 5966–5972.
- Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., et al. (2004). Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science* 306, 1037–1040.
- Nakano, M.Y., Boucke, K., Suomalainen, M., Stidwill, R.P., and Greber, U.F. (2000). The first step of adenovirus type 2 disassembly occurs at the cell surface, independently of endocytosis and escape to the cytosol. *J. Virol.* 74, 7085–7095.
- Nakatsu, Y., Iwashita, M., Sakoda, H., Ono, H., Nagata, K., Matsunaga, Y., Fukushima, T., Fujishiro, M., Kushiya, A., Kamata, H., et al. (2015). Prolyl Isomerase Pin1 Negatively Regulates AMP-activated Protein Kinase (AMPK) by Associating with the CBS Domain in the  $\gamma$  Subunit. *J. Biol. Chem.* 290, 24255–24266.

- Nascimbeni, A.C., Codogno, P., and Morel, E. (2017). Phosphatidylinositol-3-phosphate in the regulation of autophagy membrane dynamics. *FEBS J.* 284, 1267–1278.
- Nazarko, V.Y., and Zhong, Q. (2013). ULK1 targets Beclin-1 in autophagy. *Nat. Cell Biol.* 15, 727–728.
- Nazio, F., Carinci, M., Valacca, C., Bielli, P., Strappazzon, F., Antonioli, M., Ciccocanti, F., Rodolfo, C., Campello, S., Fimia, G.M., et al. (2016). Fine-tuning of ULK1 mRNA and protein levels is required for autophagy oscillation. *J Cell Biol* jcb.201605089.
- Negishi, H., Ohba, Y., Yanai, H., Takaoka, A., Honma, K., Yui, K., Matsuyama, T., Taniguchi, T., and Honda, K. (2005). Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15989–15994.
- Negishi, H., Taniguchi, T., and Yanai, H. (2017). The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*
- Nevins, J.R. (1981). Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product. *Cell* 26, 213–220.
- Newman, A.C., Scholefield, C.L., Kemp, A.J., Newman, M., McIver, E.G., Kamal, A., and Wilkinson, S. (2012). TBK1 kinase addiction in lung cancer cells is mediated via autophagy of Tax1bp1/Ndp52 and non-canonical NF- $\kappa$ B signalling. *PloS One* 7, e50672.
- Nociari, M., Ocheretina, O., Schoggins, J.W., and Falck-Pedersen, E. (2007). Sensing Infection by Adenovirus: Toll-Like Receptor-Independent Viral DNA Recognition Signals Activation of the Interferon Regulatory Factor 3 Master Regulator. *J. Virol.* 81, 4145–4157.
- Nociari, M., Ocheretina, O., Murphy, M., and Falck-Pedersen, E. (2009). Adenovirus induction of IRF3 occurs through a binary trigger targeting Jun N-terminal kinase and TBK1 kinase cascades and type I interferon autocrine signaling. *J. Virol.* 83, 4081–4091.
- Noda, T., Fujita, N., and Yoshimori, T. (2009). The late stages of autophagy: how does the end begin? *Cell Death Differ.* 16, 984–990.
- Obara, K., Sekito, T., and Ohsumi, Y. (2006). Assortment of phosphatidylinositol 3-kinase complexes-Atg14p directs association of complex I to the pre-autophagosomal structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 17, 1527–1539.
- Odagiri, S., Tanji, K., Mori, F., Kakita, A., Takahashi, H., and Wakabayashi, K. (2012). Autophagic adapter protein NBR1 is localized in Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions and is involved in aggregate formation in  $\alpha$ -synucleinopathy. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 124, 173–186.
- Oeckinghaus, A., and Ghosh, S. (2009). The NF- $\kappa$ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1.
- Oganesyan, G., Saha, S.K., Guo, B., He, J.Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., Perry, A., and Cheng, G. (2006). Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 439, 208–211.
- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., and Sasakawa, C. (2005). Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science* 307, 727–731.
- Ohsumi, Y. (2001). Ubiquitin and proteasomes: Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 211–216.

- O'Mahony, A.M., Montano, M., Van Beneden, K., Chen, L.-F., and Greene, W.C. (2004). Human T-cell lymphotropic virus type 1 tax induction of biologically Active NF-kappaB requires IkappaB kinase-1-mediated phosphorylation of RelA/p65. *J. Biol. Chem.* *279*, 18137–18145.
- O'Neill, L.A.J., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 453–460.
- Onion, D., Crompton, L.J., Milligan, D.W., Moss, P.A.H., Lee, S.P., and Mautner, V. (2007). The CD4+ T-cell response to adenovirus is focused against conserved residues within the hexon protein. *J. Gen. Virol.* *88*, 2417–2425.
- Onoguchi, K., Yoneyama, M., and Fujita, T. (2011). Retinoic Acid-Inducible Gene-I-Like Receptors. *J. Interferon Cytokine Res.* *31*, 27–31.
- Orvedahl, A., Alexander, D., Tallóczy, Z., Sun, Q., Wei, Y., Zhang, W., Burns, D., Leib, D.A., and Levine, B. (2007). HSV-1 ICP34.5 Confers Neurovirulence by Targeting the Beclin 1 Autophagy Protein. *Cell Host Microbe* *1*, 23–35.
- Orvedahl, A., MacPherson, S., Sumpter, R., Tallóczy, Z., Zou, Z., and Levine, B. (2010). Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host Microbe* *7*, 115–127.
- Orvedahl, A., Sumpter, R., Xiao, G., Ng, A., Zou, Z., Tang, Y., Narimatsu, M., Gilpin, C., Sun, Q., Roth, M., et al. (2011). Image-based genome-wide siRNA screen identifies selective autophagy factors. *Nature* *480*, 113–117.
- Osborne, C.M., Montano, A.C., Robinson, C.C., Schultz-Cherry, S., and Dominguez, S.R. (2015). Viral gastroenteritis in children in Colorado 2006-2009. *J. Med. Virol.* *87*, 931–939.
- Ou, Y.-H., Torres, M., Ram, R., Formstecher, E., Roland, C., Cheng, T., Brekken, R., Wurz, R., Tasker, A., Polverino, T., et al. (2011). TBK1 directly engages Akt/PKB survival signaling to support oncogenic transformation. *Mol. Cell* *41*, 458–470.
- Owen, K.A., and Casanova, J.E. (2015). Salmonella Manipulates Autophagy to “Serve and Protect.” *Cell Host Microbe* *18*, 517–519.
- Pahl, J.H.W., Verhoeven, D.H.J., Kwappenberg, K.M.C., Vellinga, J., Lankester, A.C., van Tol, M.J.D., and Schilham, M.W. (2012). Adenovirus type 35, but not type 5, stimulates NK cell activation via plasmacytoid dendritic cells and TLR9 signaling. *Mol. Immunol.* *51*, 91–100.
- Paladino, P., Cummings, D.T., Noyce, R.S., and Mossman, K.L. (2006). The IFN-independent response to virus particle entry provides a first line of antiviral defense that is independent of TLRs and retinoic acid-inducible gene I. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 8008–8016.
- Palsson-McDermott, E.M., Doyle, S.L., McGettrick, A.F., Hardy, M., Husebye, H., Banahan, K., Gong, M., Golenbock, D., Espevik, T., and O'Neill, L.A.J. (2009). TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway. *Nat. Immunol.* *10*, 579–586.
- Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T., and Münz, C. (2005). Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* *307*, 593–596.
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and 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.

- Pardo-Mateos, A., and Young, C.S.H. (2004). Adenovirus IVa2 protein plays an important role in transcription from the major late promoter in vivo. *Virology* 327, 50–59.
- Parvatiyar, K., Barber, G.N., and Harhaj, E.W. (2010). TAX1BP1 and A20 inhibit antiviral signaling by targeting TBK1-IKKi kinases. *J. Biol. Chem.* 285, 14999–15009.
- Parzych, K.R., and Klionsky, D.J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 460–473.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927–939.
- Pattingre, S., Espert, L., Biard-Piechaczyk, M., and Codogno, P. (2008). Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie* 90, 313–323.
- Paulus, C., Krauss, S., and Nevels, M. (2006). A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3840–3845.
- Pérez-Berná, A.J., Marabini, R., Scheres, S.H.W., Menéndez-Conejero, R., Dmitriev, I.P., Curiel, D.T., Mangel, W.F., Flint, S.J., and San Martín, C. (2009). Structure and uncoating of immature adenovirus. *J. Mol. Biol.* 392, 547–557.
- Pérez-Vargas, J., Vaughan, R.C., Houser, C., Hastie, K.M., Kao, C.C., and Nemerow, G.R. (2014). Isolation and Characterization of the DNA and Protein Binding Activities of Adenovirus Core Protein V. *J. Virol.* 88, 9287–9296.
- Perrin, A.J., Jiang, X., Birmingham, C.L., So, N.S.Y., and Brumell, J.H. (2004). Recognition of bacteria in the cytosol of Mammalian cells by the ubiquitin system. *Curr. Biol. CB* 14, 806–811.
- Perry, A.K., Chow, E.K., Goodnough, J.B., Yeh, W.-C., and Cheng, G. (2004). Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection. *J. Exp. Med.* 199, 1651–1658.
- Persaud, A., Alberts, P., Mari, S., Tong, J., Murchie, R., Maspero, E., Safi, F., Moran, M.F., Polo, S., and Rotin, D. (2014). Tyrosine phosphorylation of NEDD4 activates its ubiquitin ligase activity. *Sci. Signal.* 7, ra95.
- Pestka, S., Krause, C.D., and Walter, M.R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* 202, 8–32.
- Petherick, K.J., Conway, O.J.L., Mpamhanga, C., Osborne, S.A., Kamal, A., Saxty, B., and Ganley, I.G. (2015). Pharmacological inhibition of ULK1 kinase blocks mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent autophagy. *J. Biol. Chem.* 290, 11376–11383.
- Pichlmair, A., and Reis e Sousa, C. (2007). Innate recognition of viruses. *Immunity* 27, 370–383.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Näslund, T.I., Liljeström, P., Weber, F., and Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314, 997–1001.
- Pillai, S., Nguyen, J., Johnson, J., Haura, E., Coppola, D., and Chellappan, S. (2015). Tank binding kinase 1 is a centrosome-associated kinase necessary for microtubule dynamics and mitosis. *Nat. Commun.* 6, 10072.

- Pilli, M., Arko-Mensah, J., Ponpuak, M., Roberts, E., Master, S., Mandell, M.A., Dupont, N., Ornatowski, W., Jiang, S., Bradfute, S.B., et al. (2012). TBK-1 promotes autophagy-mediated antimicrobial defense by controlling autophagosome maturation. *Immunity* 37, 223–234.
- Platta, H.W., Abrahamsen, H., Thoresen, S.B., and Stenmark, H. (2012). Nedd4-dependent lysine-11-linked polyubiquitination of the tumour suppressor Beclin 1. *Biochem. J.* 441, 399–406.
- Pomerantz, J.L., and Baltimore, D. (1999). NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *EMBO J.* 18, 6694–6704.
- Pourcelot, M., Zemirli, N., Silva Da Costa, L., Loyant, R., Garcin, D., Vitour, D., Munitic, I., Vazquez, A., and Arnoult, D. (2016). The Golgi apparatus acts as a platform for TBK1 activation after viral RNA sensing. *BMC Biol.* 14, 69.
- Prabakaran, T., Bodda, C., Krapp, C., Zhang, B.-C., Christensen, M.H., Sun, C., Reinert, L., Cai, Y., Jensen, S.B., Skouboe, M.K., et al. (2018). Attenuation of cGAS-STING signaling is mediated by a p62/SQSTM1-dependent autophagy pathway activated by TBK1. *EMBO J.* 37.
- Prantner, D., Perkins, D.J., and Vogel, S.N. (2017). AMP-activated Kinase (AMPK) Promotes Innate Immunity and Antiviral Defense through Modulation of Stimulator of Interferon Genes (STING) Signaling. *J. Biol. Chem.* 292, 292–304.
- Proikas-Cezanne, T., Takacs, Z., Dönnies, P., and Kohlbacher, O. (2015). WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *J Cell Sci* 128, 207–217.
- Py, B.F., Lipinski, M.M., and Yuan, J. (2007). Autophagy limits *Listeria monocytogenes* intracellular growth in the early phase of primary infection. *Autophagy* 3, 117–125.
- Qin, B.Y., Liu, C., Srinath, H., Lam, S.S., Correia, J.J., Derynck, R., and Lin, K. (2005). Crystal Structure of IRF-3 in Complex with CBP. *Structure* 13, 1269–1277.
- Radin, J.M., Hawksworth, A.W., Blair, P.J., Faix, D.J., Raman, R., Russell, K.L., and Gray, G.C. (2014). Dramatic decline of respiratory illness among US military recruits after the renewed use of adenovirus vaccines. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 59, 962–968.
- Radke, J.R., and Cook, J.L. (2018). Human adenovirus infections: update and consideration of mechanisms of viral persistence. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 31, 251–256.
- Randall, R.E., and Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 89, 1–47.
- Randow, F., and Youle, R.J. (2014). Self and nonself: how autophagy targets mitochondria and bacteria. *Cell Host Microbe* 15, 403–411.
- Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G., Wilson, J.M., and Batshaw, M.L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* 80, 148–158.
- Rasmussen, S.B., Horan, K.A., Holm, C.K., Stranks, A.J., Mettenleiter, T.C., Simon, A.K., Jensen, S.B., Rixon, F.J., He, B., and Paludan, S.R. (2011). Activation of autophagy by alpha-herpesviruses in myeloid cells is mediated by cytoplasmic viral DNA through a mechanism dependent on STING. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 5268–5276.
- Rathinam, V.A.K., Jiang, Z., Waggoner, S.N., Sharma, S., Cole, L.E., Waggoner, L., Vanaja, S.K., Monks, B.G., Ganesan, S., Latz, E., et al. (2010). The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat. Immunol.* 11, 395–402.

- Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., and Rubinsztein, D.C. (2010). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.* *12*, 747–757.
- Reddy, V.S., and Nemerow, G.R. (2014). Structures and organization of adenovirus cement proteins provide insights into the role of capsid maturation in virus entry and infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 11715–11720.
- Reddy, V.S., Natchiar, S.K., Stewart, P.L., and Nemerow, G.R. (2010). Crystal structure of human adenovirus at 3.5 Å resolution. *Science* *329*, 1071–1075.
- Richter, B., Sliter, D.A., Herhaus, L., Stolz, A., Wang, C., Beli, P., Zaffagnini, G., Wild, P., Martens, S., Wagner, S.A., et al. (2016). Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 4039–4044.
- Roberts, W.K., Hovanessian, A., Brown, R.E., Clemens, M.J., and Kerr, I.M. (1976). Interferon-mediated protein kinase and low-molecular-weight inhibitor of protein synthesis. *Nature* *264*, 477–480.
- Rodriguez-Rocha, H., Gomez-Gutierrez, J.G., Garcia-Garcia, A., Rao, X.-M., Chen, L., McMasters, K.M., and Zhou, H.S. (2011). Adenoviruses induce autophagy to promote virus replication and oncolysis. *Virology* *416*, 9–15.
- Roelvink, P.W., Lizonova, A., Lee, J.G., Li, Y., Bergelson, J.M., Finberg, R.W., Brough, D.E., Kovesdi, I., and Wickham, T.J. (1998). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* *72*, 7909–7915.
- Ronco, L.V., Karpova, A.Y., Vidal, M., and Howley, P.M. (1998). Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev.* *12*, 2061–2072.
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., and Ward, T.G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* *N 84*, 570–573.
- Ruigrok, R.W., Barge, A., Albiges-Rizo, C., and Dayan, S. (1990). Structure of adenovirus fibre. II. Morphology of single fibres. *J. Mol. Biol.* *215*, 589–596.
- Russell, W.C. (2009). Adenoviruses: update on structure and function. *J. Gen. Virol.* *90*, 1–20.
- Russell, W.C., and Precious, B. (1982). Nucleic acid-binding properties of adenovirus structural polypeptides. *J. Gen. Virol.* *63 (Pt 1)*, 69–79.
- Russell, R.C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H.W., Chang, Y.-Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T.P., Dillin, A., and Guan, K.-L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* *15*, 741–750.
- Ryzhakov, G., and Randow, F. (2007). SINTBAD, a novel component of innate antiviral immunity, shares a TBK1-binding domain with NAP1 and TANK. *EMBO J.* *26*, 3180–3190.
- Sadler, A.J., and Williams, B.R.G. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 559–568.

- Sagnier, S., Daussy, C.F., Borel, S., Robert-Hebmann, V., Faure, M., Blanchet, F.P., Beaumelle, B., Biard-Piechaczyk, M., and Espert, L. (2015). Autophagy Restricts HIV-1 Infection by Selectively Degrading Tat in CD4+ T Lymphocytes. *J. Virol.* *89*, 615–625.
- Saha, B., and Parks, R.J. (2017). Human adenovirus type 5 vectors deleted of early region 1 (E1) undergo limited expression of early replicative E2 proteins and DNA replication in non-permissive cells. *PLoS ONE* *12*.
- Saito, S., Murata, T., Kanda, T., Isomura, H., Narita, Y., Sugimoto, A., Kawashima, D., and Tsurumi, T. (2013). Epstein-Barr Virus Deubiquitinase Downregulates TRAF6-Mediated NF- $\kappa$ B Signaling during Productive Replication. *J. Virol.* *87*, 4060–4070.
- Saito, T., Hirai, R., Loo, Y.-M., Owen, D., Johnson, C.L., Sinha, S.C., Akira, S., Fujita, T., and Gale, M. (2007). Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 582–587.
- Saitoh, T., Tun-Kyi, A., Ryo, A., Yamamoto, M., Finn, G., Fujita, T., Akira, S., Yamamoto, N., Lu, K.P., and Yamaoka, S. (2006). Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat. Immunol.* *7*, 598–605.
- Saitoh, T., Fujita, N., Hayashi, T., Takahara, K., Satoh, T., Lee, H., Matsunaga, K., Kageyama, S., Omori, H., Noda, T., et al. (2009). Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 20842–20846.
- Samuel, C.E. (2001). Antiviral Actions of Interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* *14*, 778–809.
- San Martín, C. (2012). Latest insights on adenovirus structure and assembly. *Viruses* *4*, 847–877.
- San Martín, C., Glasgow, J.N., Borovjagin, A., Beatty, M.S., Kashentseva, E.A., Curiel, D.T., Marabini, R., and Dmitriev, I.P. (2008). Localization of the N-terminus of minor coat protein IIIa in the adenovirus capsid. *J. Mol. Biol.* *383*, 923–934.
- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., and Sabatini, D.M. (2010). Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* *141*, 290–303.
- Sarkar, S., Perlstein, E.O., Imarisio, S., Pineau, S., Cordenier, A., Maglathlin, R.L., Webster, J.A., Lewis, T.A., O’Kane, C.J., Schreiber, S.L., et al. (2007). Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington’s disease models. *Nat. Chem. Biol.* *3*, 331–338.
- Sauer, J.-D., Sotelo-Troha, K., von Moltke, J., Monroe, K.M., Rae, C.S., Brubaker, S.W., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Woodward, J.J., Portnoy, D.A., et al. (2011). The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the in vivo interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides. *Infect. Immun.* *79*, 688–694.
- Scheres, S.H.W., Marabini, R., Lanzavecchia, S., Cantele, F., Rutten, T., Fuller, S.D., Carazo, J.M., Burnett, R.M., and San Martín, C. (2005). Classification of single-projection reconstructions for cryo-electron microscopy data of icosahedral viruses. *J. Struct. Biol.* *151*, 79–91.
- Schiedner, G., Morral, N., Parks, R.J., Wu, Y., Koopmans, S.C., Langston, C., Graham, F.L., Beaudet, A.L., and Kochanek, S. (1998). Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat. Genet.* *18*, 180–183.
- Schmid, S., Mordstein, M., Kochs, G., García-Sastre, A., and tenOever, B.R. (2010). Transcription Factor Redundancy Ensures Induction of the Antiviral State. *J. Biol. Chem.* *285*, 42013–42022.

- Schnaith, A., Kashkar, H., Leggio, S.A., Addicks, K., Krönke, M., and Krut, O. (2007). Staphylococcus aureus subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. *J. Biol. Chem.* 282, 2695–2706.
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., and Rice, C.M. (2014). Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 513–545.
- Schoggins, J.W., and Rice, C.M. (2011). Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr. Opin. Virol.* 1, 519–525.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163–189.
- Schütze, S., Wiegmann, K., Machleidt, T., and Krönke, M. (1995). TNF-induced activation of NF- $\kappa$ B. *Immunobiology* 193, 193–203.
- Seibenhener, M.L., Babu, J.R., Geetha, T., Wong, H.C., Krishna, N.R., and Wooten, M.W. (2004). Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8055–8068.
- Seibold, K., and Ehrenschwender, M. (2015). p62 regulates CD40-mediated NF $\kappa$ B activation in macrophages through interaction with TRAF6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464, 330–335.
- Seth, R.B., Sun, L., and Chen, Z.J. (2006). Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res.* 16, 141–147.
- Shahnazari, S., Yen, W.-L., Birmingham, C.L., Shiu, J., Namolovan, A., Zheng, Y.T., Nakayama, K., Kliensky, D.J., and Brumell, J.H. (2010). A diacylglycerol-dependent signaling pathway contributes to regulation of antibacterial autophagy. *Cell Host Microbe* 8, 137–146.
- Sharma, D., and Kanneganti, T.-D. (2016). The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol* 213, 617–629.
- Sharon, D., and Kamen, A. (2018). Advancements in the design and scalable production of viral gene transfer vectors. *Biotechnol. Bioeng.* 115, 25–40.
- Shi, C.-S., and Kehrl, J.H. (2008). MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *J. Biol. Chem.* 283, 33175–33182.
- Shi, C.-S., and Kehrl, J.H. (2010). TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. *Sci. Signal.* 3, ra42.
- Shi, J., Wong, J., Piesik, P., Fung, G., Zhang, J., Jagdeo, J., Li, X., Jan, E., and Luo, H. (2013). Cleavage of sequestosome 1/p62 by an enteroviral protease results in disrupted selective autophagy and impaired NF $\kappa$ B signaling. *Autophagy* 9, 1591–1603.
- Shi, L., Ramaswamy, M., Manzel, L.J., and Look, D.C. (2007). Inhibition of Jak1-Dependent Signal Transduction in Airway Epithelial Cells Infected with Adenovirus. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 37, 720–728.
- Shin, D.-M., Yuk, J.-M., Lee, H.-M., Lee, S.-H., Son, J.W., Harding, C.V., Kim, J.-M., Modlin, R.L., and Jo, E.-K. (2010). Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signalling. *Cell. Microbiol.* 12, 1648–1665.
- Shintani, T., Mizushima, N., Ogawa, Y., Matsuura, A., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J.* 18, 5234–5241.

- Shu, C., Yi, G., Watts, T., Kao, C.C., and Li, P. (2012). Structure of STING bound to cyclic di-GMP reveals the mechanism of cyclic dinucleotide recognition by the immune system. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 722–724.
- Shu, C., Li, X., and Li, P. (2014). The mechanism of double-stranded DNA sensing through the cGAS-STING pathway. *Cytokine Growth Factor Rev.* *25*, 641–648.
- Siegel, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* *284*, 1835–1837.
- Sinha, S., Colbert, C.L., Becker, N., Wei, Y., and Levine, B. (2008). Molecular basis of the regulation of Beclin 1-dependent autophagy by the gamma-herpesvirus 68 Bcl-2 homolog M11. *Autophagy* *4*, 989–997.
- Skaug, B., Chen, J., Du, F., He, J., Ma, A., and Chen, Z.J. (2011). Direct, noncatalytic mechanism of IKK inhibition by A20. *Mol. Cell* *44*, 559–571.
- Smith, J.G., Cassany, A., Gerace, L., Ralston, R., and Nemerow, G.R. (2008). Neutralizing antibody blocks adenovirus infection by arresting microtubule-dependent cytoplasmic transport. *J. Virol.* *82*, 6492–6500.
- Sohn, S.-Y., and Hearing, P. (2011). Adenovirus Sequesters Phosphorylated STAT1 at Viral Replication Centers and Inhibits STAT Dephosphorylation. *J. Virol.* *85*, 7555–7562.
- Sparrer, K.M.J., and Gack, M.U. (2018). TRIM proteins: New players in virus-induced autophagy. *PLOS Pathog.* *14*, e1006787.
- Sparrer, K.M.J., Gableske, S., Zurenski, M.A., Parker, Z.M., Full, F., Baumgart, G.J., Kato, J., Pacheco-Rodriguez, G., Liang, C., Pornillos, O., et al. (2017). TRIM23 mediates virus-induced autophagy via activation of TBK1. *Nat. Microbiol.* *2*, 1543–1557.
- Staring, J., von Castelmur, E., Blomen, V.A., van den Hengel, L.G., Brockmann, M., Baggen, J., Thibaut, H.J., Nieuwenhuis, J., Janssen, H., van Kuppeveld, F.J.M., et al. (2017). PLA2G16 represents a switch between entry and clearance of Picornaviridae. *Nature* *541*, 412–416.
- Steele-Mortimer, O. (2008). The Salmonella-containing Vacuole – Moving with the Times. *Curr. Opin. Microbiol.* *11*, 38–45.
- Stein, S.C., and Falck-Pedersen, E. (2012). Sensing adenovirus infection: activation of interferon regulatory factor 3 in RAW 264.7 cells. *J. Virol.* *86*, 4527–4537.
- Stein, S.C., Lam, E., and Falck-Pedersen, E. (2012). Cell-Specific Regulation of Nucleic Acid Sensor Cascades: a Controlling Interest in the Antiviral Response. *J. Virol.* *86*, 13303–13312.
- Stewart, P.L., Burnett, R.M., Cyrklaff, M., and Fuller, S.D. (1991). Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus. *Cell* *67*, 145–154.
- Strunze, S., Trotman, L.C., Boucke, K., and Greber, U.F. (2005). Nuclear targeting of adenovirus type 2 requires CRM1-mediated nuclear export. *Mol. Biol. Cell* *16*, 2999–3009.
- Strunze, S., Engelke, M.F., Wang, I.-H., Puntener, D., Boucke, K., Schleich, S., Way, M., Schoenenberger, P., Burckhardt, C.J., and Greber, U.F. (2011). Kinesin-1-mediated capsid disassembly and disruption of the nuclear pore complex promote virus infection. *Cell Host Microbe* *10*, 210–223.

- Su, C., and Zheng, C. (2017). Herpes Simplex Virus 1 Abrogates the cGAS/STING-Mediated Cytosolic DNA-Sensing Pathway via Its Virion Host Shutoff Protein, UL41. *J. Virol.* *91*, e02414-16.
- Sudol, M., Chen, H.I., Bougeret, C., Einbond, A., and Bork, P. (1995). Characterization of a novel protein-binding module — the WW domain. *FEBS Lett.* *369*, 67–71.
- Sumpter, R., and Levine, B. (2011). Selective autophagy and viruses. *Autophagy* *7*, 260–265.
- Sun, A., Wei, J., Childress, C., Shaw, J.H., Peng, K., Shao, G., Yang, W., and Lin, Q. (2017). The E3 ubiquitin ligase NEDD4 is an LC3-interactive protein and regulates autophagy. *Autophagy* *13*, 522–537.
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* *339*, 786–791.
- Sun, Q., Zhang, J., Fan, W., Wong, K.N., Ding, X., Chen, S., and Zhong, Q. (2011). The RUN Domain of Rubicon Is Important for hVps34 Binding, Lipid Kinase Inhibition, and Autophagy Suppression. *J. Biol. Chem.* *286*, 185–191.
- Sun, W., Li, Y., Chen, L., Chen, H., You, F., Zhou, X., Zhou, Y., Zhai, Z., Chen, D., and Jiang, Z. (2009). ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 8653–8658.
- Sung, M.T., Cao, T.M., Coleman, R.T., and Budelier, K.A. (1983). Gene and protein sequences of adenovirus protein VII, a hybrid basic chromosomal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 2902–2906.
- Suomalainen, M., Nakano, M.Y., Keller, S., Boucke, K., Stidwill, R.P., and Greber, U.F. (1999). Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J. Cell Biol.* *144*, 657–672.
- Suomalainen, M., Luisoni, S., Boucke, K., Bianchi, S., Engel, D.A., and Greber, U.F. (2013). A direct and versatile assay measuring membrane penetration of adenovirus in single cells. *J. Virol.* *87*, 12367–12379.
- Swiecki, M., and Colonna, M. (2011). Type I interferons: diversity of sources, production pathways and effects on immune responses. *Curr. Opin. Virol.* *1*, 463–475.
- Swiecki, M., Omattage, N.S., and Brett, T.J. (2013). BST-2/tetherin: structural biology, viral antagonism, and immunobiology of a potent host antiviral factor. *Mol. Immunol.* *54*, 132–139.
- Syedbasha, M., and Egli, A. (2017). Interferon Lambda: Modulating Immunity in Infectious Diseases. *Front. Immunol.* *8*.
- Szretter, K.J., Brien, J.D., Thackray, L.B., Virgin, H.W., Cresswell, P., and Diamond, M.S. (2011). The interferon-inducible gene viperin restricts West Nile virus pathogenesis. *J. Virol.* *85*, 11557–11566.
- Takahashi, Y., Meyerkord, C.L., Hori, T., Runkle, K., Fox, T.E., Kester, M., Loughran, T.P., and Wang, H.-G. (2011). Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy* *7*, 61–73.
- Takahashi, K., Suzuki, N.N., Horiuchi, M., Mori, M., Suhara, W., Okabe, Y., Fukuhara, Y., Terasawa, H., Akira, S., Fujita, T., et al. (2003). X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 922–927.

- Takahashi, K., Yoneyama, M., Nishihori, T., Hirai, R., Kumeta, H., Narita, R., Gale, M., Inagaki, F., and Fujita, T. (2008). Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol. Cell* 29, 428–440.
- Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M.K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., et al. (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448, 501–505.
- Tamanini, A., Nicolis, E., Bonizzato, A., Bezzetti, V., Melotti, P., Assael, B.M., and Cabrini, G. (2006). Interaction of Adenovirus Type 5 Fiber with the Cocksackievirus and Adenovirus Receptor Activates Inflammatory Response in Human Respiratory Cells. *J. Virol.* 80, 11241–11254.
- Tanaka, Y., and Chen, Z.J. (2012). STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci. Signal.* 5, ra20.
- Tanaka, T., Grusby, M.J., and Kaisho, T. (2007). PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF- $\kappa$ B activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit. *Nat. Immunol.* 8, 584–591.
- Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2503–2518.
- Tasset, I., and Cuervo, A.M. (2016). Role of chaperone-mediated autophagy in metabolism. *FEBS J.* 283, 2403–2413.
- Tattoli, I., Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2012). The bacterial and cellular determinants controlling the recruitment of mTOR to the Salmonella-containing vacuole. *Biol. Open* 1, 1215–1225.
- Tawar, R.G., Duquerroy, S., Vornrhein, C., Varela, P.F., Damier-Piolle, L., Castagné, N., MacLellan, K., Bedouelle, H., Bricogne, G., Bhella, D., et al. (2009). Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science* 326, 1279–1283.
- Taylor, M.P., and Kirkegaard, K. (2008). Potential subversion of autophagosomal pathway by picornaviruses. *Autophagy* 4, 286–289.
- Taylor, R.T., and Bresnahan, W.A. (2005). Human Cytomegalovirus Immediate-Early 2 Gene Expression Blocks Virus-Induced Beta Interferon Production. *J. Virol.* 79, 3873–3877.
- Teigler, J.E., Kagan, J.C., and Barouch, D.H. (2014). Late Endosomal Trafficking of Alternative Serotype Adenovirus Vaccine Vectors Augments Antiviral Innate Immunity. *J. Virol.* 88, 10354–10363.
- Thompson, M.R., Kaminski, J.J., Kurt-Jones, E.A., and Fitzgerald, K.A. (2011). Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* 3, 920–940.
- Thurston, T.L., Boyle, K.B., Allen, M., Ravenhill, B.J., Karpiyevich, M., Bloor, S., Kaul, A., Noad, J., Foeglein, A., Matthews, S.A., et al. (2016). Recruitment of TBK1 to cytosol-invading Salmonella induces WIPI2-dependent antibacterial autophagy. *EMBO J.* 35, 1779–1792.
- Thurston, T.L.M., Ryzhakov, G., Bloor, S., von Muhlinen, N., and Randow, F. (2009). The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat. Immunol.* 10, 1215–1221.
- Thurston, T.L.M., Wandel, M.P., von Muhlinen, N., Foeglein, A., and Randow, F. (2012). Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* 482, 414–418.

- Tollefson, A.E., Scaria, A., Hermiston, T.W., Ryerse, J.S., Wold, L.J., and Wold, W.S. (1996). The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J. Virol.* *70*, 2296–2306.
- Top, F.H. (1975). Control of adenovirus acute respiratory disease in U.S. Army trainees. *Yale J. Biol. Med.* *48*, 185–195.
- Trentin, J.J., Yabe, Y., and Taylor, G. (1962). The quest for human cancer viruses. *Science* *137*, 835–841.
- Trocoli, A., and Djavaheri-Mergny, M. (2011). The complex interplay between autophagy and NF- $\kappa$ B signaling pathways in cancer cells. *Am. J. Cancer Res.* *1*, 629–649.
- Trotman, L.C., Mosberger, N., Fornerod, M., Stidwill, R.P., and Greber, U.F. (2001). Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat. Cell Biol.* *3*, 1092–1100.
- Tsuchida, T., Zou, J., Saitoh, T., Kumar, H., Abe, T., Matsuura, Y., Kawai, T., and Akira, S. (2010). The ubiquitin ligase TRIM56 regulates innate immune responses to intracellular double-stranded DNA. *Immunity* *33*, 765–776.
- Tsukada, M., and Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* *333*, 169–174.
- Tu, D., Zhu, Z., Zhou, A.Y., Yun, C., Lee, K.-E., Toms, A.V., Li, Y., Dunn, G.P., Chan, E., Thai, T., et al. (2013). Structure and ubiquitination-dependent activation of TANK-binding kinase 1. *Cell Rep.* *3*, 747–758.
- Tumbarello, D.A., Waxse, B.J., Arden, S.D., Bright, N.A., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2012). Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nat. Cell Biol.* *14*, 1024–1035.
- Tumbarello, D.A., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2013). Myosin VI and its cargo adaptors – linking endocytosis and autophagy. *J Cell Sci* *126*, 2561–2570.
- Tumbarello, D.A., Manna, P.T., Allen, M., Bycroft, M., Arden, S.D., Kendrick-Jones, J., and 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.
- Turan, K., Mibayashi, M., Sugiyama, K., Saito, S., Numajiri, A., and Nagata, K. (2004). Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res.* *32*, 643–652.
- Ugai, H., Borovjagin, A.V., Le, L.P., Wang, M., and Curiel, D.T. (2007). Thermostability/infectivity defect caused by deletion of the core protein V gene in human adenovirus type 5 is rescued by thermo-selectable mutations in the core protein X precursor. *J. Mol. Biol.* *366*, 1142–1160.
- Vachon, V.K., and Conn, G.L. (2016). Adenovirus VA RNA: An essential pro-viral non-coding RNA. *Virus Res.* *212*, 39–52.
- Valmas, C., Grosch, M.N., Schümann, M., Olejnik, J., Martinez, O., Best, S.M., Krähling, V., Basler, C.F., and Mühlberger, E. (2010). Marburg virus evades interferon responses by a mechanism distinct from ebola virus. *PLoS Pathog.* *6*, e1000721.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J. (1999). *S-type Lectins (Galectins)* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Vasta, G.R., Feng, C., González-Montalbán, N., Mancini, J., Yang, L., Abernathy, K., Frost, G., and Palm, C. (2017). Functions of galectins as 'self/non-self'-recognition and effector factors. *Pathog. Dis.* 75.
- Venard, V., Bordigoni, P., and Faou, A.L. (2001). Les infections à adénovirus en milieu hospitalier. *Virologie* 5, 245–253.
- Verlhac, P., Grégoire, I.P., Azocar, O., Petkova, D.S., Baguet, J., Viret, C., and Faure, M. (2015). Autophagy Receptor NDP52 Regulates Pathogen-Containing Autophagosome Maturation. *Cell Host Microbe* 17, 515–525.
- Vidya, M.K., Kumar, V.G., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., and Bhatta, R. (2018). Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *Int. Rev. Immunol.* 37, 20–36.
- Vlahakis, A., and Debnath, J. (2016). Triggering Selective Autophagy at the Right Place and the Right Time. *Mol. Cell* 64, 215–216.
- von Muhlinen, N., Akutsu, M., Ravenhill, B.J., Foeglein, Á., Bloor, S., Rutherford, T.J., Freund, S.M.V., Komander, D., and Randow, F. (2012). LC3C, Bound Selectively by a Noncanonical LIR Motif in NDP52, Is Required for Antibacterial Autophagy. *Mol. Cell* 48, 329–342.
- de Vrij, J., van den Hengel, S.K., Uil, T.G., Koppers-Lalic, D., Dautzenberg, I.J.C., Stassen, O.M.J.A., Bárcena, M., Yamamoto, M., de Ridder, C.M.A., Kraaij, R., et al. (2011). Enhanced transduction of CAR-negative cells by protein IX-gene deleted adenovirus 5 vectors. *Virology* 410, 192–200.
- Vujadinovic, M., and Vellinga, J. (2018). Progress in Adenoviral Capsid-Display Vaccines. *Biomedicines* 6.
- Walters, R.W., Freimuth, P., Moninger, T.O., Ganske, I., Zabner, J., and Welsh, M.J. (2002). Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 110, 789–799.
- Wang, K., Huang, S., Kapoor-Munshi, A., and Nemerow, G. (1998). Adenovirus internalization and infection require dynamin. *J. Virol.* 72, 3455–3458.
- Wang, L., Tian, Y., and Ou, J.J. (2015a). HCV induces the expression of Rubicon and UVRAG to temporally regulate the maturation of autophagosomes and viral replication. *PLoS Pathog.* 11, e1004764.
- Wang, L., Yan, J., Niu, H., Huang, R., and Wu, S. (2018). Autophagy and Ubiquitination in Salmonella Infection and the Related Inflammatory Responses. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8.
- Wang, Y., Lian, Q., Yang, B., Yan, S., Zhou, H., He, L., Lin, G., Lian, Z., Jiang, Z., and Sun, B. (2015b). TRIM30 $\alpha$  Is a Negative-Feedback Regulator of the Intracellular DNA and DNA Virus-Triggered Response by Targeting STING. *PLoS Pathog.* 11, e1005012.
- Watanabe, M., Takahashi, H., Saeki, Y., Ozaki, T., Itoh, S., Suzuki, M., Mizushima, W., Tanaka, K., and Hatakeyama, S. (2015). The E3 ubiquitin ligase TRIM23 regulates adipocyte differentiation via stabilization of the adipogenic activator PPAR $\gamma$ . *ELife* 4, e05615.
- Watson, R.O., Manzanillo, P.S., and Cox, J.S. (2012). Extracellular *M. tuberculosis* DNA Targets Bacteria for Autophagy by Activating the Host DNA-Sensing Pathway. *Cell* 150, 803–815.
- Watson, R.O., Bell, S.L., MacDuff, D.A., Kimmey, J.M., Diner, E.J., Olivas, J., Vance, R.E., Stallings, C.L., Virgin, H.W., and Cox, J.S. (2015). The Cytosolic Sensor cGAS Detects

- Mycobacterium tuberculosis DNA to Induce Type I Interferons and Activate Autophagy. *Cell Host Microbe* 17, 811–819.
- Weber, J. (1976). Genetic analysis of adenovirus type 2 III. Temperature sensitivity of processing viral proteins. *J. Virol.* 17, 462–471.
- Weber, J.M., Déry, C.V., Mirza, M.A., and Horvath, J. (1985). Adenovirus DNA synthesis is coupled to virus assembly. *Virology* 140, 351–359.
- Weidberg, H., and Elazar, Z. (2011). TBK1 mediates crosstalk between the innate immune response and autophagy. *Sci. Signal.* 4, pe39.
- Weil, R., Laplantine, E., and Génin, P. (2016). Regulation of TBK1 activity by Optineurin contributes to cell cycle-dependent expression of the interferon pathway. *Cytokine Growth Factor Rev.* 29, 23–33.
- Weitzman, M.D. (2005). Functions of the adenovirus E4 proteins and their impact on viral vectors. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 10, 1106–1117.
- Wiethoff, C.M., Wodrich, H., Gerace, L., and Nemerow, G.R. (2005). Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J. Virol.* 79, 1992–2000.
- van Wijk, S.J.L., Fiskin, E., Putyrski, M., Pampaloni, F., Hou, J., Wild, P., Kensche, T., Grecco, H.E., Bastiaens, P., and Dikic, I. (2012). Fluorescence-based sensors to monitor localization and functions of linear and K63-linked ubiquitin chains in cells. *Mol. Cell* 47, 797–809.
- Wild, P., Farhan, H., McEwan, D.G., Wagner, S., Rogov, V.V., Brady, N.R., Richter, B., Korac, J., Waidmann, O., Choudhary, C., et al. (2011). Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* 333, 228–233.
- Wilkens, H., and Sester, M. (2016). Treatment of Cytomegalovirus Infection with Cidofovir and CMV Immune Globulin in a Lung Transplant Recipient.
- Windheim, M., Hilgendorf, A., and Burgert, H.G. (2004). Immune evasion by adenovirus E3 proteins: exploitation of intracellular trafficking pathways. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 273, 29–85.
- Wodrich, H., Guan, T., Cingolani, G., Von Seggern, D., Nemerow, G., and Gerace, L. (2003). Switch from capsid protein import to adenovirus assembly by cleavage of nuclear transport signals. *EMBO J.* 22, 6245–6255.
- Wodrich, H., Cassany, A., D'Angelo, M.A., Guan, T., Nemerow, G., and Gerace, L. (2006). Adenovirus core protein pVII is translocated into the nucleus by multiple import receptor pathways. *J. Virol.* 80, 9608–9618.
- Wodrich, H., Henaff, D., Jammart, B., Segura-Morales, C., Seelmeir, S., Coux, O., Ruzsics, Z., Wiethoff, C.M., and Kremer, E.J. (2010). A Capsid-Encoded PPxY-Motif Facilitates Adenovirus Entry. *PLoS Pathog.* 6.
- Wold, W.S.M., and Toth, K. (2015). New Drug on the Horizon for Treating Adenovirus. *Expert Opin. Pharmacother.* 16, 2095–2099.
- Wong, Y.C., and Holzbaur, E.L.F. (2014). Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E4439–4448.
- Woodward, J.J., Iavarone, A.T., and Portnoy, D.A. (2010). c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science* 328, 1703–1705.

- Wu, E., Pache, L., Von Seggern, D.J., Mullen, T.-M., Mikyas, Y., Stewart, P.L., and Nemerow, G.R. (2003). Flexibility of the adenovirus fiber is required for efficient receptor interaction. *J. Virol.* *77*, 7225–7235.
- Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C., and Chen, Z.J. (2013a). Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* *339*, 826–830.
- Wu, J., Li, W., Shao, Y., Avey, D., Fu, B., Gillen, J., Hand, T., Ma, S., Liu, X., Miley, W., et al. (2015). Inhibition of cGAS DNA Sensing by a Herpesvirus Virion Protein. *Cell Host Microbe* *18*, 333–344.
- Wu, K., Guimet, D., and Hearing, P. (2013b). The adenovirus L4-33K protein regulates both late gene expression patterns and viral DNA packaging. *J. Virol.* *87*, 6739–6747.
- Xu, Q., Zhu, N., Chen, S., Zhao, P., Ren, H., Zhu, S., Tang, H., Zhu, Y., and Qi, Z. (2017). E3 Ubiquitin Ligase Nedd4 Promotes Japanese Encephalitis Virus Replication by Suppressing Autophagy in Human Neuroblastoma Cells. *Sci. Rep.* *7*, 45375.
- Xu, Y., Jagannath, C., Liu, X.-D., Sharafkhaneh, A., Kolodziejaska, K.E., and Eissa, N.T. (2007). Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* *27*, 135–144.
- Yang, Q., Liu, T.-T., Lin, H., Zhang, M., Wei, J., Luo, W.-W., Hu, Y.-H., Zhong, B., Hu, M.-M., and Shu, H.-B. (2017). TRIM32-TAX1BP1-dependent selective autophagic degradation of TRIF negatively regulates TLR3/4-mediated innate immune responses. *PLOS Pathog.* *13*, e1006600.
- Yang, S., Imamura, Y., Jenkins, R.W., Cañadas, I., Kitajima, S., Aref, A., Brannon, A., Oki, E., Castoreno, A., Zhu, Z., et al. (2016). Autophagy Inhibition Dysregulates TBK1 Signaling and Promotes Pancreatic Inflammation. *Cancer Immunol. Res.* *4*, 520–530.
- Ye, J.S., Kim, N., Lee, K.J., Nam, Y.R., Lee, U., and Joo, C.H. (2014). Lysine 63-Linked TANK-Binding Kinase 1 Ubiquitination by Mindbomb E3 Ubiquitin Protein Ligase 2 Is Mediated by the Mitochondrial Antiviral Signaling Protein. *J. Virol.* *88*, 12765–12776.
- Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Eskelinen, E.-L. (2009). 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* *5*, 1180–1185.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* *5*, 730–737.
- Yordy, B., Tal, M.C., Hayashi, K., Arojo, O., and Iwasaki, A. (2013). Autophagy and selective deployment of Atg proteins in antiviral defense. *Int. Immunol.* *25*, 1–10.
- Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Yoshida, M., Fukumatsu, M., Kim, M., Mimuro, H., Nakagawa, I., Yanagawa, T., Ishii, T., et al. (2009). *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1233–1240.
- Yoshimura, A., Naka, T., and Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 454–465.
- Young, D.F., Andrejeva, L., Livingstone, A., Goodbourn, S., Lamb, R.A., Collins, P.L., Elliott, R.M., and Randall, R.E. (2003). Virus replication in engineered human cells that do not respond to interferons. *J. Virol.* *77*, 2174–2181.
- Yu, T., Yang, Y., Yin, D.Q., Hong, S., Son, Y.-J., Kim, J.-H., and Cho, J.Y. (2015). TBK1 inhibitors: a review of patent literature (2011 – 2014). *Expert Opin. Ther. Pat.* *25*, 1385–1396.

- Yu, Z.-Q., Ni, T., Hong, B., Wang, H.-Y., Jiang, F.-J., Zou, S., Chen, Y., Zheng, X.-L., Klionsky, D.J., Liang, Y., et al. (2012). Dual roles of Atg8–PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy* 8, 883–892.
- Zaffagnini, G., and Martens, S. (2016). Mechanisms of Selective Autophagy. *J. Mol. Biol.* 428, 1714–1724.
- Zeng, X., and Carlin, C.R. (2013). Host cell autophagy modulates early stages of adenovirus infections in airway epithelial cells. *J. Virol.* 87, 2307–2319.
- Zeng, W., Sun, L., Jiang, X., Chen, X., Hou, F., Adhikari, A., Xu, M., and Chen, Z.J. (2010). Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity. *Cell* 141, 315–330.
- Zhang, W., and Arcos, R. (2005). Interaction of the adenovirus major core protein precursor, pVII, with the viral DNA packaging machinery. *Virology* 334, 194–202.
- Zhang, J., Wang, K., Wang, S., and Zheng, C. (2013). Herpes Simplex Virus 1 E3 Ubiquitin Ligase ICP0 Protein Inhibits Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced NF- $\kappa$ B Activation by Interacting with p65/RelA and p50/NF- $\kappa$ B1. *J. Virol.* 87, 12935–12948.
- Zhang, X., Wu, J., Du, F., Xu, H., Sun, L., Chen, Z., Brautigam, C.A., Zhang, X., and Chen, Z.J. (2014). The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop. *Cell Rep.* 6, 421–430.
- Zhang, Y., Huang, W., Ornelles, D.A., and Gooding, L.R. (2010). Modeling Adenovirus Latency in Human Lymphocyte Cell Lines. *J. Virol.* 84, 8799–8810.
- Zhao, P., Wong, K.I., Sun, X., Reilly, S.M., Uhm, M., Liao, Z., Skorobogatko, Y., and Saltiel, A.R. (2018). TBK1 at the Crossroads of Inflammation and Energy Homeostasis in Adipose Tissue. *Cell* 172, 731-743.e12.
- Zhao, W., Wang, L., Zhang, M., Yuan, C., and Gao, C. (2012). E3 ubiquitin ligase tripartite motif 38 negatively regulates TLR-mediated immune responses by proteasomal degradation of TNF receptor-associated factor 6 in macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 2567–2574.
- Zheng, Y.T., Shahnazari, S., Brech, A., Lamark, T., Johansen, T., and Brumell, J.H. (2009). The Adaptor Protein p62/SQSTM1 Targets Invading Bacteria to the Autophagy Pathway. *J. Immunol.* 183, 5909–5916.
- Zhong, B., Zhang, L., Lei, C., Li, Y., Mao, A.-P., Yang, Y., Wang, Y.-Y., Zhang, X.-L., and Shu, H.-B. (2009a). The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MITA. *Immunity* 30, 397–407.
- Zhong, Y., Wang, Q.J., Li, X., Yan, Y., Backer, J.M., Chait, B.T., Heintz, N., and Yue, Z. (2009b). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol 3-kinase complex. *Nat. Cell Biol.* 11, 468–476.
- Zhou, F., Zhang, X., van Dam, H., Ten Dijke, P., Huang, H., and Zhang, L. (2012). Ubiquitin-specific protease 4 mitigates Toll-like/interleukin-1 receptor signaling and regulates innate immune activation. *J. Biol. Chem.* 287, 11002–11010.
- Zhu, J., Huang, X., and Yang, Y. (2007). Innate Immune Response to Adenoviral Vectors Is Mediated by both Toll-Like Receptor-Dependent and -Independent Pathways. *J. Virol.* 81, 3170–3180.

Züst, R., Cervantes-Barragan, L., Habjan, M., Maier, R., Neuman, B.W., Ziebuhr, J., Szretter, K.J., Baker, S.C., Barchet, W., Diamond, M.S., et al. (2011). Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat. Immunol.* *12*, 137–143.

