



HAL
open science

Détournement de la machinerie autophagique par le cytomégalovirus humain : conséquences sur sa multiplication

Clémence Taisne

► **To cite this version:**

Clémence Taisne. Détournement de la machinerie autophagique par le cytomégalovirus humain : conséquences sur sa multiplication. Virologie. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UP-ASQ001 . tel-03282506

HAL Id: tel-03282506

<https://theses.hal.science/tel-03282506>

Submitted on 9 Jul 2021

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.

Détournement de la machinerie autophagique par le cytomégalovirus humain : conséquences sur sa multiplication

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569 : innovation thérapeutique : du fondamental à
l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Microbiologie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative
Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France.

Référent : Faculté de pharmacie

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette,
le 11 janvier 2021, par

Clémence TAISNE

Composition du Jury

Marie-Hélène CUIF-LORDEZ

Professeure, Université Paris-Saclay (CNRS, UMR9198)

Présidente

Etienne MOREL

Directeur de recherche, (INSERM U1151, CNRS UMR8253)

Rapporteur & Examineur

Harald WODRICH

Directeur de recherche, (INSERM- UMR5234)

Rapporteur & Examineur

Clarisse BERLIOZ-TORRENT

Directrice de recherche, (INSERM U1016, UMR-S8104)

Examinatrice

Ghaffar MUHARRAM

Maitre de conférences, Université de Lille (INSERM U1019)

Examineur

Audrey ESCLATINE

Professeure, Université Paris-Saclay (CNRS, UMR9198)

Directrice de thèse

Marion LUSSIGNOL

Maitresse de conférence, Université Paris-Saclay (CNRS, UMR9198)

Co-encadrante

Remerciements

Avant de parler du projet de ma thèse, je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury. Le docteur Etienne Morel, et le docteur Harald Wodrich qui ont accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit, mais également la professeure Marie-Hélène Cuif-lordez et le maître de conférence Ghaffar Muharam qui ont accepté d'en être examinateurs. Je tiens particulièrement à remercier la docteure Clarisse Berlioz-Torrent qui a encadré mon stage de M1 et qui a accepté d'être membre de mon jury de mi-thèse ainsi qu'être examinatrice de ma thèse.

J'aimerais exprimer toute ma reconnaissance à Audrey Esclatine, ma directrice de thèse, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire dès mon M2. Je te remercie pour ta disponibilité, ta grande confiance et ton écoute. Tu m'as poussée à réaliser des formations enrichissantes, à assister à des congrès et surtout à me surpasser. Tu m'as appris la rigueur, la persévérance et la détermination pour achever mon travail de thèse. Tu m'as éduquée comme un petit *sharky* et me voilà prête à prendre le large.

Je souhaite également exprimer toute ma gratitude à Marion, ma co-encadrante de thèse, de m'avoir guidée, soutenue et conseillée depuis mon M2. Je te remercie chaleureusement pour ton enthousiasme pour la recherche, ton aide et ton encadrement pour ce projet. Pour toutes ces manips faites dans la joie et la bonne humeur, bien souvent en chanson, mais toujours dans le sérieux et la rigueur. Nous avons formé le duo « Clémion » prêt à affronter tous les défis techniques rencontrés, mais aujourd'hui « Dobby » est libre de sa maîtresse de conférence !

Merci beaucoup à vous deux, pour votre attention et tout le temps que vous m'avez consacré aussi bien professionnellement, que personnellement.

Je remercie tous les membres de l'équipe, avec lesquels j'ai eu plaisir à travailler. Eva, pour ta joie et ta bonne humeur et surtout pour ton aide précieuse pour les dernières manips de l'article et de ma fin de thèse. J'ai toujours pu compter sur toi pour La Trinita (avec l'accent bien sûr) ! Damien, Tic ou Tac je ne sais plus, merci pour tous ces efforts que tu as fait, je sais à quel point cela a été difficile même si j'ai été si douce. Tu ne pourras plus m'éteindre la lumière ou me voler mon crayon de papier, mais Gabriela revient vite ne t'en fais pas ! Merci beaucoup à Joséphine et Leïla pour leur efficacité et leur gentillesse. Et récemment, merci à Guillaume et Mathilde pour leur bonne humeur, leurs aides et pour ces discussions très sérieuses à la pause infusion. Je salue l'équipe de Paris : Sylvie, Cécilia et Lisa avec qui je n'aurai pas eu l'occasion de travailler. Je remercie surtout Gabriela, pour ces très bons moments partagés pendant ton M2, et Arnaud, pour ton aide pour le projet.

Merci aussi à l'ensemble du 3^{ème} de la tour E1, pour m'avoir permis d'enseigner les TPs de microbiologie et pour leur agréable compagnie notamment lors des repas de Noël. Particulièrement à Marie-Françoise, avec qui nous avons beaucoup partagé. Merci aussi à Bruno, toujours de bonne compagnie et pour nos discussions saisissantes. Notre mission secrète s'achève donc ici, ce fut un plaisir de collaborer agent ! Je souhaite également remercier Daniel de la tour D4, pour toutes les fois où tu m'as dépanné des anticorps !

Je remercie avec émotion l'ensemble des personnes de cette équipe (du 5^{ème} ou du 3^{ème}) sans qui cette expérience n'aurait pas été aussi enrichissante et épanouissante.

Sans oublier, les membres des plateformes ImaGIF et MIPSIT sans qui je n'aurai pas pu réaliser mes observations. Je remercie Claudine et Valérie pour m'avoir formée sur leurs appareils et m'avoir laissée en autonomie. Et je remercie particulièrement Claire, Cynthia, Sandrine et Romain pour leur gentillesse et leur grande disponibilité. Vous m'avez donné beaucoup de conseils et vos formations sont de très grande qualité. Je suis assez frustrée de ne pas pouvoir aller au bout du projet notamment pour le dSTORM mais ce fut une super expérience de pouvoir initier ce projet.

Je remercie les membres du département de virologie pour les séminaires et leurs accueils lors de nos passages sur le campus de Gif-sur-Yvette, notamment pour les purifications de virus.

Quelques petites mots et tendresses pour mes proches qui m'ont soutenu, mais que je préfère remercier à ma façon (en respectant les gestes barrières bien sûr).

C'est ici que s'achèvent mes 4 années passées à la Faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry. Jamais je n'aurai imaginé passer une partie de mes études dans ces magnifiques tours vertes, à contempler l'autoroute A86 et surtout mon ancienne cour de récréation de Sophie-Barat. Ce fut une très belle expérience, enrichissante, avec une dernière année ... disons atypique. J'espère que nos chemins se croiseront à nouveau, au moins le lundi 11 janvier 2021 !

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	3
Abréviations.....	5
Table des illustrations	9
Préambule	11
Données bibliographiques.....	15
I) Le Cytomégalovirus Humain :.....	17
I.1. Structure du virus	18
I.1.a. La nucléocapside	19
I.1.b. Le tégument	20
I.1.c. L'enveloppe et les glycoprotéines.....	22
I.1.d. Les différentes souches virales du HCMV	24
I.2. Cycle viral.....	25
I.2.a. L'entrée du HCMV	27
I.2.b. L'expression des protéines et réplication du génome du HCMV	29
I.2.c. L'encapsulation et l'enveloppement primaire	30
I.2.d. L'enveloppement secondaire et la libération de virus par exocytose	32
I.2.e. La latence du HCMV	36
I.3. Pouvoir pathogène	38
I.3.a. Pathologies associées lors des infections congénitales.	38
I.3.b. Pathologies associées lors des infections au cours des transplantations.	39
I.3.c. Les méthodes de détections et traitement.....	39
II) L'autophagie	41
II.1. Généralités	42
II.1.a. Les différentes voies autophagiques.....	42
II.1.b. L'autophagie : physiologie et pathologies.....	45
II.2. Le processus autophagique	46
II.2.a. L'initiation.....	47
II.2.b. L'élongation.....	49
II.2.c. La fermeture de l'autophagosome et sa maturation	54
II.3. L'origine des membranes	59

III) Détournement des mécanismes de défense cellulaires, exemple de l'autophagie	63
III.1. Les différents mécanismes de défense cellulaires	63
III.2. Détournement de l'autophagie par les virus (généralités)	66
III.2.a. Détournement de l'autophagie sélective par les virus	66
III.2.b. Utilisation de protéines autophagiques par les virus.....	66
III.3. Utilisation des membranes autophagiques par les virus	69
III.3.a. Membranes utilisées pour la réplication et/ou l'assemblage des virus.....	71
III.3.b. L'autophagie utilisée pour améliorer la propagation des virus	72
III.4. Autophagie et HCMV	73
Présentation des travaux.....	75
Introduction de l'article.....	77
Article	79
Discussion de l'article	99
Résultats complémentaires	101
Conclusions et perspectives.....	123
Annexe.....	133
Références	147

Abréviations

3-MA : 3-méthyladénine

Ac : anticorps

ADN : acide désoxyribonucléique

AdV : Adénovirus

AMPK : *AMP-activated protein kinase*

ARN : acide ribonucléique

ATG: *AuTophaGy related protein*

BACmide: *bacterial artificial chromosome plasmide*

CMA : *chaperone-mediated autophagy*

CMH-I ou -II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II

COP-I ou -II : *coat protein complex I ou II*

CRISPR : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CVB3 : *coxsackievirus B3*

DAMP: *damage associated molecular patterns*

DB: *Dense Bodies*

DE: *delayed early protein*

DENV: *dengue virus*

DFCP1: *double FYVE-containing protein 1*

dSTORM: *dual stochastic optical reconstruction microscopy*

EBSS: *Earle's Balanced Salt Solution*

EEA1: *early endosome antigen 1*

ERES: *endoplasmic reticulum exits sites*

ERGIC: *endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment*

ESCRT: *endosomal Sorting Complex Required for Transport*

FIB/SEM: *Focussed Ion Beam milling combined with Scanning Electron Microscopy*

FIP200: *FAK family kinase-interacting protein of 200kDa*

GABARAP: *Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*

GATE-16: *Golgi-associated ATPase Enhancer of 16kDa*

gp: glycoprotéine

HBV: *hepatitis B virus*

HCMV: *cytomégalovirus humain (human cytomegalovirus)*

HCV: *hepatitis C virus*

HHV: *Human Herpesvirus*

HSV-1 ou -2 : *Herpès Simplex Virus 1 ou 2*

IAV : *Influenza A virus*
IE : *immediate early protein*
IFN : interféron
(I ou T)RL : (*Internal or terminal*) *Repeat Long*
IRS : *Internal Repeat Short*
KO : *knock-out*
kpb: kilo paire de base
KSHV : l'herpesvirus associé au Sarcome de Kaposi
L : *late protein*
LAMP : *lysosome-associated membrane protein*
LAP : *LC3-associated phagocytosis*
LB : lumière blanche
LC3 : *microtubule associated protein light chain 3*
LD: goutellettes lipidiques (*lipid droplets*)
LIR : *LC3-interacting region*
MAM : *mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane*
MCP : *major capsid protein*
mCP : protéine mineure de capside
MET : microscopie électronique à transmission
MIEP : *major immediate early promoter*
MOI : multiplicité d'infection
MTOC : *microtubule organisateur center*
mTORC1 : *mammalian target of rapamycin complex 1*
MVB : *multi vesicular bodies*
NC : nucléocapside
NIEP : particules enveloppées non-infectieuses (*non-infectious enveloped particle*)
NLR : *nucleotide oligomerization domain-like receptors*
NRBF2 : *nuclear receptor binding factor 2*
NSF : *N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein*
NT : *non target*
PAMP : *pathogen associated molecular patterns*
PARP1: *poly(ADP-ribose) polymérase 1*
PC : phosphatidylcholine
PDGFR α : *platelet-derived growth factor receptor A*
PE : phosphatidyléthanolamine
PFU : *plaque-forming unit*
PKR/e2ifa : *Protein kinase RNA-activated*

PI : phosphatidylinositol
PI3P : phosphatidylinositol-3-phosphate
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
pp : protéine phosphorylée
PRR : *pattern-recognition receptor*
RE : réticulum endoplasmique
RLR : *RIG-I-like receptors*
SCP : petite protéine de capsid
SNARE : *soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*
SNAP (alpha, beta, gamma) : *Soluble NSF attachment protein*
SNAP-25 : *synaptosomal associated protein 25kDa*
SQSTM1: séquestosome-1
STING : *stimulator of interferon genes*
STX : syntaxine
TGN : *trans-Golgi network*
TLR : *toll-like receptors*
TRS : *terminal repeat short*
TRIM: *tripartite motif-containing*
UL : *unique long*
US : *unique short*
ULK : *Unc-51-like autophagy activating kinase*
vAC : *viral assembly compartment*
VAMP : *vesicle-associated membrane protein*
VIH-1 : virus de l'immunodéficience humaine de type 1
VSV : *vesicular stomatitis virus*
VSP : *vacuolar protein sorting*
VZV : *varicella-zoster virus*
WIPI: *WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*
WT : *wild type*

Table des illustrations

Table des figures

Figure 1 : Structure du Cytomégalo virus humain (HCMV).....	18
Figure 2 : Schéma de l'organisation du génome du HCMV.	19
Figure 3 : Image de microscopie électronique à transmission des différentes formes de capsides du HCMV dans le noyau de cellules infectées.....	20
Figure 4 : Schéma de l'organisation des protéines du HCMV (non à l'échelle).....	21
Figure 5 : Cycle répliquatif HCMV dans des fibroblastes.	26
Figure 6 : Modèle d'entrée du HCMV.	28
Figure 7 : Enveloppement primaire des Herpesvirus, exemple pour HCMV.....	31
Figure 8 : Schémas représentant l'organisation du vAC.	32
Figure 9 : Présentation des différents types d'autophagie.....	42
Figure 10 : Présentation de la (macro)autophagie non sélective.	46
Figure 11 : Présentation des homologues LC3.....	50
Figure 12 : Présentation de la (macro)autophagie sélective.	53
Figure 13 : Exemple de fission et fusion membranaire.	54
Figure 14 : Trafic des membranes pour la formation des autophagosomes.	58
Figure 15 : Schéma général du « <i>cross talk</i> » entre l'inflammasome, la mort cellulaire et l'autophagie.....	64
Figure 16 : Schéma représentant des exemples de subversions de protéines autophagiques.	67
Figure 17 : Schéma représentant des exemples de subversions des membranes autophagiques.....	70
Figure 18 : La lignée HFF CRISPR ATG5 est déficiente en autophagie et présente un défaut de lipidation des protéines LC3.	104
Figure 19 : L'absence de la protéine ATG5 entraîne une diminution de la production virale mais n'impacte ni l'expression des protéines du HCMV ni la formation du vAC.	105
Figure 20 : Etude ultrastructurale des HFF CRISPR ATG5 et HFF WT infectées par HCMV.....	108
Figure 21 : Caractérisation des vésicules présentes dans les HFF CRISPR ATG5 infectées par HCMV.	111
Figure 22 : Les composants du HCMV ne s'accumulent pas dans le noyau des HFF CRISPR ATG5.....	112
Figure 23 : Les virus produits dans les cellules CRISPR ATG5 sont moins infectieux.	115
Figure 24 : La stabilité du HCMV n'est pas significativement impactée par l'absence d'ATG5.....	116
Figure 25 : L'infectivité des virus produits dans les cellules infectées par HCMV « <i>atg5ko</i> » est la même en présence ou non d'ATG5 dans les cellules.	118
Figure 26 : Caractérisation de l'infection par HCMV de la lignée HFF ZsGreen-LC3B.	120

Tableaux

Tableau 1 : Récapitulatifs des rôles des protéines virales.	36
--	----

L'annexe

López Giuliani, A. C., Hernández, E., Tohmé, M. J., **Taisne, C.**, Roldán, J. S., García Samartino, C., Lussignol, M., Codogno, P., Colombo, M. I., Esclatine, A., & Delgui, L. R. (2020). Human Cytomegalovirus Inhibits Autophagy of Renal Tubular Epithelial Cells and Promotes Cellular Enlargement. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 474.

Préambule

L'autophagie est un processus hautement régulé et conservé, décrit comme étant impliqué dans la dégradation et le recyclage de composés cellulaires pour maintenir l'homéostasie voire la survie cellulaire. L'autophagie regroupe toutes les voies permettant d'apporter du matériel cytoplasmique aux lysosomes pour être dégradé. Ce processus cellulaire est constitutif et peut être induit lors de stress comme la carence nutritive, lorsque des organites sont non fonctionnels, lorsque des protéines s'agrègent ou sont mal repliées ou encore lors d'infections par des pathogènes intracellulaires.

Lors d'une infection, les cellules humaines ont développé des mécanismes de défense innée antivirale au sein de l'hôte. Ces mécanismes peuvent être à l'échelle de l'organisme, comme la réponse interféron, permettant d'agir sur les cellules voisines et entraînant la synthèse d'effecteurs antiviraux. Mais ces mécanismes peuvent également être à l'échelle de la cellule, comme l'autophagie, afin d'éliminer directement le pathogène. De façon intéressante, il s'avère que beaucoup de pathogènes se sont adaptés à leur hôte et ont développé des stratégies afin de contrecarrer les stratégies de défense cellulaire.

Le cytomégalovirus humain (HCMV) est un virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*. Ce virus possède un cycle productif (aussi appelé cycle répliatif ou lytique), qui permet la production de virions c'est-à-dire de particules virales infectieuses extracellulaires, et un cycle où se déroule la latence, qui permet au virus de persister à vie dans l'organisme de son hôte. La prévalence du HCMV dans le monde est d'environ 70%, en fonction de la localisation géographique et du statut économique. L'infection par ce virus est généralement asymptomatique, mais il est le premier agent pathogène responsable d'infections congénitales et peut être responsable de graves maladies, pouvant entraîner le décès, chez les patients immunodéprimés.

Au laboratoire, nous nous intéressons au détournement de la machinerie autophagique par les Herpesvirus, notamment : le virus Herpès Simplex de type 1, le virus Epstein-Barr et le HCMV. L'équipe a montré que le HCMV interférait avec le processus autophagique dans des cellules de type fibroblaste. Au cours de l'infection par HCMV, l'autophagie est induite aux temps précoces de l'infection puis, le processus autophagique est inhibé aux dernières étapes, soit la dégradation. Cette inhibition nécessite l'interaction de deux protéines virales (IRS1 et TRS1) avec une protéine autophagique (BECN1). Après avoir caractérisé cette interaction, l'équipe a ensuite montré le rôle bénéfique de l'autophagie sur l'infection par le HCMV dans des fibroblastes humains. Lorsque l'autophagie est stimulée par la carence

nutritive ou par des molécules pharmacologiques, la production virale est augmentée, tandis que l'inhibition de l'autophagie entraîne une diminution de la production virale.

Dans ce manuscrit, je présenterai dans un premier temps des données bibliographiques concernant le HCMV, ainsi qu'une étape clé de son cycle viral, l'enveloppement final du virus. Je décrirai ensuite le processus autophagique ainsi que l'origine des membranes impliquées dans la formation des structures autophagiques. Enfin, je parlerai des défenses antivirales, dont l'autophagie, ainsi que de la mise à profit de l'autophagie par les virus. Dans un second temps, j'exposerai mes travaux de thèse sous forme d'un article publié dans le journal Scientific Reports en 2019, et de résultats complémentaires. Un article, auquel j'ai participé est ajouté en annexe. Pour finir, je conclurai et discuterai des perspectives que ce travail ouvre. Deux autres articles dans lesquels sont utilisés des outils que j'ai réalisés ont été soumis récemment dans 2 journaux différents.

Données bibliographiques

I) Le Cytomégalovirus Humain :

L'ordre des *Herpesvirales* est divisé en 3 familles en fonction de la spécificité d'hôte des virus: les *Herpesviridae* (mammifères, reptiles, oiseaux), *Alloherpesviridae* (grenouilles et poissons) et *Malacoherpesviridae* (mollusques) (Pellet & Roizman, 2007). Ces virus ont un génome ADN double brin, protégé par une capsidie icosaédrique, elle-même entourée d'un tégument le tout enveloppé par une bicouche lipidique dérivée des membranes cellulaires (Figure 1). Parmi les *Herpesviridae*, 8 virus sont responsables de pathologies chez l'Homme et sont appelés « *Human Herpesvirus* » (HHV). Les HHV sont divisés en 3 sous-familles en fonction de leur tropisme cellulaire et des pathologies qui leurs sont associés :

- *Alphaherpesvirinae* : comprenant 3 membres, Herpès Simplex Virus 1 (HSV-1 ou HHV-1) qui provoque l'herpès buccal et de plus en plus fréquemment génital, Herpès Simplex Virus 2 (HSV-2 ou HHV-2), qui provoque l'herpès génital et Varicella-Zoster virus (VZV ou HHV-3) qui est responsable de la varicelle et du zona.

- *Betaherpesvirinae* : comprenant 3 membres, Cytomégalovirus humain (HCMV ou HHV-5) qui fait l'objet de ce manuscrit, HHV-6 qui provoque la roséole infantile et HHV-7, qui n'est associé à aucune pathologie.

- *Gammaherpesvirinae* : comprenant 2 membres, Epstein-Barr virus (EBV ou HHV-4) qui provoque la mononucléose infectieuse, des lymphomes de Burkitt ou encore des carcinomes nasopharyngés, et enfin l'herpesvirus associé au Sarcome de Kaposi (KSHV ou HHV-8) qui provoque le sarcome de Kaposi, la maladie de Castleman ou encore le lymphome primitif des séreuses.

Le HCMV, anciennement connu sous le nom de « *Salivary gland virus* » responsable de la maladie des inclusions cytomégaliqes, a été isolé pour la première fois chez l'Homme en 1956-57 par les groupes de Smith M.G, Huebner RJ et Wirth P (Rowe et al., 1956; M. G. Smith, 1956; Weller et al., 1957). Le nom du HCMV provient du grec « *cyto* » et « *megalo* » qui veut dire « grosse cellule » à cause de son effet cytopathique qui est d'augmenter la taille des cellules et de provoquer des inclusions nucléaires et cytoplasmiques. Les virus du genre cytomégalovirus ont un spectre d'hôte très étroit. Le HCMV est donc spécifique de l'homme et un grand nombre de types cellulaires d'origine ectodermique, endodermique ou encore mésodermique sont infectables *in vivo* (Mocarski Jr. et al., 2007; C. Sinzger et al., 2008). Cependant, *in vitro*, HCMV est très souvent étudié dans les cellules fibroblastiques, dans lesquelles la production virale est la plus efficace. La production de stocks viraux dans ces

cellules entraîne une perte du tropisme endothélial pour ces virus et l'apparition de variants génétiques (C. Sinzger et al., 1999). L'apparition de ces différents variants peut rendre difficile la culture *in vitro* du HCMV dans des cellules autres que fibroblastiques.

En clinique, l'infection par le HCMV est généralement asymptomatique chez les personnes immunocompétentes, mais elle peut être responsable de manifestations cliniques sévères chez les sujets immunodéprimés. Elle est également la première cause d'infection congénitale dans le monde (Subramaniam & Britt, 2018). Après la primo-infection, c'est-à-dire après que le virus a diffusé dans l'organisme, il peut persister dans la moelle osseuse sous forme latente dans les cellules myéloïdes ou les cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Collins-McMillen et al., 2018; Goodrum et al., 2012; M Reeves & Sinclair, 2008). Lors de la latence, la production virale est inhibée mais certains gènes viraux et des protéines de latence s'expriment (Landolfo et al., 2003; M Reeves & Sinclair, 2008). Le cycle productif peut être réactivé lors de la différenciation cellulaire ou encore un stress lié à la réponse immunitaire, et entraîner la production de particules virales infectieuses, on parle alors de récurrence (Collins-McMillen et al., 2018).

I.1. Structure du virus

La structure du HCMV est caractéristique des Herpesvirus : il est composé d'un ADN double brin linéaire, d'une capsidie icosaédrique de 162 capsomères et d'une enveloppe virale dérivant de membranes cellulaires qui est décorée de protéines virales (Pellet & Roizman, 2007). Les Herpesvirus possèdent un tégument situé entre la capsidie et l'enveloppe virale (Figure 1).

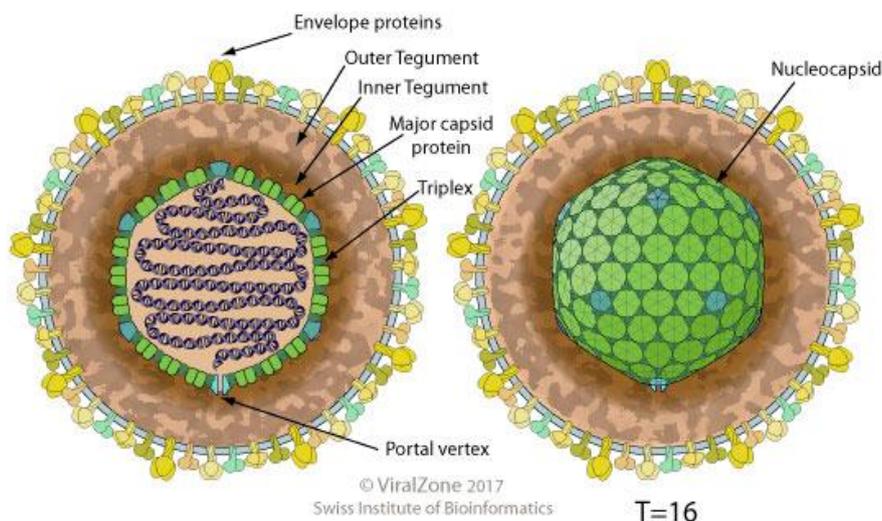


Figure 1 : Structure du Cytomégalovirus humain (HCMV).

HCMV est un virus à ADN double brin linéaire inclus dans une capsidie formée par des protéines. La capsidie est sous forme d'icosaèdre composée de 162 capsomères. Cette nucléocapsidie est entourée

d'un ensemble de protéines et ARNm formant le tégument. La particule virale (ou virion), comporte une enveloppe dérivée des membranes cellulaires, décorées par des glycoprotéines virales. D'après Viral Zone https://viralzone.expasy.org/180?outline=all_by_species.

I.1.a. La nucléocapside

Le génome du HCMV est un ADN double brin linéaire d'une taille de 236 kpb et code pour des protéines et des microARN (Mocarski Jr. et al., 2007; Mohammad et al., 2017). Son génome est organisé en deux segments uniques UL et US (pour *Unique Long* et *Unique Short*). Ces deux segments sont séparés par un petit segment interne IRS (pour *Internal Repeat Short*). Le génome possède à ses extrémités les séquences répétées et inversées RL (ou TRL) coté UL et TRS coté US (pour *Terminal Repeat Long* ou *Terminal Repeat Short*) (Figure 2) (Murphy & Shenk, 2008). Chacun de ces segments codent pour des gènes viraux nommés en fonction de leur localisation et leur ordre d'apparition sur le génome, par exemple UL32 est le 32^{ème} gène du segment UL. C'est cette nomenclature qui est le plus souvent retrouvée dans la littérature. Il est également possible de nommer les protéines soit avec un préfixe « pp » pour « protéine phosphorylée », soit « gp » ou « g » pour « glycoprotéine » suivie de leur taille moléculaire en kDa, par exemple pp65. Certaines protéines ont des acronymes c'est le cas par exemple de « la protéine majeure de la capsid » MCP pour « *major capsid protein* ».

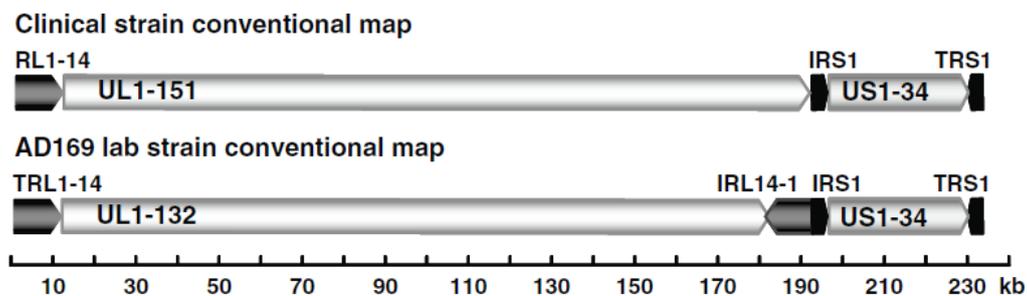


Figure 2 : Schéma de l'organisation du génome du HCMV.

En haut, représentation conventionnelle du génome de souche isolée de patient. En bas, représentation conventionnelle du génome de la souche de laboratoire AD169. Les flèches indiquent l'orientation des gènes et la région RL est répétée pour la souche AD169 et désigne les régions TRL et IRL. D'après « *Human Cytomegalovirus Genome* » de E. Murphy, T. Shenk, 2008.

La capsid du HCMV est un icosaèdre de diamètre d'environ 130 nm, composée de 162 sous-unités appelées capsomères. La capsid contient 12 pentons (en bleu Figure 1), 11 sont formés de 5 copies de la protéine majeure de capsid MCP (ou encore pUL83 car codée par le gène UL83) et le dernier penton est formé de pUL104 et constitue le portail utilisé lors de l'encapsidation du génome. La capsid est également constituée de 150 hexons (en vert

Figure 1), formés de 6 copies de MCP chacune associées à la petite protéine de capsid SCP (ou encore pUL48/49). Les capsomères sont maintenus et stabilisés par 320 hétérotrimères formés de la protéine mineure de capsid (mCP ou pUL85) et de la protéine de liaison à mCP (ou pUL46) (Butcher et al., 1998; Chen et al., 1999; Gibson, 2008). Au cours de l'infection, plusieurs formes de capsid peuvent être observées (Figure 3) (Butcher et al., 1998; Gibson, 2008; Sintorn et al., 2004):

- La capsid A est dépourvue de génome et ne comporte que la « coquille » soit la structure,
- La capsid B comporte tous les éléments de la capsid A plus des peptides codés par UL80 formant l'échafaudage,
- La capsid C est la version mature de la capsid contenant l'ADN condensé, avec des protéines du tégument, associées à la capsid, c'est ce qu'on appelle la nucléocapsid (NC).

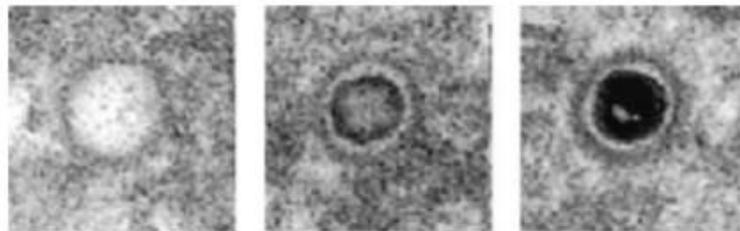


Figure 3 : Image de microscopie électronique à transmission des différentes formes de capsid du HCMV dans le noyau de cellules infectées.

A gauche : la capsid A, il s'agit de la forme vide de la capsid, au centre : la capsid B, est la forme la plus retrouvée dans les noyaux de cellules infectées. Le cercle dense aux électrons représente les protéines d'échafaudage codées par UL80. A droite : la capsid C est la forme mature contenant l'ADN compacté dense aux électrons. D'après « *A refined circular template matching method for classification of human cytomegalovirus capsids in TEM images* » de Sintorn et al. 2004

La capsid B représente la forme immature la plus souvent retrouvée dans le noyau des cellules infectées. Les protéines codées par le gène UL80 jouent un rôle dans la formation de la capsid et dans l'encapsidation du génome de HCMV. Une fois l'ADN encapsidé, ces protéines ne sont plus présentes dans la particule virale (Gibson, 2008).

I.1.b. Le tégument

La NC est entourée d'une couche, appelée tégument, caractéristique des Herpesvirus. Le tégument est composé d'un grand nombre de protéines et d'ARN viraux et cellulaires, ce qui le rend très dense, et d'apparence relativement amorphe (Bresnahan & Shenk, 2000; Laine et

al., 2015; Mocarski Jr. et al., 2007; Mohammad et al., 2017). Les protéines virales qui le composent sont des protéines structurales majoritairement phosphorylées ayant un rôle dans les premières étapes du cycle viral et/ou dans les étapes plus tardives. J'ai choisi de présenter dans ce manuscrit 6 protéines virales majeures du tégment (Figure 4 et Tableau 1).

Trois protéines du tégment sont décrites pour être associées à la NC, dans la partie interne du tégment : pUL47, pUL48 et pUL32 (ou pp150) (Kalejta, 2008). L'infection par un virus mutant n'exprimant pas pUL47 entraîne un retard du cycle dans les étape précoces (Bechtel & Shenk, 2002). Il semblerait que l'association de pUL47 avec pUL48 participe à la décapsidation au niveau de la membrane nucléaire. La protéine pUL32 (pp150), d'une taille de 150 kDa, est la deuxième protéine la plus abondante du tégment (Tomtishen III, 2012). Une étude de reconstruction 3D montre que pp150 est associée à la NC par l'intermédiaire de SCP (Dai et al., 2013). Cette association permet de stabiliser la NC, lorsqu'elle est dans le cytoplasme (AuCoin et al., 2006; Tandon & Mocarski, 2011).

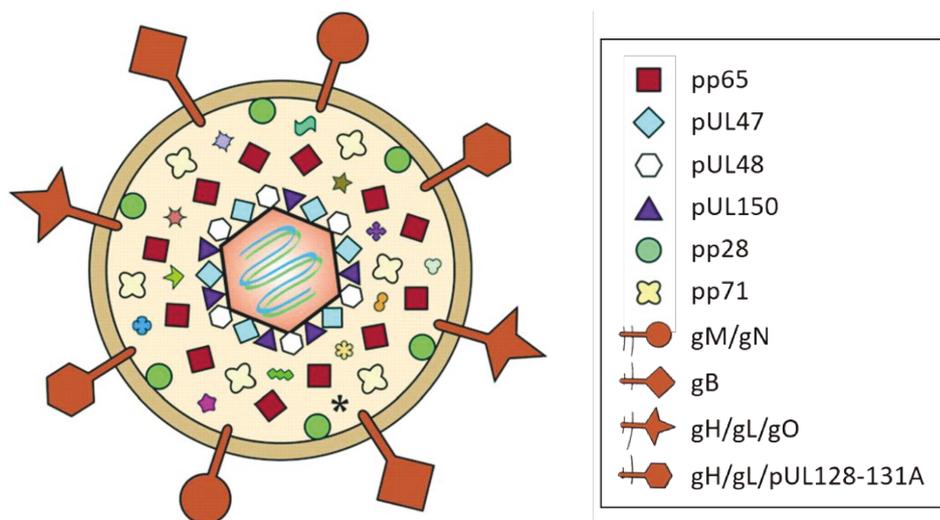


Figure 4 : Schéma de l'organisation des protéines du HCMV (non à l'échelle).

Le tégment est divisé en deux parties : la partie externe où sont représentées les protéines pp28 et pp71, et la partie interne où sont représentées les protéines associées à la NC : pUL47, pUL48 et pp150. La protéine pp65 est la protéine majoritaire du tégment et est présente à la fois dans le tégment interne et externe. A la surface de la particule sont schématisées les glycoprotéines présentes au niveau de l'enveloppe virale. D'après « *Tegment Proteins of Human Cytomegalovirus* » de R.F. Kalejta, 2008

La protéine codée par UL83 (pp65) est la protéine du tégment la plus abondante dans la particule virale (Tomtishen III, 2012). Elle est située à la fois dans le tégment interne et dans le tégment externe. La protéine pp65 est impliquée dans l'échappement de la réponse immunitaire innée et adaptative (Kalejta, 2008). Cette protéine possède une activité catalytique permettant la phosphorylation de certaines protéines virales. Cette modification

post-traductionnelle permet d'empêcher la présentation des antigènes viraux par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, ce qui limite la réponse immunitaire. De plus, son activité kinase entraîne la dégradation du CMH de classe II via la voie lysosomale, ainsi que l'atténuation de la réponse à l'interféron bêta (Kalejta, 2008; Tomtishen III, 2012). Le rôle de pp65 est donc important dans l'évasion immunitaire. De par sa localisation nucléaire, elle fonctionne également comme un activateur transcriptionnel en se fixant sur le MIEP (pour *major immediate early promoter*) (Cristea et al., 2010).

Les autres protéines essentielles se trouvent dans la partie externe du tégument (Kalejta, 2008). La protéine codée par UL82 (pp71) est une protéine homologue à pp65 jouant un rôle tout au long du cycle viral. Elle a été décrite comme étant un des activateurs transcriptionnels des protéines très précoces du HCMV (Bresnahan & Shenk, 2000). Sa localisation subcellulaire est un facteur déterminant pour le déroulement du cycle (voir I.2). L'ensemble des rôles de pp71 n'est pas encore totalement décrit, mais elle semble avoir aussi un rôle dans l'évasion immunitaire de l'hôte (Kalejta & Albright, 2020). Elle contrecarre l'immunité innée, via son interaction avec la protéine STING (protéine ayant pour rôle d'activer la réponse interféron), ce qui empêche la production d'interféron et elle contrecarre l'immunité adaptative, en bloquant la production du CMH de classe I. Il semblerait que seul son rôle de transactivateur soit réellement indispensable lors du cycle viral tandis que l'évasion immunitaire n'est pas propre à pp71 et peut être apportée par d'autres protéines virales.

La protéine codée par UL99 (pp28) est décrite comme étant importante lors des étapes tardives du cycle viral. Cette protéine est soluble mais est associée aux membranes cellulaires au niveau du site d'assemblage cytoplasmique du virus qui sera décrit plus loin (voir la section I.2.d) (Sanchez, Sztul, et al., 2000). Cette association serait possible grâce à sa myristoylation. Cette modification « post-traductionnelle » se déroule au niveau des polyribosomes lors de la traduction des protéines et pourrait participer à l'association de pp28 aux membranes. Cette protéine est importante pour les étapes tardives du cycle viral, notamment lors de la mise en place de l'enveloppe virale (Tomtishen III, 2012).

Quatre autres protéines du tégument seront évoquées plus tard dans ce manuscrit, les protéines IRS1 et TRS1, pUL71 ainsi que pUL69.

I.1.c. L'enveloppe et les glycoprotéines

Le HCMV code pour des protéines transmembranaires intégrées à la surface de l'enveloppe virale lui permettant de se lier aux cellules et de les infecter, et dans certains cas

participant à l'évasion immunitaire (Foglierini et al., 2019). Les protéines dont j'ai choisi de parler dans ce manuscrit sont les glycoprotéines permettant l'entrée du virus dans la cellule hôte (Figure 4 et Tableau 1). Certaines sont regroupées en complexe et forment le trimère gH/gL/gO ou le pentamère gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A (Foglierini et al., 2019; Isaacson et al., 2008). La glycoprotéine gM est très conservée au sein des Herpesvirus, et est composée de sept domaines transmembranaires. Associée à la protéine gN, cet hétérodimère est le complexe le plus abondant à la surface du virus et joue un rôle dans l'étape d'adsorption du virion, permettant de le stabiliser à la surface de la cellule (Varnum et al., 2004). La protéine gB ne forme pas de complexe, et elle est la deuxième protéine d'enveloppe la plus abondante.

Le HCMV est un virus capable d'infecter, *in vivo*, un grand nombre de types cellulaires, notamment les cellules épithéliales, endothéliales, fibroblastiques, myéloïdes, ou encore neuronales. Cependant, tous les types cellulaires ne sont pas infectables par le HCMV *in vitro*. Le plus souvent, l'infection y est abortive, le virus entre dans la cellule mais la réplication du génome et la production virale n'ont pas lieu. En conséquence, la plupart des études faites sur ce virus ont été réalisées dans des fibroblastes, dans lesquelles le cycle est plus rapide et la production de virus y est plus efficace. Certaines souches virales ont un tropisme plus large que d'autres, notamment un tropisme endothélial. Le tropisme dépend des glycoprotéines de l'enveloppe virale mais aussi de certaines protéines du tégument (C. Sinzger et al., 2008).

Lors de l'infection par HCMV, toute la dynamique cellulaire est affectée, notamment le cycle cellulaire, la morphologie ou encore le métabolome (Jean Beltran et al., 2016; Lu & Shenk, 1999; Munger et al., 2006; Wiebusch & Hagemeyer, 1999). Le virus détourne la machinerie cellulaire à son profit afin d'utiliser l'énergie ou d'autres composés que la cellule produit. Pour sortir de la cellule, le virus utilise les membranes cellulaires pour s'envelopper, ce qui suggère que leur composition soit influencée par l'infection. Par exemple, l'infection par HCMV augmente la glycolyse de la cellule, ce qui accentue le flux de carbone et favorise la synthèse d'acide gras à longue chaîne présent dans les membranes cellulaires, participant à la courbure des membranes (McMahon & Gallop, 2005; Koyuncu et al., 2013). La composition lipidique de l'enveloppe de HCMV est différente de celle de la membrane plasmique, ce qui montre que le virus utilise les membranes d'organites spécialisés et non pas la membrane plasmique (Liu et al., 2011). D'autres marqueurs d'organites cellulaires sont présents au niveau de l'enveloppe virale en fonction des membranes utilisées par HCMV.

I.1.d. Les différentes souches virales du HCMV

Le HCMV est responsable d'infections pouvant engendrer de graves lésions et maladies chez les fœtus ou encore chez les personnes immunodéprimées. Dans les années 50, des souches de HCMV ont été isolées d'enfants infectés et dans les années 70, des chercheurs ont tenté de créer des souches atténuées pour la vaccination. C'est le cas par exemple de la souche Towne qui provient d'une souche isolée à partir d'urines d'un enfant infecté et qui a été obtenue après 128 passages dans des fibroblastes (Plotkin et al., 1975). C'est le cas également de la souche AD169, issue de tissu adénoïde, qui a été atténuée après passage sur différents types cellulaires et utilisée pour immuniser des adultes volontaires (Elek & Stern, 1974; Rowe et al., 1956). Ces souches Towne et AD169 ont été isolées de patients différents mais ont des mutations très similaires. Ces potentiels candidats vaccins n'ont pas permis d'obtenir une immunité vaccinale, mais ces souches ont été largement utilisées en laboratoire grâce à leur capacité à se multiplier plus rapidement dans les fibroblastes et avec un taux de production supérieur aux souches cliniques (Mocarski Jr. et al., 2007; Murphy & Shenk, 2008). Après les différents passages, dans ce type cellulaire les souches virales ont subi des divergences sur leurs propriétés biologiques et des divergences génomiques affectant leurs propriétés biologiques. Leurs génomes ont subi de larges mutations comme de grandes délétions voire des duplications de séquence entraînant la perte de leur capacité à infecter de façon efficace les autres types cellulaires comme les cellules épithéliales, endothéliales, musculaires ou encore les macrophages (Murphy & Shenk, 2008; Wilkinson et al., 2015). Ces mutations se trouvent sur des gènes codant pour des protéines d'enveloppe (même putatives) ou associées à la membrane (Dolan et al., 2004). Pour la souche AD169, il existe trois variants séquencés et disponibles dans le monde : AD169varUC (University of Chicago), AD169varUK (University of Cambridge) et AD169varATCC (American Type Culture Collection) (Frascaroli & Sinzger, 2014; Wilkinson et al., 2015).

Afin de conserver les modifications génétiques et d'éviter de trop grandes dérives génétiques entre les laboratoires, il est possible de cloner le génome de HCMV dans des chromosomes bactériens artificiels BACmide (*bacterial artificial chromosome plasmide*). Les BACmides se répliquent de l'ordre de 1 à 2 copies / cellule ce qui permet de palier à des mutations rapides du génome viral et surtout, c'est un vecteur qui peut contenir un ADN pouvant aller jusqu'à 300 kpb. Cinq souches de HCMV ont été isolées de patients, puis amplifiées avec très peu de passages dans des fibroblastes et ont été séquencées soit avant soit après clonage dans des BACmides. Les souches FIX, TR, PH et Toledo ont été clonées dans

des plasmides BAC puis séquencées et la souche Merlin a été amplifiée dans des fibroblastes puis son ADN a été séquencé sans clonage préalable (Dolan et al., 2004; Murphy & Shenk, 2008). La souche TB40 a été isolée puis mise en culture sur des fibroblastes (peu de passages) pour être amplifiée sur deux types cellulaires, des fibroblastes ou sur des cellules endothéliales (C. Sinzger et al., 1999). Les virus TB40 cultivés dans des fibroblastes (TB40/F) ont perdu la capacité d'infecter les cellules endothéliales, et inversement pour les virus TB40 cultivés sur cellules endothéliales (TB40/E). On dit que ces souches ont des tropismes stricts pour un type cellulaire donné. De la même façon, les souches TB40 ont été clonées dans des BACmides (Christian Sinzger et al., 2008). La création de BACmide n'est pas sans conséquence puisque le génome de HCMV peut contenir d'autres mutations liées au BACmide comme la souche TB40-BAC4 qui comporte les mutations de la souche TB40/E plus une délétion des gènes codant pour d'autres protéines (Frascaroli & Sinzger, 2014). C'est pourquoi, il est possible de pallier ces mutations, c'est le cas de la souche AD169 pour laquelle il existe les clones pHB5 et HB15 ayant pour le premier des mutations pour les gènes US2 à US6 et pour le deuxième une réintroduction des gènes mutés (Ostermann et al., 2016).

Le fait de cultiver les souches de HCMV *in vitro* entraîne de la dérive génétique ce qui les éloignent des souches cliniques isolées de patients. La raison pour laquelle les laboratoires travaillent préférentiellement sur ces souches de laboratoire est leur efficacité de production, de l'ordre de 10^4 plaque-forming unit/mL (PFU/mL) dans des fibroblastes après 4-5 jours d'infection. De plus, l'utilisation des BACmides est très répandue car il est facile de manipuler le génome viral. Ils peuvent être utilisés pour contrôler l'expression de certains gènes viraux comme lors de génération de virus déficients pour une protéine donnée ou pour fusionner une protéine virale avec une étiquette fluorescente par exemple.

Au cours de mon projet de thèse, nous avons préférentiellement travaillé avec la souche AD169varATCC et nous avons confirmé certains résultats avec la souche TB40/E.

I.2. Cycle viral

Les Herpesvirus ont la particularité d'avoir deux cycles, un cycle productif (ou réplicatif) et un cycle où se déroule la latence. Pour l'étude *in vitro* de la latence, l'infection est réalisée dans des macrophages. L'étude *in vitro* du cycle productif se fait principalement dans des fibroblastes. Il faut environ 72h au HCMV pour produire de nouvelles particules virales et le niveau maximal de production est observé à partir de 96h après infection, pouvant durer plusieurs jours dans les fibroblastes (Mocarski Jr. et al., 2007). Après l'entrée du virus,

les protéines très précoces, précoces et tardives sont exprimées de façon séquentielle. Lors du cycle productif, la cellule est réarrangée par le HCMV et le volume du cytoplasme est augmenté au cours de l'infection (Figure 5). A l'issue du cycle répliatif, trois types de particules virales sont produits (Irmier & Gibson, 1983) :

- Les virions, qui sont les particules enveloppées et infectieuses, comportant la NC entourée du tégument.
- Les particules enveloppées non-infectieuses (NIEP pour *non-infectious enveloped particle*), sont des particules dont la structure (enveloppe et protéines du tégument) ainsi que la forme et la taille sont les mêmes que les virions. En revanche, les NIEP possèdent la forme B de la capsid, riche en protéines d'échafaudage et dépourvue de génome viral.
- Les corps denses (DB pour *Dense Bodies*), sont des particules ayant la même enveloppe virale que les virions et les NIEP, mais dépourvue de la NC et de la majorité des protéines du tégument. La protéine pp65 est la plus abondante, ce qui rend les DB très denses. Les DB sont plus grands que les virions et ont des tailles très hétérogènes allant de 250 à 600 nm de diamètre.

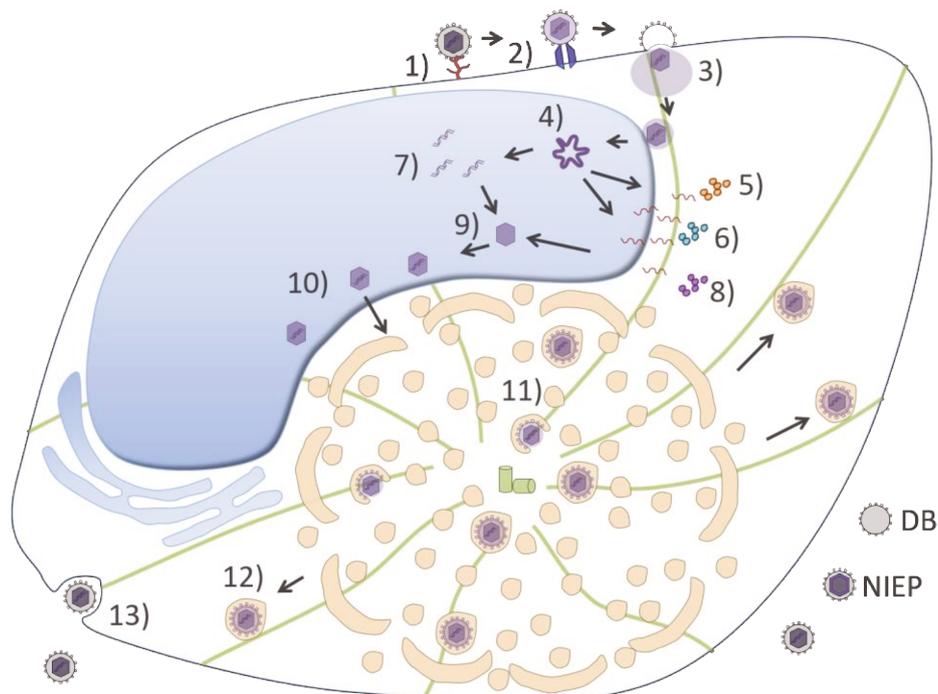


Figure 5 : Cycle répliatif HCMV dans des fibroblastes.

1) Le virus s'adsorbe à la surface de la cellule hôte via une liaison aux héparanes sulfates, 2) puis les glycoprotéines virales interagissent avec le récepteur cellulaire PDGFR α . 3) Le virus fusionne directement avec la membrane plasmique de la cellule afin de libérer la nucléocapside (NC) et les protéines du tégument dans le cytoplasme. La NC associée à des protéines du tégument est acheminée

au niveau du noyau via le cytosquelette, et l'ADN viral est libéré dans le noyau après décapsidation. **4)** Après circularisation du génome viral, a lieu l'étape d'expression des protéines **5)** très précoces puis **6)** des protéines précoces. **7)** L'étape de réplication par l'ADN polymérase virale permet l'amplification du génome viral par concatémérisation de l'ADN linéaire. **8)** Enfin, il y a expression des protéines tardives. **9)** La NC est ensuite assemblée dans le noyau et **10)** une première étape d'enveloppement est réalisée au niveau de l'enveloppe nucléaire. **11)** Dans le cytoplasme a lieu une réorganisation des organites cellulaires pour former le compartiment d'assemblage viral (vAC). Ce compartiment, non délimité par une membrane, est notamment composé d'endosomes, de l'appareil de Golgi et des protéines virales comme les protéines du tégument et les glycoprotéines d'enveloppe. Les protéines du tégument sont recrutées au vAC et la deuxième et dernière étape d'enveloppement est réalisée. **12)** Une fois l'assemblage du virus terminé, le virus enveloppé se trouve dans une vésicule et **13)** sort par exocytose. Au cours du cycle viral, trois types de particules sont formées : les DB, les NIEP et les virions.

1.2.a. L'entrée du HCMV

Dans un premier temps, le virus s'adsorbe à la surface de la cellule hôte en fonction de son tropisme cellulaire. Il semblerait que le virus privilégie des portions de membranes riches en cholestérol, qu'on appelle des radeaux lipidiques, favorisant l'interaction de gB à la cellule (Gudleski-O'Regan et al., 2012; Patrone et al., 2016). En effet, l'utilisation de siARN dirigés contre un récepteur du cholestérol augmente la quantité de cholestérol à la membrane plasmique et augmente aussi la production virale (Gudleski-O'Regan et al., 2012). Le tropisme du virus est dû à la présence sur son enveloppe de certains complexes de glycoprotéines : le trimère gH/gL/gO qui permet l'entrée dans tous les types cellulaires, et le pentamère gH/gL/pUL128-131A qui est essentiel pour l'entrée du virus dans les cellules épithéliales, endothéliales et monocytes/macrophages (Fogliarini et al., 2019; Isaacson et al., 2008).

Le HCMV se stabilise à la surface de la cellule et interagit avec un/des récepteur(s) cellulaire(s) spécifique(s). La nature des récepteurs et corécepteurs du HCMV reste encore controversée mais plusieurs molécules ont été proposées. D'après les données les plus récentes, il semblerait que le trimère gH/gL/gO interagisse avec le PDGFR α (récepteur des facteurs de croissance dérivés de plaquettes) et le pentamère gH/gL/pUL128-131A avec la Neuropilin2 ou l'OR14I1 (Figure 6) (Gerna et al., 2019; Kabanova et al., 2016; Martinez-Martin et al., 2018). Dans les deux cas, l'interaction du HCMV avec son récepteur entraîne la fusion de l'enveloppe virale avec une membrane cellulaire grâce à la protéine virale gB, qui agit comme une protéine de fusion. Suivant le type cellulaire infecté, le virus entre soit par fusion directe avec la membrane plasmique à pH neutre (ex : fibroblastes), soit par endocytose puis fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale après abaissement du pH

(ex : cellules endothéliales), afin de libérer la NC dans le cytoplasme (Gerna et al., 2019; Isaacson et al., 2008). Les étapes d'adsorption et de fusion membranaire entraînent une première réponse immunitaire de la part de la cellule hôte, comme l'activation de la réponse inflammatoire. Il a été décrit que la simple adsorption des glycoprotéines aux récepteurs cellulaires entraîne la production de cytokines inflammatoires.

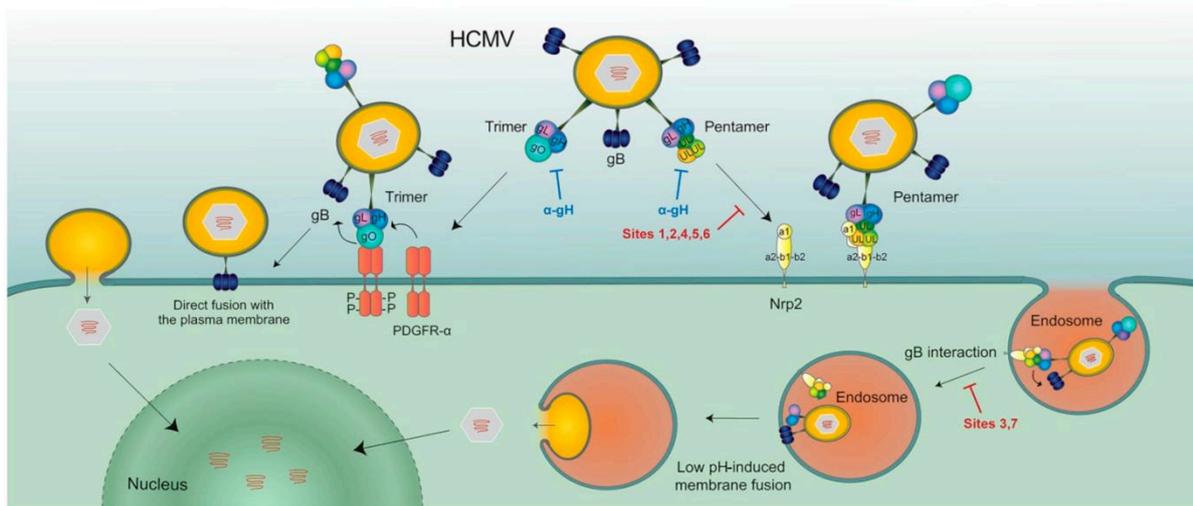


Figure 6 : Modèle d'entrée du HCMV.

Après adsorption, le virus est stabilisé soit (schématisé à gauche) par l'interaction entre le trimère gH/gL/gO et le récepteur PDGFR α entraînant la fusion à pH neutre médiée par la glycoprotéine gB, soit (schématisé à droite) par l'interaction entre le pentamère gHgLpUL128-131A et le récepteur Neuropilin2 (ou Nrp2) entraînant l'entrée par endocytose puis fusion à pH bas médiée par la gB. Le tégment est ensuite libéré dans le cytoplasme ainsi que la nucléocapside. D'après « *Human Cytomegalovirus Cell Tropism and Host Cell Receptors* » Gerna et al. 2019.

Après cette première étape d'entrée, la NC est libérée dans le cytoplasme. Certaines protéines du tégment sont également libérées dans le cytoplasme, telle que pUL69 qui va participer à l'arrêt du cycle cellulaire en stade G1, c'est-à-dire l'interruption de la réplication cellulaire (Lu & Shenk, 1999; Wiebusch & Hagemeyer, 1999). D'autres vont directement migrer au noyau grâce à leur séquence de localisation nucléaire, comme pp71 ou pp65. La NC est directement acheminée au noyau grâce aux protéines virales liées à la NC qui interagissent avec le cytosquelette, pour permettre la décapsulation, c'est-à-dire l'injection de l'ADN viral dans le noyau via la protéine portail pUL104 (Ogawa-Goto et al., 2003). Les protéines du tégment pUL47 et pUL48 ont probablement un rôle dans la décapsulation du génome viral, en plus de la pression exercée par la capsid.

I.2.b. L'expression des protéines et réplication du génome du HCMV

C'est à cette étape que se met en place le cycle productif ou la latence. Dans le premier cas, il y aura production de particules virales, et dans le second cas, le génome restera sous forme d'épisome dans le noyau (Mocarski Jr. et al., 2007). Je me suis focalisée sur le cycle productif que je vais détailler, et j'aborderai la latence plus loin dans le manuscrit (voir la section I.2.e).

L'expression des protéines virales détermine la mise en place du cycle productif. La présence des facteurs de transcription dans le noyau permet la synthèse des protéines virales, en commençant par la transcription des ARNm viraux dans le noyau et la traduction de ces ARNm en protéines. Certaines protéines ont des fonctions dans le cytoplasme, d'autres sont amenées dans le noyau soit grâce à des séquences de localisation nucléaire, comme la protéine pUL48, soit grâce à d'autres protéines, comme MCP qui requiert la protéine UL80 pour être localisée dans le noyau (Brock et al., 2013; Gibson, 2008).

Les protéines chez les Herpesvirus sont divisées en trois classes, suivant leur cinétique d'expression (Pellet & Roizman, 2007). Les protéines α sont dites très précoces (IE pour *immediate early*), les β sont les précoces (DE pour *delayed early*) et enfin les γ sont les tardives (L pour *late*). Cette catégorisation des protéines est très souvent remise en cause. Par exemple, certaines protéines sont faiblement exprimées très tôt dans le cycle mais leur pic d'expression est plus tardif dans le cycle. Elles seront donc considérées comme des DE et non pas des IE. Très vite après l'entrée du virus et la décapsidation du génome viral dans le noyau, les protéines IE sont exprimées. Cette première étape requiert la présence des protéines du tégment pp71 et pp65 dans le noyau. La protéine pp71 entraîne la dégradation via le protéasome des répresseurs transcriptionnels cellulaires tandis que pp65 recrute un activateur transcriptionnel cellulaire au niveau du MIEP (Cristea et al., 2010; Kalejta & Albright, 2020). Ce mécanisme permet donc l'initiation du cycle productif viral et la synthèse des protéines IE telles que IE1 (UL72), IE2 (UL86) (Bresnahan & Shenk, 2000). Les protéines IE1 et IE2 sont les protéines les plus abondantes. La protéine IE2 est indispensable pour la réplication du HCMV, tandis que l'infection par un virus mutant n'exprimant pas IE1 n'impacte pas la réplication à une multiplicité d'infection (MOI) élevée, mais la réplication est atténuée à faible MOI dans des fibroblastes (Greaves & Mocarski, 1998). La protéine IE2 est un transactivateur des gènes codant pour les protéines DE, mais également un répresseur transcriptionnel notamment de sa propre synthèse, permettant sa régulation. Les protéines IE1 et IE2 ont de nombreux rôles : anti-apoptotique, inhibition de la progression du cycle

cellulaire, modification des histones cellulaires, inhibition de l'activation de gènes cellulaires impliqués dans la sécrétion de chimiokines ou dans la voie NF- κ B (Paulus & Nevels, 2009; Wiebusch & Hagemeyer, 1999). Les protéines IRS1 et TRS1 sont des protéines IE, mais atteignent un pic d'expression correspondant à des protéines DE (Romanowski et al., 1997). IRS1 et TRS1 interagissent directement avec la protéine kinase R (PKR) qui lorsqu'elle est activée, permet l'arrêt de la synthèse protéique et donc le contrôle de la multiplication virale (Ziehr et al., 2016). L'expression des protéines très précoces détermine le bon déroulement du cycle viral de façon séquentielle, dans les fibroblastes humains (Paulus & Nevels, 2009).

L'expression des protéines DE, telles que l'ADN polymérase virale ou certaines protéines impliquées dans la maturation de la capsid, ou encore certaines protéines du tégment, suit l'expression des protéines IE (Mocarski Jr. et al., 2007). Puis le génome du HCMV est répliqué au niveau de l'origine de répllication *oriLyt* située au milieu du segment UL, une séquence conservée au sein des Bétaherpesvirus (Murphy & Shenk, 2008). Le génome est amplifié par répllication circulaire pour former un concatémère, c'est-à-dire une seule molécule d'ADN contenant plusieurs copies du génome viral. Une fois l'ADN amplifié, il y a expression des protéines tardives. Ces protéines sont essentiellement des protéines structurales, comme les protéines de capsid, les protéines du tégment ou encore les glycoprotéines d'enveloppe. Très vite, certaines protéines sont recrutées dans le noyau pour former la capsid et permettre l'encapsidation de l'ADN, tandis que les autres protéines restent dans le cytoplasme afin de préparer les étapes finales du cycle viral. Les protéines de l'enveloppe étant membranaires, elles empruntent la voie d'acheminement des protéines transmembranaires c'est-à-dire via le réticulum endoplasmique (RE) et le *Trans-Golgi network* (TGN).

I.2.c. L'encapsidation et l'enveloppement primaire

Après l'expression des protéines du HCMV, a lieu la première étape d'assemblage des particules virales, l'assemblage de la NC dans le noyau. MCP ne comporte pas de séquence de localisation nucléaire et nécessite donc des protéines « d'échafaudage », codée par le gène UL80, permettant son acheminement dans le noyau (Gibson, 2008). La forme B de la capsid est la forme la plus abondante dans le noyau de cellules infectées (Figure 3). L'ADN viral est ensuite encapsidé et scindé pour n'obtenir qu'une copie par capsid. Le génome du HCMV est le plus grand des génomes des Herpesvirus (environ 1,5 fois plus grand que HSV-1) mais la taille de la capsid est quasiment similaire (environ 125 nm pour HSV-1). L'encapsidation

nécessite donc une grande pression d’empaquetage. La NC est ensuite associée aux protéines du tégument pUL47, pUL48 et pp150 dans le noyau, pour permettre sa stabilisation (AuCoin et al., 2006; Dai et al., 2013). La NC ne peut donc pas passer les pores nucléaires pour se retrouver dans le cytoplasme. C’est pour cela que des protéines du HCMV forment un complexe dit « de sortie nucléaire » et vont modifier la lamina nucléaire et permettre un premier enveloppement de la NC au travers de la membrane nucléaire interne (Muranyi et al., 2002; Sharma et al., 2014). Ce complexe de sortie nucléaire est formé par les protéines pUL50, pUL53 et pUL97 et permet l’association de la capside à la lamina nucléaire (Milbradt et al., 2018). Les particules enveloppées se retrouvent dans l’espace périnucléaire, puis l’enveloppe virale est perdue après sa fusion avec la membrane externe du noyau et la NC est libérée dans le cytoplasme (Figure 7).

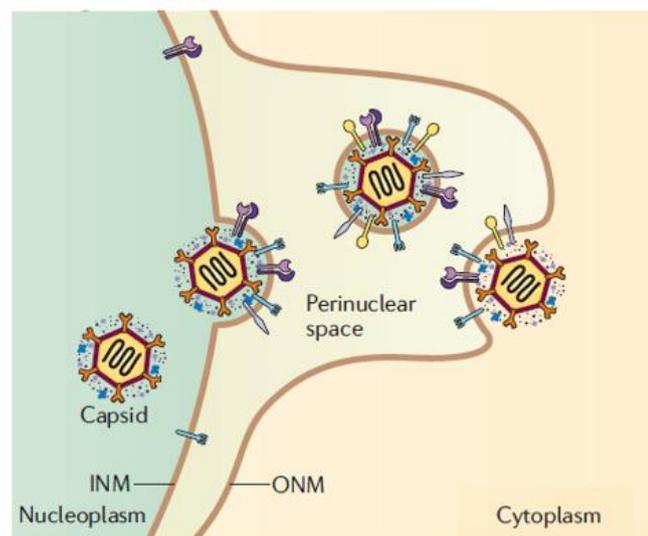


Figure 7 : Enveloppement primaire des Herpesvirus, exemple pour HCMV.

La nucléocapside (NC) est formée dans le noyau (*nucleoplasm*) puis les protéines du tégument pUL47, pUL48 et pp150 viennent s’associer à la NC pour la stabiliser. Dans un premier temps, les protéines pUL50, pUL53 et pUL97 vont modifier la lamina nucléaire afin de permettre un premier enveloppement au travers de la membrane interne du noyau (INM pour *inner nuclear membrane*). Le virus est alors enveloppé de façon transitoire dans l’espace périnucléaire. Cette enveloppe va ensuite fusionner avec la membrane externe du noyau (ONM pour *outer nuclear membrane*) et la NC se retrouve nue dans le cytoplasme, associée à quelques protéines du tégument. Adapté de “*Herpesviruses remodel host membranes for virus egress*” de David C. Johnson and Joel D. Baines 2011.

Des études ultrastructurales ont mis en évidence dans les années soixante, que l’infection par HCMV induisait un changement morphologique du noyau des fibroblastes (McGavran & Smith, 1965). Au cours de l’infection, le noyau adopte une forme dite en « haricot » ou encore en forme de « rein » et la taille du noyau de la cellule infectée est

augmentée de 2 fois par rapport au noyau des cellules non infectées (Jean Beltran et al., 2016). De plus, le noyau subit une rotation autour du centre organisateur des microtubules (MTOC) (Procter et al., 2018). Les microtubules exercent donc une tension qui entraîne cette modification morphologique réniforme (Procter et al., 2018; Sanchez, Greis, et al., 2000). Ces modifications de la morphologie de la cellule sont nécessaires pour l'acquisition de l'enveloppe finale du HCMV se produisant dans le cytoplasme.

1.2.d. L'enveloppement secondaire et la libération de virus par exocytose

Une fois la NC dans le cytoplasme, un second et dernier enveloppement s'y produit. En plus de la modification morphologique du noyau, un compartiment spécifique non délimité par une membrane est décrit dans la littérature 96h après infection (Sanchez, Greis, et al., 2000). Ce compartiment situé dans le creux formé par le noyau permet la synthèse des particules virales en regroupant les membranes cellulaires ainsi que les protéines virales nécessaires à l'assemblage des virions. On l'appelle le compartiment d'assemblage viral ou vAC pour « *viral assembly compartment* » (Figure 8).

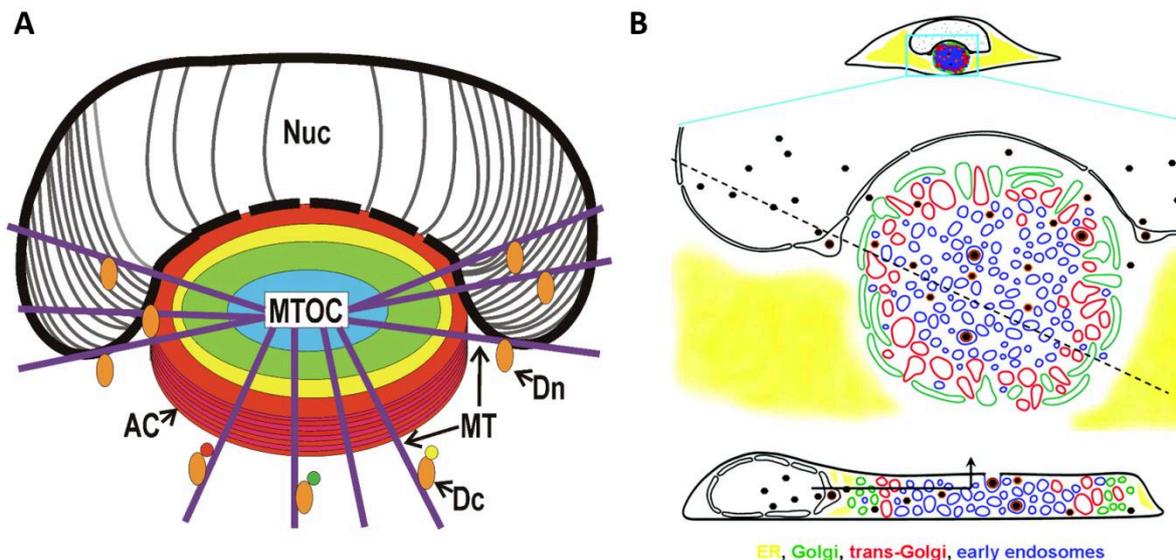


Figure 8 : Schémas représentant l'organisation du vAC.

Le vAC est le compartiment d'assemblage du HCMV non délimité par une membrane et situé dans le creux formé par le noyau. **A)** Le vAC s'organise autour du centre organisateur des microtubules (MTOC) ce qui entraîne une tension au niveau du noyau lui conférant cette forme en haricot. Ce compartiment est composé de vésicules impliquées dans les voies de trafic et de sécrétion qui sont recrutées par le biais des dynéines (Dn et Dc). **B)** Au centre du vAC se trouvent les capsides virales et les protéines virales nécessaires à l'enveloppement, les vésicules comme les endosomes, le « *Trans-Golgi network* » TGN puis en périphérie se trouve l'appareil de Golgi fragmenté organisés de façon concentrique. D'après (A) « *The Human Cytomegalovirus Assembly Compartment: A Masterpiece of Viral Manipulation of Cellular Processes That Facilitates Assembly and Egress* » de Alwine, 2012. Et

(B) « *Three-dimensional structure of the human cytomegalovirus cytoplasmic virion assembly complex includes a reoriented secretory apparatus* » de Das et al, 2007.

Pendant l'infection par HCMV, les organites impliqués dans le trafic intracellulaire sont réorganisés (Jean Beltran et al., 2016). C'est-à-dire que des protéines, habituellement utilisées comme marqueurs des différents compartiments cellulaires, sont détournées par HCMV à son profit et changent de localisation au cours de l'infection. Le vAC est organisé autour du MTOC, les organites circulent et sont recrutés grâce aux dynéines le long du cytosquelette ce qui confère au vAC une forme concentrique (Alwine, 2012; Procter et al., 2018; Sanchez, Greis, et al., 2000). L'appareil de Golgi forme des citernes proches du noyau dans les cellules non infectées, mais dès 48h après infection par HCMV, il est fragmenté et dès 96h il se répartit en formant un anneau dans la partie la plus externe du vAC (Subhendu Das et al., 2007; Rebmann et al., 2016; Sanchez, Greis, et al., 2000). D'autres organites sont également détournés par le HCMV, comme les lysosomes ou les endosomes précoces qui se retrouvent au centre du vAC (Subhendu Das et al., 2007; Subhendu Das & Pellett, 2011). Des études ont montré par microscopie confocale la présence de glycoprotéines virales au niveau de membranes comprenant les marqueurs du TGN, des endosomes ou de l'appareil de Golgi (Cepeda et al., 2010; Homman-Loudiyi et al., 2003; Sanchez, Greis, et al., 2000). Certaines de ces études ont également montré par microscopie électronique couplée à la technique d'*immunogold* que ces marqueurs cellulaires sont également présents au sein de particules virales extracellulaires (Cepeda et al., 2010; Homman-Loudiyi et al., 2003). Des structures atypiques comme les corps multi-vésiculaires, comprenant des protéines virales, ont aussi été retrouvées à proximité du vAC (Fraile-Ramos et al., 2002).

Le RE est lui aussi modifié au cours de l'infection mais sa localisation est jusqu'à ce jour controversée. Certaines études le décrivent exclu du vAC, (Subhendu Das & Pellett, 2011; Jean Beltran et al., 2016; Sanchez, Greis, et al., 2000; H. Zhang et al., 2019) et d'autres le décrivent comme étant inclus (Buchkovich et al., 2009). Il est courant d'utiliser des protéines telles que la calnexine, la calréticuline ou encore la séquence peptidique KDEL comme « marqueurs » pour visualiser le RE par microscopie photonique. Cependant, au cours de l'infection, des protéines virales peuvent interagir avec ces protéines cellulaires et leurs interactions peuvent cacher des sites de reconnaissance des anticorps (Ac). En effet, dans l'étude de Buchkovich et al en 2009, les auteurs utilisent un panel d'Ac reconnaissant différentes parties d'une protéine chaperonne du RE, BIP/GRP78. Les Ac reconnaissant la partie N-terminale de la protéine montrent une localisation de BIP au vAC tandis que ceux

reconnaissant la partie C-terminale de la protéine montrent une exclusion. Ils mettent en évidence que la séquence KDEL de la protéine BIP/GRP78 est située en C-terminal et est requise pour sa localisation au vAC. De plus, les Ac qui détectent la partie N-terminale de BIP/GRP78 co-immunoprécipitent avec pp28, laissant supposer que la partie disponible, la séquence KDEL est le site d'interaction avec pp28. Ceci met en avant que l'organite en lui-même n'est peut-être pas présent dans le vAC mais que HCMV peut utiliser les membranes du RE, et donc des marqueurs qui y sont présents (Jean Beltran et al., 2016).

Au niveau du vAC sont bien sûr localisées les protéines virales nécessaires à la formation des particules virales (Sanchez, Greis, et al., 2000). Les NC associées aux protéines du tégument pUL47, pUL48 et pp150 sont retrouvées dans le cytoplasme après l'enveloppement primaire, et acquièrent au niveau du vAC les autres protéines de tégument. Certaines protéines virales sont importantes dans l'orchestration de l'acquisition du tégument ainsi que de l'enveloppe (Tableau 1). La protéine du tégument pp150 aurait un rôle dans la stabilisation de la NC dans le cytoplasme après l'enveloppement primaire car une mutation de la protéine pp150 altère la localisation de MCP dans le cytoplasme au niveau du vAC (AuCoin et al., 2006; R. M. Smith et al., 2014; Tandon & Mocarski, 2008). L'infection par un virus muté pour la protéine pUL71 (à ne pas confondre avec pp71), une protéine du tégument encore peu connue, entraîne un défaut de réplication de HCMV qui n'affecte pas l'expression des autres protéines virales telles que pp28, pp65, pp150 ou encore gB mais qui affecte leur recrutement au niveau du vAC ainsi que la morphologie des corps multi-vésiculaires (Schaufflinger et al., 2011; Womack & Shenk, 2010). Ces études suggèrent que pUL71 pourrait être impliquée dans la tégumentation des NC. Enfin, l'infection par un virus muté pour pp28 entraîne une accumulation de NC au niveau du vAC (Silva et al., 2003). La mutation de pp28 n'impacte ni la réplication du génome viral, ni la localisation des autres protéines virales telles que pp150, pp65 ou gB (Seo et al., 2020; Seo & Britt, 2007; Silva et al., 2003). Cette protéine a la particularité d'être associée aux membranes, notamment celles de l'ERGIC (*ER-Golgi intermediate compartment*), ce qui suggère que pp28 a un rôle au niveau de la formation de l'enveloppe virale. Une étude de criblage par l'utilisation de siARN a permis de mettre en évidence l'importance d'autres protéines du tégument pour la formation du vAC (Subhendu Das et al., 2014). La fonction précise des protéines du HCMV dans l'enveloppement ainsi que dans l'organisation de la cellule reste encore à élucider.

Plusieurs études de microscopie électronique à transmission (MET) ont montré que HCMV acquiert son enveloppe via l'invagination, en forme de croissant, de diverses

membranes autour de la NC après tégumentation (Homman-Loudiyi et al., 2003; Schauflinger et al., 2013; J. D. Smith & De Harven, 1978). L'infection par le HCMV augmente la synthèse des acides gras saturés comme les acides gras à longues chaînes, ce qui pourrait participer à la courbure des membranes au niveau du site d'enveloppement (Koyuncu et al., 2013; McMahon & Gallop, 2005). L'acquisition de l'enveloppe du HCMV se fait donc à partir d'organites impliqués dans le trafic cellulaire et sécrétoire, où sont localisées les glycoprotéines d'enveloppe. Après invagination et courbure des membranes, les particules virales sont enveloppées et présentes au sein d'une vésicule puis sont acheminées à la membrane plasmique (Moorman et al., 2010; Sadeghipour & Mathias, 2017). Les virions sont libérés dans l'espace extracellulaire par fusion de la membrane des vésicules avec la membrane plasmique (par exocytose). Certaines études montrent que le HCMV utilise la machinerie ESCRT (pour *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) pour être acheminé à la membrane plasmique (Tandon et al., 2009) mais d'autres montrent que l'exocytose du HCMV est indépendante de la machinerie ESCRT (Fraile-Ramos et al., 2007).

Une fois retrouvé dans le milieu environnant, HCMV peut ainsi infecter les cellules avoisinantes par contact cellulaire mais également d'autres tissus de l'organisme par dissémination virale (W. Britt, 2008). La cellule finit donc par être lysée après avoir subi d'importants changements morphologiques mais aussi énergétiques et métaboliques (Munger et al., 2006).

D'autres virus peuvent également induire la fragmentation de l'appareil de Golgi, c'est le cas du rhinovirus humain (HRV16), du virus de l'hépatite C ou encore du virus de la peste porcine Africaine, mais les fragments ne sont pas organisés en anneau comme pour HCMV (Hansen et al., 2017; McCrossan et al., 2001; Mousnier et al., 2014). D'autres Herpesvirus utilisent également des organites impliqués dans le trafic membranaire pour s'envelopper. C'est le cas par exemple de HSV-1, une étude de spectrométrie de masse a montré la présence de marqueurs cellulaires impliqués dans la voie de sécrétion au sein des particules virales purifiées (Loret et al., 2008). Le virus pourrait utiliser lui aussi les membranes de l'appareil de Golgi pour s'envelopper et sortir de la cellule par exocytose (Avitabile et al., 1995). Des études ultrastructurales portant sur la sortie et l'enveloppement des autres Herpesvirus ont clairement montré une invagination des membranes en forme de croissant autour des virions (Granzow et al., 2001; Johnson & Baines, 2011). Le vAC a été décrit pour la première fois chez HCMV mais une récente étude le décrit également dans des cellules neuronales infectées par HSV (S. White et al., 2020).

Localisation dans la particule virale	Protéines virales	Rôle dans le cycle viral	Références
capside	MCP, SCP, mCP (DE)	Protéine structurale de la capside	Butcher et al., 1998; Gibson, 2008
	pUL104 (L)	encapsidation	Gibson, 2008
tégument	pp150 (L)	Stabilise la NC, enveloppement primaire	AuCoin et al., 2006 Tandon & Mocarski, 2008, Smith et al., 2014
	pUL47, pUL48 (L)	décapsidation dans le noyau	Bechtel & Shenk, 2002
	pp71, pp65 (DE)	Évasion immunitaire, facteur de transcription	Kalejta & Albright, 2020 cristea et al., 2010
	IRS1, TRS1 (DE)	Interaction avec PKR permettant l'activation de la synthèse protéique	Ziehr et al., 2016
	pUL71 (L)	Tégumentation cytoplasmique	Schaufinger et al., 2011; Womack & Shenk, 2010
	pp28	Enveloppement	Seo & Britt, 2007; Silva et al., 2003 Seo et Britt, 2020
	pUL69	Arrêt du cycle cellulaire en stade G1	Lu & Shenk, 1999; Wiebusch & Hagemeyer, 1999
enveloppe	gM/gN; (L) gH/gL/gO; (L) gH/gL/pUL128-131A (L)	Entrée virale	Fogliarini et al., 2019; Isaacson et al., 2008
	gB (L)	Fusion membranaire	Gerna et al., 2019; Isaacson et al., 2008
Pas dans la particule virale	UL80 (L)	Protéine d'échafaudage	Gibson, 2008
	IE1, IE2 (IE)	Évasion immunitaire, survie cellulaire et inhibiteurs de la progression du cycle cellulaire	Paulus & Nevels, 2009; Wiebusch & Hagemeyer, 1999
	pUL50, pUL53 et pUL97 (L)	Enveloppement primaire	Milbradt et al., 2018

Tableau 1 : Récapitulatifs des rôles des protéines virales.

IE : protéines très précoces (*immediate early*), DE : protéines précoces (*delayed early*), L : protéines tardives (*late*).

1.2.e. La latence du HCMV

Les Herpesvirus ont la capacité de persister dans l'organisme après la primo-infection. Cette persistance, aussi appelée latence, est une relation entre le virus, la cellule infectée mais également le système immunitaire de l'organisme hôte. HCMV étant un virus strictement humain, l'étude de la latence est restreinte à certaines sous populations cellulaires, notamment les CSH qui expriment le marqueur CD34 à leur surface, ou encore les progéniteurs myéloïdes (Collins-McMillen et al., 2018; Goodrum et al., 2012; M Reeves & Sinclair, 2008).

L'étude de la latence *in vivo* est compliquée par manque de modèle animal. De plus, le nombre de cellules hébergeant un virus latent chez l'hôte étant très faible, il est difficile de les isoler et de les amplifier. Il est également compliqué d'étudier *in vitro* la latence du HCMV, car les modèles cellulaires existants sont bien souvent des lignées primaires et donc possédant un temps de vie limité ainsi que des conditions de cultures difficiles. Il est possible d'étudier la latence en utilisant un virus proche, le cytomegalovirus murin chez la souris ou bien d'étudier le HCMV chez la souris humanisée (Collins-McMillen et al., 2018).

La latence du HCMV permet au virus de persister à vie dans l'organisme. Le génome viral est présent dans le noyau des cellules sous forme d'épisome et se réplique pour se maintenir dans l'organisme grâce à la région « *terminal repeat* », mais ne permet pas la production de particules virales (M Reeves & Sinclair, 2008; Tarrant-Elorza et al., 2014). Afin de persister dans l'organisme, le virus produit peu de protéines virales, lui permettant de rester caché du système immunitaire (Landolfo et al., 2003; M Reeves & Sinclair, 2008; Tarrant-Elorza et al., 2014). Certains transcrits appelé « transcrits exprimés pendant la latence » ont été mis en évidence comme UL138, ou encore le transcrit LUNA mais leurs rôles dans la latence restent encore mal compris (Gelbmann & Kalejta, 2019; Goodrum et al., 2012; Matthew Reeves et al., 2010). Il semblerait que des microARN viraux soient également produits lors de la latence (Meshesha et al., 2016).

Lors de la latence, l'ADN viral est associé à des répresseurs transcriptionnels, en particulier au niveau du MIEP (M Reeves & Sinclair, 2008). La localisation de la protéine du tégment pp71 joue un rôle dans l'établissement de la latence lors des étapes précoces du cycle viral. En effet, dans les fibroblastes, cette protéine est localisée dans le noyau et agit comme activateur transcriptionnel des gènes très précoces, tandis que dans les CSH CD34+, pp71 est retenue dans le cytoplasme, ce qui favorise la mise en place de la latence (Bresnahan & Shenk, 2000; Kalejta & Albright, 2020; Matthew Reeves et al., 2010; Saffert et al., 2010).

En réponse à l'environnement cellulaire ou dans certaines conditions, le cycle productif peut être réactivé. Une réplication persistante a lieu dans les cellules épithéliales de glandes salivaires et de rein, ce qui entraîne une excrétion sporadique de virus dans les liquides biologiques (urine, salive, larmes, lait maternel, liquides séminal et vaginal) (Landolfo et al., 2003). La réactivation du HCMV se produit par exemple lors de la différenciation des cellules CD34+ en cellules dendritiques (Saffert et al., 2010). Les répresseurs transcriptionnels associés aux MIEP sont alors remplacés par les activateurs, ce qui entraîne l'expression des protéines très précoces.

I.3. Pouvoir pathogène

Le HCMV est un virus strictement humain présent chez plus de 70% de la population mondiale, la prévalence pouvant aller de plus de 90% dans les pays en voie de développement à moins de 50% chez l'adulte en France actuellement (Mourez et al., 2019). L'infection est le plus souvent asymptomatique chez les personnes immunocompétentes. La physiopathologie du HCMV est liée à sa capacité d'infecter de nombreux types cellulaires. Par exemple, l'infection des cellules épithéliales permet une réplication localisée tandis que l'infection des cellules endothéliales ou hématopoïétiques permet la dissémination du virus au sein de l'organisme (C. Sinzger et al., 2008). Au cours de la primo-infection, les symptômes peuvent être une fièvre isolée ou un syndrome mononucléosique, qui consiste en des maux de tête ou de gorge, de la fièvre, de la fatigue, une perte d'appétit, et des douleurs musculaires (W. J. Britt & Prichard, 2018; Mourez et al., 2019).

En revanche c'est un redoutable agent pathogène opportuniste chez les patients immunodéprimés. La réactivation du virus latent ou la primo infection suite à une greffe d'organe peuvent entraîner des complications importantes allant jusqu'au décès du patient (Collins-McMillen et al., 2018; Mocarski Jr. et al., 2007). L'infection par le HCMV était également très problématique chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) car elle peut accélérer la progression vers le stade SIDA ainsi que participer à la mort associée à une très forte immunodéficience (W. J. Britt & Prichard, 2018; Mourez et al., 2019). Mais la mise en place des tri-thérapies antirétrovirales modernes a fait quasiment disparaître ces pathologies, en restaurant l'immunité des patients. Le plus gros problème de santé publique lié à l'infection par HCMV reste l'infection chez la femme enceinte, car c'est la première cause d'infection congénitale dans le monde.

La transmission du virus se fait par contact direct avec des liquides biologiques mais le mode de transmission le plus commun dans les pays où la prévalence est très élevée se fait lors de l'allaitement (>60%) (Subramaniam & Britt, 2018). La transmission peut aussi se faire au cours de la grossesse. Elle peut également avoir lieu lors d'une intervention médicale (lors de greffes/transplantations ou transfusion), on parle de transmissions iatrogènes.

I.3.a. Pathologies associées lors des infections congénitales.

Dans le cas d'une primo infection à HCMV chez la femme enceinte, les virus sont transmis dans 30% des cas au fœtus (Subramaniam & Britt, 2018). Les pathologies peuvent être plus ou moins lourdes en fonction du stade de développement au moment duquel a lieu

l'infection mais la transmission est plus fréquente à partir de la fin du second trimestre. L'infection peut entraîner de lourdes séquelles neurologiques, des anomalies neuro-sensorielles voire la mort du fœtus (Mourez et al., 2019). Dans le cas d'une réactivation du HCMV chez la mère, les virus sont transmis dans moins de 1% des cas au fœtus (Subramaniam & Britt, 2018). En effet, la virémie est généralement neutralisée par le système immunitaire lors d'une réactivation. Les pathologies peuvent cependant être les mêmes que celles énumérées précédemment.

I.3.b. Pathologies associées lors des infections au cours des transplantations.

Le risque d'infection à HCMV lors de transplantations dépend du statut sérologique du receveur et du donneur (Santos, 2016). Le HCMV peut se transmettre aussi bien au cours de greffes d'organe (le rein étant l'organe le plus fréquemment greffé) qu'au cours de greffes de cellules souches hématopoïétiques (greffe de moelle). Dans le cas des greffes de CSH, des études ont montré que la transmission du HCMV est réduite lorsque le sang placentaire utilisé pour la greffe était déplété en leucocytes, ce qui indique que la transmission de HCMV n'est pas liée au virus circulant mais plutôt aux cellules infectées (Gilbert et al., 1989; M Reeves & Sinclair, 2008). L'infection par HCMV est la première cause de maladie associée aux transplantations chez les patients immunodéprimés (M Reeves & Sinclair, 2008). En effet, le donneur peut être HCMV négatif (D-) ou positif (D+) de même que pour le receveur (R- ou R+). Les cas les plus graves dans le cas de greffes d'organe sont les cas de primo-infection, soit dans le cas d'une transplantation D+/R- ou D-/R- (Ramanan & Razonable, 2013). Lors des transplantations, les patients sont sous traitement immunosuppresseur, leur système immunitaire est donc affaibli. Les pathologies pouvant être associées sont très diverses : des entérites, des pneumopathies, rétinites, hépatites, méningo-encéphalites, glomérulopathies ou encore des néphropathies (Rane et al., 2012). L'infection par HCMV dans le cas des transplantations peut entraîner le rejet de greffe, voire la mort du patient.

I.3.c. Les méthodes de détections et traitement.

Afin de diagnostiquer les personnes ayant rencontré le HCMV, plusieurs méthodes de détection existent. Les tests PCR pour détecter l'ADN viral dans des prélèvements sanguins sont utilisés pour diagnostiquer l'infection à HCMV chez des adultes immunodéprimés, présentant des symptômes ou en suivi de leur greffe. Pour les nouveau-nés, on peut diagnostiquer le HCMV par PCR sur d'autres fluides, tel que la salive ou les urines. On peut aussi détecter le virus par PCR dans le liquide amniotique pour confirmer une infection

fœtale. De nos jours, cette technique est la plus couramment utilisée car plus rapide, mais d'autres méthodes directes ont été utilisées auparavant : immunohistochimie des protéines IE, simple culture sur fibroblastes pour rechercher l'effet cytopathique ou antigénémie de la protéine pp65 (Ramanan & Razonable, 2013; Santos, 2016). Des méthodes indirectes sont également utilisées qui permettent la détection d'anticorps anti-HCMV par la technique ELISA. La sérologie permet notamment de différencier une immunité ancienne d'une primo-infection.

Il existe plusieurs traitements contre le HCMV, comme le ganciclovir, le valganciclovir, le valaciclovir, le foscarnet, le letermovir ou encore le maribavir pour traiter ou prévenir les infections chez les personnes immunodéprimées (W. J. Britt & Prichard, 2018). Aucun traitement antiviral n'est administré à la mère lors d'une infection congénitale à HCMV détectée au cours de la grossesse. En effet, ces traitements sont contre-indiqués chez la femme enceinte du fait de leur tératogénicité, c'est-à-dire qu'ils induisent des malformations chez le nouveau-né. Seul un suivi échographique rapproché permettra de suivre l'apparition éventuelle de séquelles neurologiques et permettra de proposer une interruption médicale de grossesse. C'est pourquoi, la recommandation principale pour les femmes enceintes séronégatives est de limiter les contacts directs avec des liquides biologiques, provenant notamment de jeunes enfants et de se laver régulièrement les mains.

Tous les traitements connus à ce jour permettent de cibler la multiplication virale et non pas le virus en latence (W. J. Britt & Prichard, 2018). Des études sont en cours pour mettre au point un vaccin, mais aucun n'est disponible sur le marché à ce jour. C'est pourquoi il est important de continuer la recherche sur HCMV afin de trouver d'autres cibles thérapeutiques.

II) L'autophagie

Pour maintenir son homéostasie, la cellule doit pouvoir éliminer les molécules ou complexes qui pourraient lui être toxiques. L'un des processus de dégradation utilisé par la cellule est l'autophagie, du grec « auto » (soi-même) et « phage » (manger) (Reggiori & Klionsky, 2002). Ce processus est décrit chez la levure, les plantes mais aussi les animaux, mais dans ce manuscrit, je me suis focalisée sur l'autophagie décrite chez les animaux et principalement chez les mammifères. L'autophagie est un mécanisme constitutif très conservé au sein des organismes eucaryotes, permettant d'amener du matériel cytoplasmique aux lysosomes pour être recyclé (Reggiori & Klionsky, 2002; Takeshige et al., 1992). Elle permet à la cellule de dégrader des protéines à longue durée de vie, des agrégats protéiques mais également de recycler des organites cellulaires non fonctionnels ou surnuméraires. L'environnement cellulaire ainsi que différents stress modulent l'autophagie. En effet, l'état nutritionnel par exemple ou encore la présence d'agents pathogènes entraînent une stimulation de l'autophagie et permet ainsi de recycler de l'énergie suite à la dégradation du contenu lysosomal.

Afin de dégrader du matériel, la cellule dispose aussi d'autres mécanismes, notamment la dégradation directe par les lysosomes après endocytose de matériel extracellulaire ou la dégradation de matériel cytoplasmique par le protéasome. Les lysosomes sont des vésicules à simple membrane qui contiennent des hydrolases à pH acide connues pour dégrader leur contenu (De Duve & Wattiaux, 1966). Elles peuvent fusionner avec d'autres vésicules telles que les endosomes ou les corps multi-vésiculaires (MVB pour *multi vesicular bodies*) afin de dégrader des complexes toxiques présents dans le milieu extra ou intracellulaire (Fader & Colombo, 2009). Les MVB sont des repliements membranaires de vésicules ayant des marqueurs d'endosomes tardifs et des marqueurs de la machinerie ESCRT. La voie de dégradation par le protéasome est une autre façon qu'a la cellule pour dégrader des éléments cytoplasmiques comme des protéines mal repliées (Brooks et al., 2000). Le protéasome est un complexe enzymatique multi-protéique présent dans le cytosol, associé au noyau ou encore au RE. Les protéines à dégrader subissent des modifications post-traductionnelles comme l'ubiquitination afin qu'elles soient reconnues par des transporteurs et ainsi acheminées au protéasome (Nandi et al., 2006). Ce complexe est une structure non « extensible » ne permettant pas la prise en charge d'agrégats volumineux. Ces différents processus de dégradation sont complémentaires de l'autophagie afin de maintenir l'homéostasie cellulaire.

II.1. Généralités

Le terme autophagie regroupe toutes les voies permettant d'amener du matériel cytoplasmique au niveau de la lumière lysosomale pour être dégradé. Ces voies peuvent être sélectives, c'est-à-dire que du matériel va être spécifiquement reconnu par des récepteurs autophagiques ou des adaptateurs, ou être non sélective, c'est-à-dire qu'une portion aléatoire du cytoplasme va être éliminé (Beau et al., 2008; Shaid et al., 2013). Ces voies permettent le maintien de la longévité cellulaire, participent à l'immunité adaptative et innée ou encore jouent un rôle dans la mort mais surtout la survie de la cellule (Ravikumar, Sarkar, et al., 2010).

II.1.a. Les différentes voies autophagiques

Plusieurs sortes d'autophagie existent en fonction du mécanisme utilisé (Figure 9): la microautophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) et enfin la macroautophagie (Bejarano & Cuervo, 2010; Yim & Mizushima, 2020).

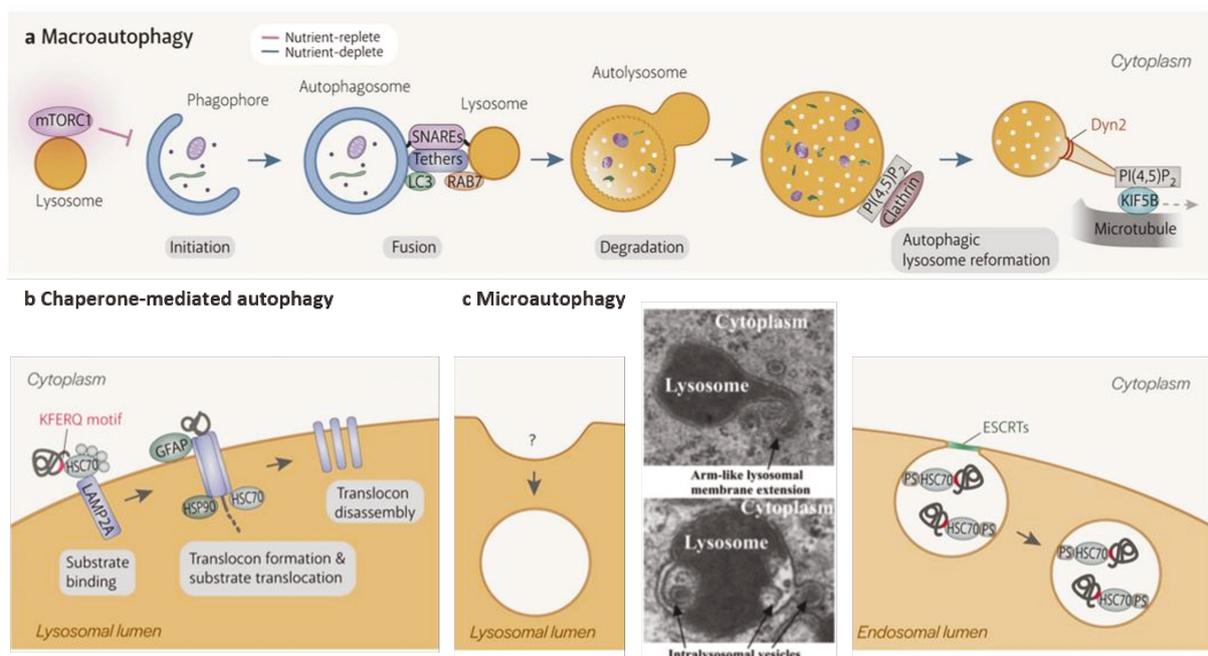


Figure 9 : Présentation des différents types d'autophagie.

Trois types d'autophagies existent dans les cellules de mammifères. **(a)** La macroautophagie permet la formation d'une double membrane, qui après avoir englobé une portion du cytoplasme aboutit à la formation d'une vésicule à double membrane appelée autophagosome. Cette vésicule va ensuite fusionner avec le lysosome pour permettre la dégradation du contenu vésiculaire via l'activité enzymatique des hydrolases apportées par les lysosomes. Cette voie autophagique est régulée par la voie mTOR elle-même régulée par la carence nutritive. **(b)** l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) permet l'acheminement de protéines aux lysosomes. Les protéines possèdent un motif reconnu par les protéines chaperonnes telle que HSC70, qui permet le passage des protéines au travers la membrane lysosomale via le récepteur LAMP2A. **(c)** La microautophagie correspond à

l'internalisation directe d'une portion cytoplasmique par invagination de la membrane lysosomale via une extension de la membrane comme sur l'image de MET (de Waal, 1986). La microautophagie peut aussi correspondre à une internalisation de matériel cytoplasmique dans la lumière endosomale, en utilisant la machinerie ESCRT. Pour cette dernière, les protéines sont reconnues par les protéines chaperonnes comme pour la CMA, mais cette fois-ci elles sont internalisées dans la lumière endosomale par la machinerie ESCRT. Adapté de « *Lysosome biology in autophagy* » de Yim et Mizushima, 2020.

La microautophagie permet la séquestration des cargos cytoplasmiques directement par invagination de la membrane lysosomale ou endosomale (Figure 9c). La simple membrane du lysosome englobe une partie du cytoplasme en s'allongeant comme un bras, puis, la membrane interne est dégradée par les enzymes (de Waal et al., 1986; Mijaljica et al., 2011; Sakai et al., 1989). La microautophagie peut se dérouler au niveau lysosomal mais aussi endosomal, l'invagination des membranes est alors réalisée par la machinerie ESCRT, comme pour la formation des MVB (voir section II.2.c) (Yim & Mizushima, 2020). Alors que bien caractérisée chez la levure, la microautophagie est peu décrite chez les mammifères.

La CMA est une voie sélective car elle permet de dégrader des protéines solubles reconnues par des protéines chaperonnes cytosoliques (Figure 9b) (Cuervo & Dice, 1996). Les protéines cellulaires cytosoliques possèdent un motif reconnu par les protéines chaperonnes impliquées dans la CMA (Dice, 1990). Ce motif est la plupart du temps, caché lorsque les protéines sont repliées ou associées en complexe, ce qui implique que lorsque le motif est mis en évidence, elles sont alors reconnues par le processus de CMA. A ce jour, la protéine chaperonne décrite pour reconnaître ces protéines est la « *Heat shock cognate 70 kDa protein* » (HSC70) qui permet l'acheminement du cargo au récepteur situé à la membrane des lysosomes (Bejarano & Cuervo, 2010). Le récepteur identifié pour la CMA est « *lysosome-associated membrane protein type 2A* » (LAMP2A) également impliqué dans d'autres processus cellulaires (Bejarano & Cuervo, 2010; Cuervo & Dice, 1996). Celui-ci se multimérise et permet le passage des protéines dépliées au travers la membrane lysosomale.

Enfin, la macroautophagie est le processus autophagique le plus caractérisé et probablement le plus utilisé par la cellule (Bejarano & Cuervo, 2010). Lors de ce processus, une double membrane est formée dans le cytosol et englobe une portion du cytoplasme permettant la formation de vésicules à double membrane appelées autophagosomes, ayant un diamètre compris entre 0,5 et 2 μm suivant la taille du cargo séquestré (Figure 9a) (Glick et al., 2010; Klionsky & Eskelinen, 2014; Melia et al., 2020; Takeshige et al., 1992). Une fois l'autophagosome formé, celui-ci fusionne avec le lysosome. La membrane interne ainsi que le contenu sont donc dégradés par les enzymes lysosomales, ce qui permet le recyclage du

matériel. L'étude moléculaire de la macroautophagie a été réalisée initialement dans un modèle de levure, et le professeur japonais Yoshinori Ohsumi a reçu en 2016 le prix Nobel de médecine pour ses travaux sur la machinerie autophagique et les protéines impliquées. Ces protéines sont appelées ATG (pour *AuTophagy related protein*) (Klionsky et al., 2003). Les ATG sont conservées au sein d'autres espèces dans le règne animal, mais aussi chez les plantes (Noboru Mizushima et al., 2011; Nakatogawa, 2020).

L'autophagie se déroule dans la cellule de façon constitutive, mais elle est finement régulée par différents facteurs (ex: réponse à différents types de stress, augmentation de substances devant être dégradées). Elle fait intervenir de nombreux acteurs, qui répondent aux changements aussi bien dans l'environnement qu'à l'intérieur de la cellule. Les trois types d'autophagie ont donc des rôles complémentaires afin de maintenir l'homéostasie cellulaire (Bejarano & Cuervo, 2010). La CMA pourrait réguler la micro et la macroautophagie en dégradant certaines ATG, tandis que la macroautophagie pourrait dégrader des inhibiteurs de la CMA (Mijaljica et al., 2011). Après stimulation de l'autophagie, le protéasome est éliminé par macroautophagie et CMA (Bejarano & Cuervo, 2010). Cette régulation de l'autophagie se fait positivement ou négativement et ce, à chaque étape, car un excès peut être néfaste pour la cellule et entraîner sa mort (Ravikumar, Sarkar, et al., 2010). Par exemple, l'inhibition ou la surexpression des ATG entraîne la mort cellulaire lors de stress induit par la carence nutritive (Levine & Yuan, 2005). C'est pourquoi plusieurs voies de signalisation interviennent dans sa régulation dans les cellules de mammifères, comme la voie mTORC1 (pour *mammalian target of rapamycin complex 1*), qui joue un rôle important dans l'initiation (Yim 2020). Cette voie est également importante dans d'autres fonctions cellulaires comme l'initiation de la traduction, la croissance et la prolifération cellulaire, la transcription ainsi que la réorganisation du cytosquelette (Laplante & Sabatini, 2012). La voie mTORC1 est le principal régulateur de l'autophagie induite notamment par la carence en acide aminé, et de multiples mécanismes peuvent réguler son activité. Notamment, son atténuation voire son inhibition entraîne de façon générale une induction de l'autophagie (Nakatogawa, 2020; Yim & Mizushima, 2020). C'est le cas par exemple de la kinase AMPK (*AMP-activated protein kinase*) dont l'activité permet de réguler l'autophagie en phosphorylant des protéines autophagiques dont le complexe mTORC1 (Nakatogawa, 2020). Cette kinase permet aussi de réguler le métabolisme lipidique, mitochondrial ou encore glucidique.

II.1.b. L'autophagie : physiologie et pathologies

L'autophagie semble être importante aussi bien dans la physiologie de la cellule qu'en pathologie humaine. Sa régulation est très importante pour le maintien de la survie cellulaire. Il semblerait qu'il y ait un « *cross talk* » entre l'autophagie et l'apoptose, une forme de mort cellulaire programmée (Levine & Yuan, 2005). L'autophagie est induite par le jeûne pour apporter à la cellule les nutriments nécessaires, mais aussi au cours du développement ou encore à la naissance (Noboru Mizushima et al., 2004). Elle permet au nouveau-né de s'adapter à la carence soudaine provoquée par l'accouchement, et l'autophagie diminue au cours du vieillissement. D'autres études montrent que l'autophagie améliore la présentation des antigènes au système immunitaire (Ravikumar, Sarkar, et al., 2010). Les cellules présentent à leur surface des peptides via les molécules du CMH afin qu'ils soient reconnus par les cellules du système immunitaire productrices d'anticorps. Les molécules du CMH de classe I sont présentées à la surface de toutes les cellules nucléées (Trombetta & Mellman, 2005). Les molécules du CMH-I prennent en charge des peptides issus de la dégradation de protéines par le protéasome (généralement des antigènes intracellulaires) qui sont ensuite transportés au RE. Les molécules du CMH-II sont présentées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes et prennent en charge des peptides issus d'antigènes internalisés par endocytose (généralement des antigènes extracellulaires) et dégradés par la voie endo-lysosomale ou bien dégradés par autophagie (Münz, 2012). Il existe une transversalité permettant une présentation croisée qui permet aux molécules du CMH-I de présenter des peptides issus d'antigènes extracellulaires, normalement pris en charge par les molécules du CMH-II. A l'inverse, les molécules du CMH-II peuvent présenter des peptides issus d'antigènes intracellulaires, normalement pris en charge par les molécules du CMH-I (Trombetta & Mellman, 2005; Valečka et al., 2018). L'activité autophagique peut être une voie alternative à celle du protéasome pour permettre la dégradation d'antigènes cytoplasmiques et dans ce cas, permettre une présentation croisée par les molécules du CMH-I.

Les dérèglements de l'autophagie ont également un rôle dans des maladies neurodégénératives. L'une des caractéristiques de ces maladies est la formation et l'accumulation d'agrégats protéiques intra cytoplasmiques. La stimulation de l'autophagie aurait un rôle bénéfique dans la clairance des agrégats protéiques impliqués dans les maladies de Parkinson ou encore d'Alzheimer (Ravikumar, Sarkar, et al., 2010).

L'autophagie a également été décrite comme jouant un rôle dans le cancer (Noboru Mizushima et al., 2008; E. White, 2015). Lors du développement d'un cancer, l'autophagie a un rôle dans l'inhibition de la tumorigénèse en dégradant des composés pro-cancérigènes et dans le déclenchement de la mort cellulaire par apoptose. En revanche, lorsque le cancer est établi, les cellules prolifèrent et sont en hypoxie ainsi qu'en carence nutritive. C'est là où l'autophagie peut être favorable à la survie de ces cellules et avoir un rôle pro-cancérigène.

II.2. Le processus autophagique

A ce stade du manuscrit, je me suis focalisée sur la macroautophagie chez les mammifères, que je simplifierai en parlant d'autophagie.

Le processus autophagique met en jeu plusieurs complexes protéiques et est divisé en plusieurs étapes (Figure 10) : l'initiation (qui permet la mise en place du phagophore), l'élongation du phagophore (qui permet d'englober une portion aléatoire ou non du cytoplasme), la formation de l'autophagosome (engendrée par la fermeture du phagophore) et enfin la maturation (qui permet de dégrader le contenu de l'autophagosome après fusion aux lysosomes).

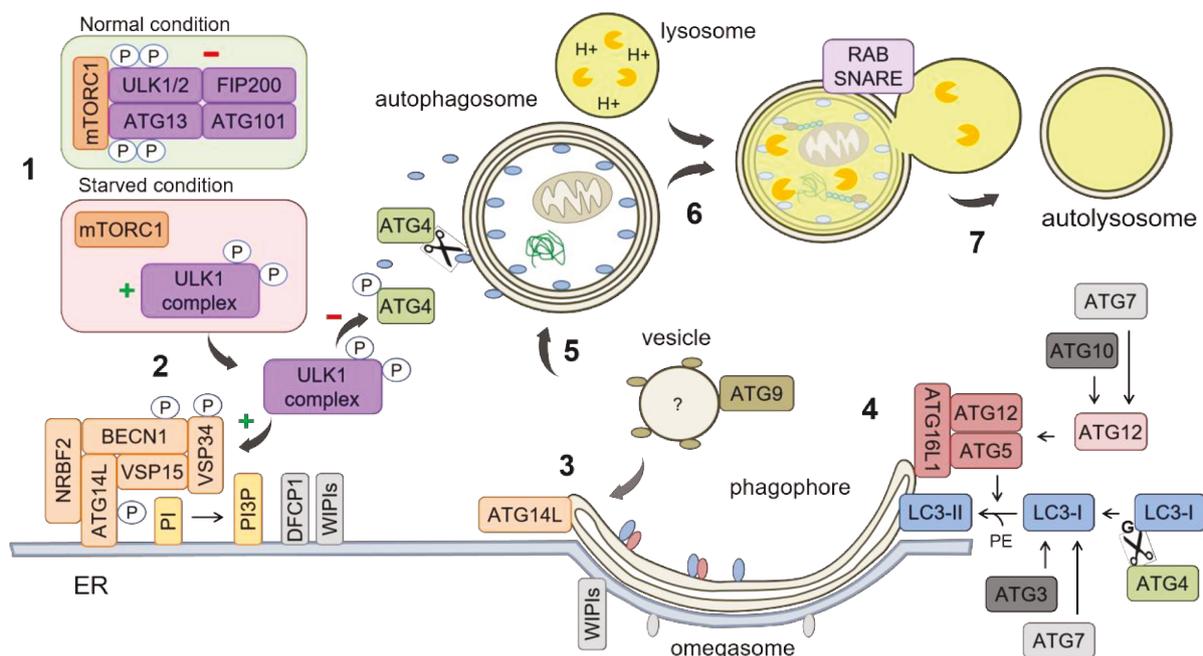


Figure 10 : Présentation de la (macro)autophagie non sélective.

(1) Dans des conditions dites « normales » où l'autophagie n'est pas induite, le complexe mTORC1 interagit avec le complexe ULK1/2 (comportant ULK1 ou ULK2 (ULK1/2), ATG13, ATG101 et FIP200) et phosphoryle les protéines ULK1/2 et ATG13. Cette interaction permet d'inactiver l'activité kinase du complexe ULK1/2. Cependant, lorsque les cellules sont en carence nutritive, mTORC1 n'interagit plus avec le complexe ce qui active la kinase ULK1/2. (2) Le complexe ULK1/2 est recruté au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et phosphoryle les membres du complexe PI3K de classe

III (composé de NRBF2, ATG14L, BECN1, VSP15 et VSP34). La kinase PI3K de classe III (VSP34) permet la formation de PI3P à partir de PI, permettant de recruter les protéines WIPI et DFCP1. (3) Ces protéines sont essentielles à la formation de l'omégasome. Une double membrane appelée phagophore, est formée au niveau de l'omégasome grâce à la fusion de vésicules contenant la protéine ATG9 provenant de diverses membranes cellulaires. Le phagophore peut aussi provenir de l'extrusion des membranes d'autres organites impliqués dans le trafic cellulaire. (4) Les PI3Ps permettent aussi le recrutement des protéines impliquées dans les systèmes de conjugaison. Le premier système, permet la formation du complexe ATG5-ATG12. Après hydrolyse d'ATP, la protéine ATG12 (*ubiquitin like*) est liée de façon covalente à la protéine ATG7 (E1 *ubiquitin activating enzyme like*) puis ATG12 est ensuite liée à la protéine ATG10 (E2 *ubiquitin-conjugating enzyme like*) ce qui permet la formation finale du complexe ATG5-ATG12. Ce dernier complexe s'associe avec la protéine ATG16L1 pour former le complexe (E3 *ubiquitin ligase like*) nécessaire au second système, qui est la lipidation des LC3/mATG8 (*ubiquitin like*). La protéase ATG4 clive LC3 qui est ensuite activé par ATG7 (E1), transféré sur ATG3 (E2) et le complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 (E3) lie de façon covalente le phosphatidyléthanolamine (PE) à LC3. (5) Le phagophore est ensuite allongé grâce à l'apport de membranes provenant de divers compartiments cellulaires (comme le RE, les mitochondries, l'appareil de Golgi et autres...) puis les extrémités fissionnent pour former l'autophagosome. Lors de l'élongation, une portion du cytoplasme est englobée de façon aléatoire. Les LC3 liés au PE et situés à l'extérieur de l'autophagosome sont recyclés par la protéase ATG4, elle-même régulée par la phosphorylation d'ULK1 qui l'inactive. (6) Les lysosomes fusionnent ensuite avec l'autophagosome via les protéines RAB, SNARE, mais également certaines protéines LC3. (7) Les hydrolases lysosomales dégradent ensuite le contenu intravésiculaire mais également la membrane interne de l'autophagosome pour former l'autolysosome.

II.2.a. L'initiation

La première étape permet l'initiation du phagophore, induit par une cascade de signalisation. Le phagophore est une double membrane établie à partir de membranes d'organites cellulaires (voir section II.3). Cette double membrane est façonnée au sein d'une structure dérivée du RE appelée omégasome par analogie à sa forme en oméga « Ω » (Axe et al., 2008; Ylä-Anttila et al., 2009). Cette structure tubulaire se forme la plupart du temps au niveau de sites de contact du RE avec les mitochondries (Hamasaki et al., 2013; Itakura & Mizushima, 2010; Uemura et al., 2014).

Le complexe majeur permettant la biogénèse du phagophore est le complexe ULK (*Unc-51-Like autophagy activating Kinase*), formé des protéines : ULK1 ou ULK2 (ULK1/2), ATG13, FIP200 (*FAK family kinase-interacting protein of 200kDa*) et ATG101. Dans des conditions dites « normales », le complexe ULK1/2 interagit avec la protéine (mTOR) au sein du complexe mTORC1 dans le cytoplasme (Figure 10) (Ganley et al., 2009; Noboru Mizushima et al., 2011). Cette interaction permet la phosphorylation d'ULK1/2 et d'ATG13 par mTORC1, ce qui inactive la kinase ULK1/2. En revanche, lorsque la cellule est en carence nutritive, mTORC1 est inactif et n'interagit plus avec ce complexe. ULK1/2 est

donc active et phosphoryle à son tour le complexe permettant son acheminement au niveau de la membrane du RE (Noboru Mizushima et al., 2011). ULK1/2 possède un rôle dans l'autophagie mais aussi dans le trafic entre le RE et l'appareil de Golgi (Joo et al., 2016).

La formation de l'omégasome requiert la présence du complexe ULK1/2 mais également du complexe phosphoinositide 3-kinase (PI3K) de classe III composé des protéines BECN1-ATG14L-VPS15 (ou p150)-VPS34 et NRBF2 (*nuclear receptor binding factor 2*). Le complexe ULK1/2 active l'autophagie en phosphorylant les protéines du complexe PI3K de classe III (BECN1, ATG14L, VPS34) (Itakura & Mizushima, 2010; Roberts & Ktistakis, 2013). La protéine ATG14L est présente au niveau de la membrane du RE car elle interagit avec la protéine syntaxine 17 (STX17), une protéine transmembranaire du RE. Ainsi, ATG14L recrute les autres membres du complexe PI3K de classe III (Melia et al., 2020; Noboru Mizushima et al., 2011; Roberts & Ktistakis, 2013). L'enzyme VPS34 est la kinase PI3K de classe III requise pour la production de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) à partir de phosphatidylinositol (PI) (Leever et al., 1999). Les PI3P sont des phospholipides ancrés dans les membranes cellulaires et permettent le recrutement des ATG nécessaires pour la suite du processus (Itakura & Mizushima, 2010; Roberts & Ktistakis, 2013). Dans des conditions basales, le RE est pauvre en PI3P, mais lors d'une carence nutritive, des compartiments riches en PI3P sont retrouvés au niveau du RE. Le domaine FYVE, un domaine présent dans plusieurs protéines cellulaires (comme la protéine EEA1, marqueur principal des endosomes précoces), se lie spécifiquement aux PI3P. Il existe une protéine comportant deux domaines FYVE, DFCP1 (pour *double FYVE-containing protein 1*), interagissant donc avec des PI3P (Axe et al., 2008). La protéine DFCP1 est localisée au niveau du RE et en condition de carence nutritive, elle colocalise partiellement avec LC3 et ATG5. Il semblerait que cette protéine soit requise mais pas indispensable pour la formation des autophagosomes (Melia et al., 2020; Nakatogawa, 2020). D'autres protéines, appartenant à la famille des WIPI (pour *WD-repeat protein Interacting with PhosphoInositides*), interagissent avec les PI3P et sont nécessaires pour la suite du processus autophagique, comme l'élongation du phagophore (Melia et al., 2020; Nakatogawa, 2020; Polson et al., 2010). Alors que WIPI3 et WIPI4 font notamment le lien entre la production de PI3P et l'initiation de la synthèse de l'autophagosome, WIPI1 et WIPI2 se localisent et agissent au niveau de l'omégasome. En interagissant avec les PI3P, la protéine WIPI2 permet le recrutement d'ATG tels que le complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 et la conjugaison de LC3, (détaillé dans la section II.2.b). La protéine WIPI4 permet également l'ancrage des

membranes précurseurs de l'autophagosome au niveau du RE, entraînant l'élongation des membranes via la fusion des vésicules contenant la protéine ATG9, (détaillé dans la section II.3).

L'initiation de la formation des autophagosomes peut être stimulée ou inhibée par des molécules pharmaceutiques (Klionsky et al., 2016). La rapamycine interagit avec la protéine mTOR empêchant la phosphorylation du complexe ULK1/2 et donc induit l'autophagie. La 3-méthyladénine (3-MA) inhibe l'activité de la PI3K et la Spautine entraîne l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome de BECN1 au sein du complexe PI3K de classe III. Ces deux drogues induisent donc un blocage de l'autophagie aux étapes précoces. L'autophagie peut également être régulée par des protéines cellulaires, qui agissent en complexe avec la kinase VPS34 et la protéine BECN1. C'est le cas de la protéine AMBRA1 qui a pour rôle d'activer l'autophagie, ou encore de Bcl-2 qui l'inhibe (Fimia et al., 2007; Pattingre et al., 2005).

II.2.b. L'élongation

La deuxième étape du processus permettant la formation de l'autophagosome est l'élongation du phagophore (Figure 10). Deux systèmes de conjugaison sont importants pour cette étape, et s'apparentent au système d'ubiquitination des protéines (Beau et al., 2008). Dans ce système, trois classes d'enzymes sont impliquées pour lier de manière covalente les protéines cibles avec une protéine « étiquette » (par exemple l'ubiquitine) : l'enzyme E1 est activatrice, l'enzyme E2 catalyse le transfert de la protéine « étiquette », et l'enzyme E3 reconnaît la protéine cible et permet la ligation de la protéine « étiquette » sur les protéines cibles. Dans le cas de l'autophagie, cela permet de conjuguer ATG5 à ATG12 et ainsi de former le complexe protéique ATG5-ATG12-ATG16L1 (*E3 like*) et de conjuguer les protéines de la famille LC3/mATG8 (*microtubule associated protein light chain 3*, appelée ATG8 chez la levure) (*ubiquitin like*) à un lipide, le phosphatidyléthanolamine (PE) (Johansen & Lamark, 2020).

Le premier système de conjugaison permet la formation du complexe ATG5-ATG12-ATG16L1. La protéine ATG12 est activée par ATG7 (E1) puis transférée sur ATG10 (E2) et enfin conjuguée avec ATG5 grâce à une liaison covalente glycine-cystéine (N. Mizushima et al., 1998). Le complexe ATG5-ATG12 interagit alors avec la protéine ATG16L1 et ce complexe est requis pour le second système de conjugaison LC3/mATG8-PE. Le complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 permet la courbure des membranes pour l'élongation du

phagophore. En revanche, le complexe se dissocie de l'autophagosome une fois ce dernier formé (Barth et al., 2010; Glick et al., 2010).

Le second système de conjugaison permet la lipidation des protéines LC3/mATG8. Chez les mammifères, LC3 est une famille de protéine constituée d'une première sous famille LC3 : LC3A, LC3B et LC3C, et d'une deuxième sous famille GABARAP : GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2 (ou GATE-16) (Figure 11) (Shpilka et al., 2011). Les LC3 ont des homologies de séquence mais ont des fonctions distinctes (Martens & Fracchiolla, 2020; Schaaf et al., 2016; Weidberg et al., 2010). GABARAP a d'abord été identifié comme une protéine associée au récepteur GABA (Wang et al., 1999) et GATE-16 (pour *Golgi-associated ATPase Enhancer of 16kDa*) comme une protéine capable d'augmenter l'activité d'une ATPase impliquée dans le transport vésiculaire au sein de l'appareil de Golgi (Sagiv et al., 2000). De plus, les membres de la sous famille GABARAP ont des rôles dans la maturation de l'autophagosome (voir section II.2.c) (Weidberg et al., 2010). Les précurseurs de LC3 (pro-LC3) sont tout d'abord clivés par les cystéines protéases ATG4, pour permettre l'exposition d'un résidu glycine en C-terminal et donner la forme I de LC3 (LC3-I) (Kabeya et al., 2004). Il existe 4 isoformes d'ATG4 (Agrotis et al., 2019; Schaaf et al., 2016; Tanida et al., 2004) :

- ATG4A qui permet le clivage des membres la sous-famille GABARAP ;
- ATG4B qui est la forme la plus décrite et permet le clivage de tous les LC3s ;
- ATG4C et ATG4D qui permettent le clivage de GABARAPL1.

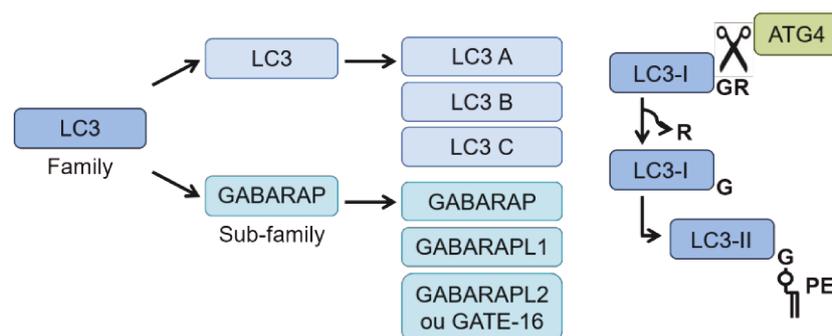


Figure 11 : Présentation des homologues LC3.

Les protéines LC3 sont des homologues d'ATG8 chez la levure. La famille LC3 est divisée en 2 sous familles, la sous-famille LC3 composée de LC3A, LC3B et LC3C ; Et la sous-famille GABARAP composée de GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2/GATE-16. Ces protéines sont d'abord clivées par les protéases ATG4 afin d'exposer un résidu « glycine ». Ce clivage est nécessaire pour la lipidation des membres de la famille de LC3 pour permettre leur ancrage au niveau des membranes autophagiques.

La forme LC3-I est activée par ATG7, puis transférée sur ATG3, une autre E2 (Beau et al., 2008; Tanida et al., 2004). LC3-I est ensuite conjugué au PE pour donner la forme II de LC3 (LC3-II) grâce au complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 (E3). Le processus de lipidation est le même pour tous les LC3 et leur permet d'avoir une localisation au niveau des membranes internes et externes de l'autophagosome (Kabeya et al., 2004; Tanida et al., 2004). La synthèse, le clivage et la conjugaison des LC3 augmentent au cours du processus autophagique. De plus, ces protéines participent à chaque étape, de la formation à la maturation de l'autophagosome, c'est pourquoi le marquage de LC3 est classiquement utilisé pour détecter les autophagosomes (Klionsky et al., 2016).

L'association de ces protéines au niveau de la membrane du phagophore permet l'élongation de la double membrane. Il existe différents mécanismes pour apporter des lipides et permettre l'élongation du phagophore, et ils seront détaillés dans la section II.3. De façon générale, des lipides sont apportés d'une membrane donneuse vers le phagophore, afin de permettre son élongation et sa courbure. En effet, la composition lipidique des membranes, les protéines transmembranaires, le cytosquelette (comme les filaments d'actine) ou encore la traction des moteurs moléculaires peuvent favoriser la courbure, due à la tension exercée sur les membranes (McMahon & Gallop, 2005). Des études ont montré que la courbure des autophagosomes serait due à la présence du complexe ATG16L1 (Nakatogawa, 2020). De plus, les phospholipides « classiques » des membranes cellulaires, tels que les phosphatidylcholines (PC), ont une morphologie plutôt « cylindriques » tandis que les phospholipides de type PE ont une morphologie plutôt « conique » (Nguyen et al., 2017). Cette différence de morphologie serait dû à l'aire de leur tête hydrophile, de 70 Å² pour les PC et de 65 Å² pour les PE. Ces observations pourraient expliquer pourquoi la lipidation des LC3 se fait préférentiellement au niveau de membranes courbées. Une fois l'autophagosome formé, les protéases ATG4 peuvent recycler les LC3-II situés à l'extérieur de la vésicule (Kabeya et al., 2004; Martens & Fracchiolla, 2020). Afin de permettre l'élongation du phagophore, ULK1 phosphoryle ATG4 pour inhiber son activité (Pengo et al., 2017).

Les protéines qui interagissent avec les LC3 ont la particularité de posséder un domaine spécifique appelé région d'interaction avec LC3 (LIR pour *LC3-interacting region*), comme ULK1, FIP200, ATG13, VPS34, BECN1, ATG14L, ATG3, ATG4 ou encore le complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 (Behrends et al., 2010; Martens & Fracchiolla, 2020; Wild et al., 2014). Il est facile de prédire un domaine LIR pour une protéine *in silico*, notamment via un site internet dédié, mais l'interaction avec LC3 doit systématiquement être confirmée *in vitro*

(Kalvari et al., 2014). Dans le cas d'une autophagie non sélective, le cytoplasme est englobé de façon aléatoire au sein de l'autophagosome (Glick et al., 2010; Noboru Mizushima et al., 2008). Dans le cas d'une autophagie sélective, des protéines adaptatrices interagissent avec le cargo à dégrader et sont acheminées dans la lumière du phagophore (Figure 12) . Ces protéines ont la particularité d'interagir avec les LC3 grâce à leur domaine LIR composé d'une vingtaine d'acides aminés ayant un motif commun (Johansen & Lamark, 2020). Il existe plusieurs domaines LIR ayant des séquences proches, pour autant, les différents membres de la famille des LC3 ont des partenaires bien distincts qui leur confèrent des fonctions différentes (Behrends et al., 2010; Schaaf et al., 2016; Wild et al., 2014). Par exemple, des protéines du complexe ULK ont une interaction préférentielle avec les membres de la sous-famille GABARAP (Alemu et al., 2012). Les récepteurs ou adaptateurs autophagiques (p62/SQSTM1, NBR1, NDP52, TAX1BP1 ou encore optineurine) reconnaissent le cargo, pour l'acheminer au niveau de l'autophagosome en interagissant avec LC3 via leur domaine LIR (Khaminets et al., 2016). Le récepteur le plus étudié est p62/SQSTM1 qui a la même affinité pour tous les LC3, mais n'est recruté que par LC3B aux autophagosomes, tandis que NDP52 est recruté spécifiquement par LC3C (Wild et al., 2014). De récentes études proposent que les récepteurs aillent d'abord reconnaître le cargo qui est en général ubiquitinylé, avant de se lier à LC3 (Melia et al., 2020; Turco et al., 2020). L'ensemble des récepteurs autophagiques détecte le signal ubiquitine, seul le récepteur NDP52 reconnaît un autre type de signal, les galectines (Boyle & Randow, 2013; Coers, 2017). Le complexe ULK1/2 est ensuite recruté au niveau du cargo via l'interaction de FIP200 avec p62/SQSTM1 ou NDP52 (Ravenhill et al., 2019). Le complexe PI3K est ensuite recruté par l'interaction avec le complexe ULK1/2 et de la même façon, la production de PI3P permet le recrutement des protéines ATG impliquées dans les systèmes de conjugaison permettant la formation du complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 et la lipidation des LC3 (Zachari et al., 2019). Les LC3 lipidés sont ensuite associés à la membrane, entraînant le recrutement de p62/SQSTM1 et probablement NDP52 qui interagissent avec LC3. Cette interaction entraîne la libération des complexes ULK1/2 et PI3K. Les membranes permettant la formation du phagophore sont ensuite recrutées et les récepteurs autophagiques ainsi que le cargo se retrouvent dans la lumière de l'autophagosome et sont ensuite dégradés. Les récepteurs autophagiques sont donc couramment utilisés pour étudier la dégradation par autophagie (Klionsky et al., 2016).

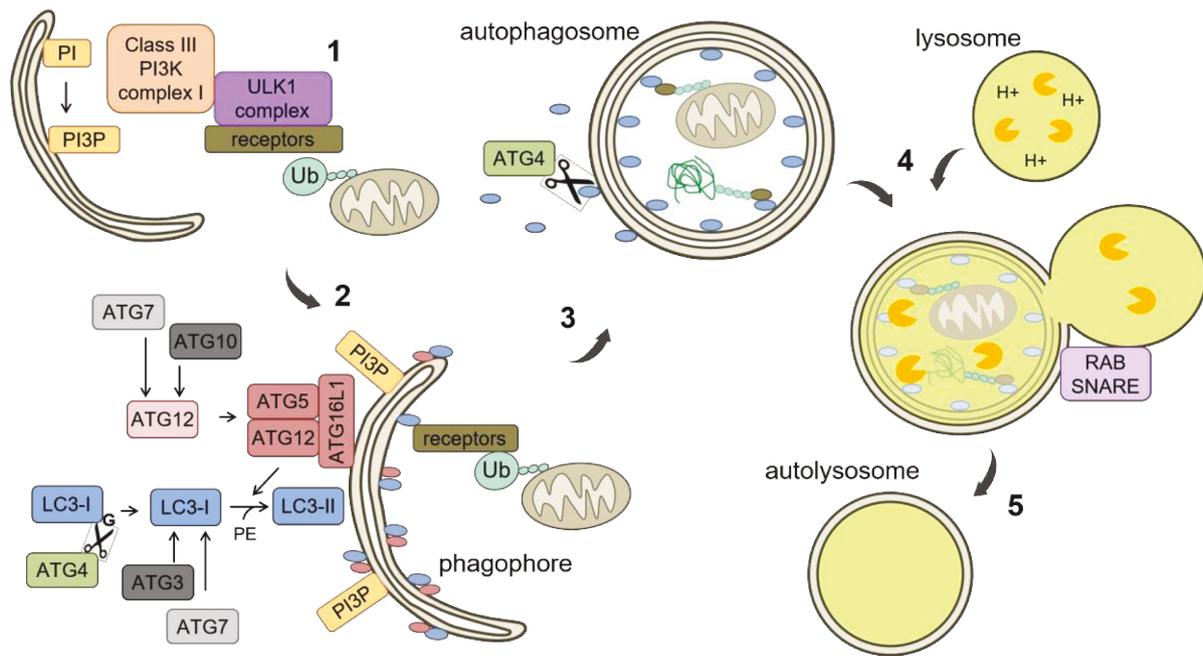


Figure 12 : Présentation de la (macro)autophagie sélective.

(1) Le cargo, représenté ici par une mitochondrie non fonctionnelle, est ubiquitinylé puis reconnu par les récepteurs autophagiques. Le complexe ULK1/2 est recruté au niveau du cargo grâce à l'interaction de FIP200 avec le récepteur autophagique. Celui-ci recrute puis phosphoryle les membres du complexe PI3K de classe III. Le phagophore est formé au niveau du cargo grâce à la fusion de vésicules contenant la protéine ATG9 provenant de diverses membranes cellulaires voire par l'extrusion des membranes d'autres organites. La PI3K (VSP34) entraîne la formation de PI3P permettant de recruter les protéines impliquées dans les systèmes de conjugaison. (2) Les complexes ULK1/2 et PI3K n'interagissent plus avec les récepteurs permettant la mise en place du premier système, qui permet la formation du complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 puis le second système, qui permet de conjuguer LC3/mATG8 au phosphatidyléthanolamine (PE). Les récepteurs interagissent avec LC3 grâce à leur domaine d'interaction LIR. (3) Le phagophore est ensuite élongé grâce à l'apport de membranes provenant de divers compartiment cellulaire (comme le RE, les mitochondries, l'appareil de Golgi et autres...) puis les extrémités fissionnent pour former l'autophagosome. Lors de l'élongation, le phagophore englobe le cargo ainsi que les récepteurs autophagiques. Les LC3 liés au PE et situés à l'extérieur de l'autophagosome sont recyclés par la protéase ATG4. (4) Les lysosomes fusionnent ensuite avec l'autophagosome via les protéines RAB, SNARE, mais également certaines protéines LC3. (5) Les hydrolases lysosomales dégradent ensuite le contenu intravésiculaire mais également la membrane interne de l'autophagosome pour former l'autolysosome.

Il existe un processus de phagocytose appelé la LAP (phagocytose associée à LC3) qui utilise la machinerie autophagique pour dégrader du matériel extracellulaire (Heckmann & Green, 2019). Les différences entre ces deux processus sont que dans un cas LC3 est associé à un autophagosome à double membrane, dans l'autre cas à un phagosome à simple membrane (Heckmann & Green, 2019; Martens & Fracchiolla, 2020). De plus, la LAP est un processus indépendant du complexe ULK1 et ne semble pas être induit par la carence nutritive ou un stress intracellulaire (Lai & Devenish, 2012).

II.2.c. La fermeture de l'autophagosome et sa maturation

Une fois que la membrane du phagophore s'est allongée, les extrémités du phagophore doivent se rejoindre pour fermer la vésicule et former l'autophagosome. Puis la membrane externe de l'autophagosome fusionne avec les lysosomes pour former l'autolysosome (Noboru Mizushima, 2007). Il est maintenant admis que le processus qui permet de fermer la vésicule et de former l'autophagosome, cette structure à double membrane, est un processus de fission (ou de scission). En effet, la fission/scission membranaire fait référence à la rupture d'une membrane pour donner deux membranes séparées, tandis que la fusion fait référence au processus inverse qui est de former une seule membrane à partir de deux membranes séparées (Figure 13).

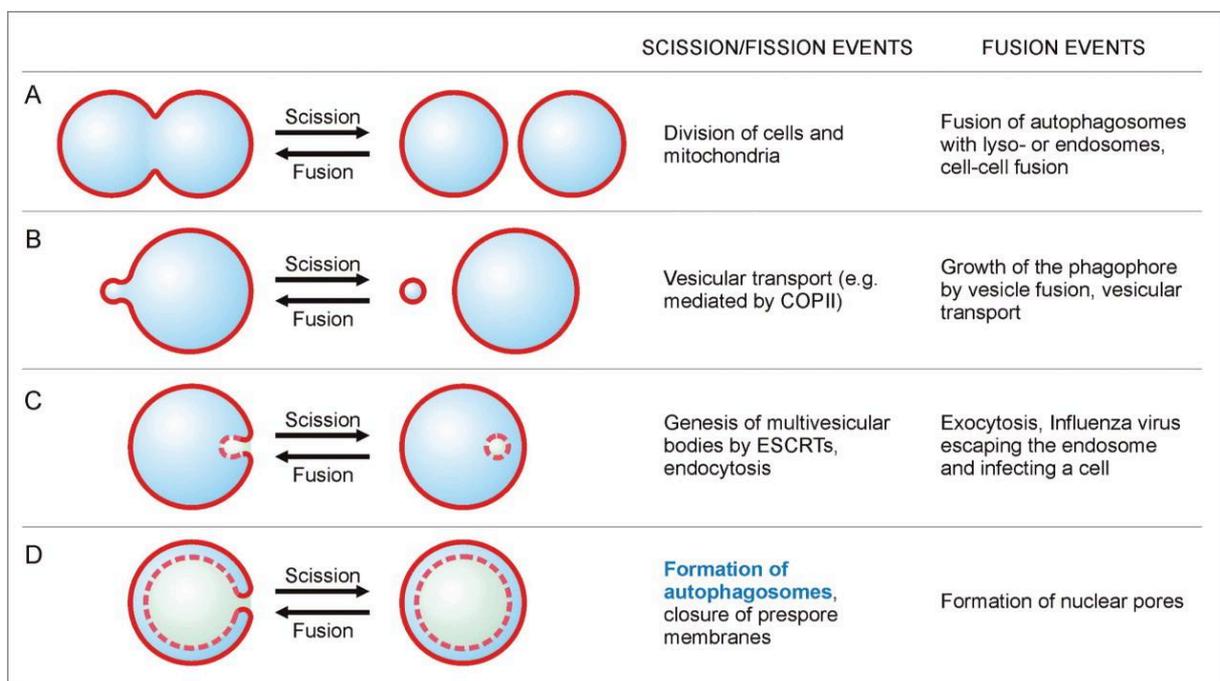


Figure 13 : Exemple de fission et fusion membranaire.

La fission membranaire permet de créer deux membranes distinctes à partir d'une seule membranaire, tandis que le processus inverse, la création d'une membrane à partir de deux membranes est la fusion. (A) Représente le schéma classique lorsque les deux compartiments sont de tailles égales, (B, C) Schématisent la fission ou la fusion de deux compartiments de tailles différentes. (D) Schématise la fission des extrémités du phagophore pour former l'autophagosome. L'inverse ressemblerait à la formation des pores nucléaires par exemple. D'après "Autophagosome closure requires membrane scission" de Knorr et. al, 2015.

La fission membranaire pour la formation de l'autophagosome

Lors de l'étape de fermeture de l'autophagosome, la membrane interne et la membrane externe deviennent deux entités distinctes. En effet, le phagophore est une double membrane en forme de croissant dont les extrémités sont à bord joint et vont se rejoindre pour former

une vésicule à deux membranes dissemblables (Figure 13D) (Noboru Mizushima et al., 2011). De nombreuses publications ont décrit que les extrémités du phagophore fusionnaient entre elles pour former l'autophagosome mais depuis quelques années il est de plus en plus reconnu, notamment chez la levure, que ce phénomène est de la fission (Knorr et al., 2015; Lei & Klionsky, 2020; Melia et al., 2020; Reggiori & Klionsky, 2013). Lors de cette étape, la fermeture du phagophore s'apparente au système de bourgeonnement médié par le complexe ESCRT.

Les membranes cellulaires sont des structures en mosaïques fluides hautement dynamiques qui subissent un remodelage continu en termes d'invagination, de bourgeonnement, de formation de tubules, de fusion et de fission. Ces processus de dynamique membranaire sont essentiels pour pratiquement toutes les fonctions principales de la cellule. La machinerie ESCRT est l'un des processus permettant la formation de vésicules contenant du cytoplasme, entre autres lors de la fission. Le machinerie ESCRT est subdivisée en 3 complexes distincts : ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III (Schöneberg et al., 2017). Ce processus nécessite également les protéines ALIX (pour *ALG-2 Interacting Protein X*) et VPS4 (pour *vacuolar protein sorting- associated 4*). De façon générale, ESCRT-I et -II permettent l'assemblage du complexe ESCRT-III qui se polymérise pour former un filament ce qui entraîne un rapprochement des membranes en forme de « col de bouteille » (Vietri et al., 2020). La protéine ATPase VPS4 permet de recycler les filaments formés par ESCRT-III et de réparer les membranes.

Dans le cadre de l'autophagie, la machinerie ESCRT est impliquée pour séparer la membrane interne de la membrane externe du phagophore. Le complexe ESCRT-I serait recruté aux extrémités du phagophore permettant d'attirer le complexe ESCRT-III, qui interagirait alors avec la protéine FIP200 (Melia et al., 2020; Takahashi et al., 2018).

La machinerie ESCRT est également impliquée dans la formation des MVB, grâce à une invagination des membranes endosomales ou encore dans la libération du VIH-1 par bourgeonnement à la membrane plasmique (Schöneberg et al., 2017; Wollert et al., 2009). Il existe d'autres mécanismes que la machinerie ESCRT pour permettre la fission membranaire, c'est le cas des dynamines. Lors de la fission mitochondriale par exemple, la protéine cytosolique Drp1 (pour *Dynamain related protein 1*), appartenant à la famille des dynamines, est recrutée à la membrane externe des mitochondries et forme un complexe en forme d'anneau contractile qui en se resserrant permet de scinder les mitochondries lors de leur

division (Palmer et al., 2011). Les dynamines permettent également la scission membranaire lors de la libération du phagophore de l'omégasome (Lei & Klionsky, 2020).

La fusion membranaire pour la formation de l'autolysosome

La fermeture du phagophore est requise pour la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. Cette dernière étape permet la dégradation du contenu vésiculaire ainsi que de la membrane interne de l'autophagosome grâce aux enzymes lysosomales (Noboru Mizushima et al., 2011; Nakatogawa, 2020). Parfois, une étape intermédiaire fait que l'autophagosome fusionne avec d'autres organites impliqués dans les voies d'endocytose, comme les MVB ou les endosomes, pour former des amphisomes qui ensuite fusionnent avec les lysosomes (Figure 13A) (Fader & Colombo, 2009; Noboru Mizushima, 2007). La qualification d'autophagosome, amphisome ou autolysosome est basée sur leur fonction et non pas sur leur morphologie car il est parfois difficile de les distinguer en microscopie électronique (Eskelinen, 2008; Klionsky et al., 2016; Noboru Mizushima, 2007). En effet, il est admis que la distance entre les membranes interne et externe de l'autophagosome est inférieure à 30 nm, ce qui peut les rendre difficilement discernables suivant la préparation des échantillons.

La fusion membranaire est un processus très utilisé au sein de la cellule notamment pour le maintien de l'homéostasie. Pour cela, la cellule doit échanger des informations ou du matériel avec le milieu environnant, ce qui dépend de la machinerie endosomale et de la machinerie sécrétoire. Afin que les différents organites communiquent entre eux, des vésicules telles que les endosomes ou encore le TGN, assurent le transport de matériel d'un organite donneur vers un organite accepteur ou vers l'extérieur de la cellule (Bonifacino & Glick, 2004). Ces échanges de matériel au sein de la cellule se font grâce à des molécules telles que les protéines RAB et SNARE, qui permettent la fusion entre les différentes membranes (Ryu et al., 2016; Takamori et al., 2006). Les différentes voies impliquées dans le trafic membranaire sont en fait interconnectées (Figure 14). La fusion entre deux membranes requiert une membrane « donneuse » et une membrane « cible ». C'est pourquoi, il existe 2 types de SNARE, les t-SNARE pour « *target* » présentes sur les membranes « cibles » et les v-SNARE pour « *vesicle* » présentes sur les membranes « donneuses » (Figure 14A) (Woodman, 1997). Les SNARE sont donc des protéines présentes à la surface de la plupart des membranes. Lorsque deux membranes fusionnent, les SNARE sont associées par quatre : une R-SNARE (ayant un résidu arginine (R) conservé) et trois Q-SNARE (ayant un résidu glutamate (Q) conservé) (Malsam et al., 2008; Sørensen et al., 2018). Les v-SNARE font partie des R-SNARE (comme les protéines VAMP pour *Vesicle-Associated Membrane Protein* aussi

appelée synaptobrévines ou encore YKT6), et les t-SNARE font partie des Q-SNARE (comme les syntaxines (STX) ou les *synaptosomal associated protein* 25kDa ou 29kDa (SNAP-25 ou SNAP-29)). Certains de ces récepteurs ont un ancrage direct dans les membranes comme les VAMP ou les STX (Jahn & Scheller, 2006). D'autres ont des liaisons covalentes avec un acide gras, l'acide palmitique, telles que les protéines SNAP-25 ou SNAP-29. Lors de la fusion, une R-SNARE et trois Q-SNARE (Qa, Qb, et Qc) interagissent ensemble pour former le complexe SNARE (Figure 14A). Après fusion membranaire, ces protéines associées au niveau de la membrane cible sont recyclées grâce au complexe *N-Ethylmaleimide-Sensitive Fusion protein* (NSF) et son cofacteur « *Soluble NSF Attachment Protein* » (SNAP). Il existe 3 formes de SNAP, les alpha et les gamma présentes dans quasiment tous les tissus, et les beta présentes dans le cerveau (à ne pas confondre avec SNAP-25 et SNAP-29 qui sont des t-SNARE).

D'autres protéines ont un rôle dans la fusion membranaire telles que les protéines RAB. Ces protéines permettent de réguler le bourgeonnement, le trafic et la fusion membranaire. Plusieurs protéines RAB sont impliquées dans la formation des autophagosomes (Figure 14B). Le rôle des RAB dans la fusion membranaire est complémentaire des SNARE. Ce sont des GTPases qui peuvent alterner entre 2 conformations, « on » lorsqu'ils sont liés au GTP ainsi qu'aux effecteurs et « off » lorsqu'ils sont liés au GDP (Stenmark, 2009). Les RAB sont des protéines présentes essentiellement sur les organites impliqués dans le trafic ou la sécrétion (Søreng et al., 2018; Stenmark, 2009; Takamori et al., 2006). Les RAB et le cytosquelette sont donc essentiels pour le transport des vésicules et leur fusion avec les membranes cibles.

Pour résumer, les membranes nécessaires à la formation de l'autophagosome proviennent de plusieurs compartiments cellulaires et leur apport dépend d'un grand nombre de composants impliqués dans le trafic membranaire telles que les protéines RAB et SNARE (Figure 14B) (Søreng et al., 2018). Les autophagosomes et les lysosomes fusionnent à l'aide du complexe SNARE : VAMP8-STX17-SNAP29-VTI1B en association avec RAB7 (Itakura et al., 2012). Certaines protéines de l'autophagosome ont un rôle dans la maturation de l'autophagosome. Il a été montré que les GABARAP permettent le recrutement de facteurs nécessaires au trafic et la fusion avec les lysosomes (Lőrincz & Juhász, 2020; Martens & Fracchiolla, 2020). Deux membres de la sous-famille GABARAP (GABARAPL2/GATE-16 et GABARAP) interagissent avec NSF (Sagiv et al., 2000; Weidberg et al., 2010). Il a été décrit que GABARAPL2/GATE-16 interagit avec une v-SNARE située au niveau de

l'appareil de Golgi en plus de NSF (Sagiv et al., 2000). A l'état basal, GABARAP interagirait avec GM130, une protéine de l'appareil de Golgi, ce qui bloque son activité tandis que lors de la carence nutritive, GM130 interagirait avec une autre protéine du Golgi (WAC), permettant la libération et le transport de GABARAP vers le centrosome pour former le phagophore (Joachim et al., 2015).

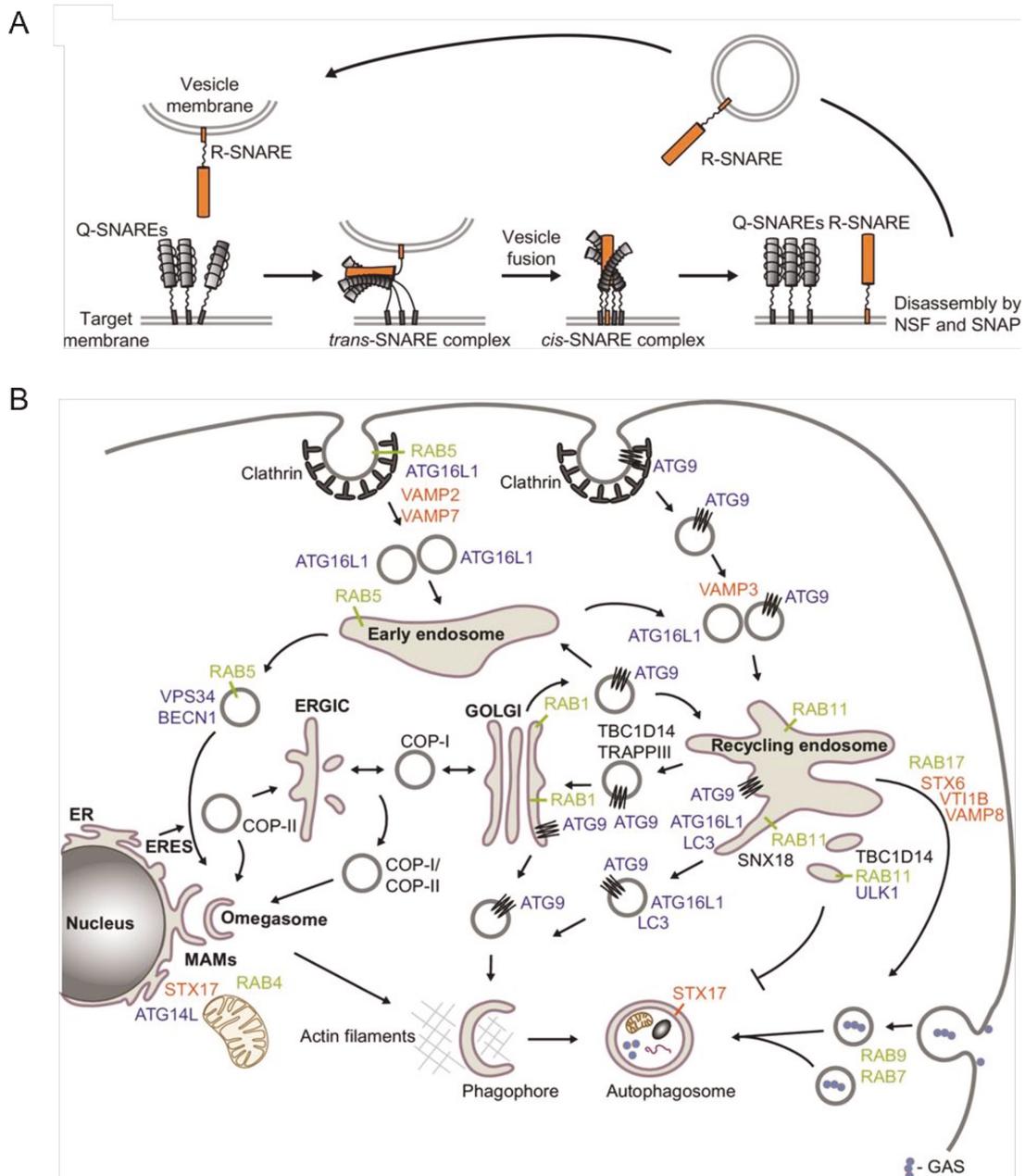


Figure 14 : Trafic des membranes pour la formation des autophagosomes.

(A) Après reconnaissance des membranes donneuses et cibles, le complexe SNARE se forme grâce à une R-SNARE située sur la membrane donneuse, et de trois Q-SNARE situées sur la membrane cible. Les SNARE changent de conformation entraînant la fusion des membranes et les molécules NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) et son cofacteur SNAP (soluble NSF attachment protein) permettent le désassemblage du complexe. (B) Différentes membranes sont utilisées afin de former le phagophore et l'autophagosome. Le réticulum endoplasmique (RE) est le plus grand organelle dans la cellule et est

connecté à plusieurs organites via des sites de liaison, permettant des échanges de protéines, de lipides ou encore d'ions. Les membranes utilisées peuvent provenir des sites de sorties de protéines via le RE (ERES), des sites associés aux mitochondries (MAM), des mitochondries, du compartiment intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi (ERGIC), de l'appareil de Golgi, de la membrane plasmique et des sites du RE reliés à celle-ci et enfin des endosomes. Les protéines permettant ce trafic sont les protéines RAB (en vert) et les protéines SNARE (en orange). Les protéines de l'autophagie (en bleu) sont associées à presque toutes ces membranes, notamment les protéines ATG9 et ATG16L1. Les différentes protéines RAB, SNARES et autophagiques interagissent entre elles et permettent le trafic des différents compartiments cellulaires ainsi que leur fusion. D'après « *Membrane Trafficking in Autophagy* » de Sørensen et al, 2018.

Il existerait un second complexe de PI3K de classe III composé de VSP34, BECN1, p150 et UVRAG (Itakura et al., 2008). Les protéines VSP34, BECN1 et p150 sont localisées au niveau du phagophore tandis que UVRAG se situe sur les endosomes (tardifs et précoces). Ce complexe permet de réguler la fonction endosomale et semble également être impliqué dans la formation de l'autolysosome. Ce complexe 2 est souvent évoqué mais peu décrit, la question est de savoir si ce complexe a été mis de côté car les « autophagistes » s'intéressent à d'autres mécanismes ou si ce complexe n'est finalement pas impliqué dans la maturation des autophagosomes ? De plus, il semblerait que la protéine ATG14, appartenant au complexe 1, est retrouvée dans les autophagosomes matures et interagit avec les protéines SNAP29 et STX17 participant à la fusion avec les lysosomes (Diao et al., 2015; Levine et al., 2015).

Après la formation de l'autolysosome, les enzymes lysosomales dégradent la membrane interne mais pas la membrane externe de l'autophagosome. En effet, leur composition est différente, notamment la membrane externe ne présente pas de protéine transmembranaire contrairement à la membrane interne (Noboru Mizushima, 2007). L'une des hypothèses est qu'après fusion, la membrane externe de l'autolysosome possède les mêmes propriétés que celle des lysosomes (Yim & Mizushima, 2020). De plus, le système de conjugaison des LC3 rendrait la membrane interne de l'autophagosome plus susceptible aux hydrolases lysosomales (Tsuboyama et al., 2016).

II.3. L'origine des membranes

Dans le cas d'une autophagie non sélective, l'omégasome loge le phagophore pour permettre son élongation et ainsi former l'autophagosome. Dans le cas d'une autophagie sélective, les membranes des organites précurseurs des autophagosomes sont acheminées au niveau du cargo reconnu par les adaptateurs grâce à la présence des PI3P. Ces lipides en association avec les RAB permettent de coordonner le trafic membranaire (Jean & Kiger, 2012; Stenmark, 2009).

Comme discuté précédemment, les lipides et les protéines du phagophore peuvent provenir de différentes membranes : les sites de sorties et de contact du RE avec d'autres organites, le ERGIC, l'appareil de Golgi et le TGN, le système endosomal ou encore la membrane plasmique (Biazik et al., 2015; Sørensen et al., 2018; Wei et al., 2018). L'origine des membranes est discutée depuis plusieurs décennies. En effet, dans un article de 1966, Christian De Duve et Robert Wattiaux ont étudié la fonction des lysosomes, en comparant les différentes vésicules de dégradation ayant un lien avec les lysosomes. Dès cette étude, il est proposé que leurs membranes dérivent de la membrane plasmique. Parmi ces vésicules, les auteurs parlent de « cytolysosome » ou encore de « vacuole autolytique » faisant référence aux autophagosomes (De Duve & Wattiaux, 1966). Dans le cas où le phagophore se forme au sein de l'omégasome, il est possible qu'il soit issu des membranes du RE et qu'il s'allonge via l'apport de lipides d'autres organites ou de vésicules (Hayashi-Nishino et al., 2009; Ylä-Anttila et al., 2009). Le RE est le plus grand organite de la cellule et permet la synthèse de protéines transmembranaires. Il est connecté à des compartiments membranaires, ce qui facilite les échanges de lipides, d'ions ou encore le transport des protéines transmembranaires (Molino et al., 2017; Wei et al., 2018). Le RE est le principal fournisseur des bicouches lipidiques qui permettront de former des autophagosomes, mais d'autres membranes sont impliquées dans l'autophagie comme (Figure 14B) :

- Les sites de contact à la membrane plasmique ou encore la membrane plasmique elle-même (Ravikumar, Moreau, et al., 2010). La protéine ATG16L1 est située à la membrane plasmique et est acheminée au phagophore par l'intermédiaire des vésicules recouvertes de clathrine. La déficience en clathrine entraîne un défaut d'endocytose et inhibe la formation des autophagosomes.

- Les sites de sortie du RE (ERES pour *endoplasmic reticulum exit sites*) qui sont des zones du RE spécialisées dans le transport des protéines du RE vers le compartiment ERGIC via des vésicules COP-II (pour *coat protein complex II*) (De Tito et al., 2020). L'ERES permettrait de délivrer des protéines et des lipides essentiels à l'élongation du phagophore (Sanchez-Wandelmer et al., 2015). Les vésicules de transport COP-I et COP-II permettent le trafic de protéines entre l'appareil de Golgi et le RE, dans les deux sens (De Tito et al., 2020).

- L'ERGIC, qui est le compartiment intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi, est une sorte de « gare de triage » permettant de trier les protéines et de les réorienter entre ces deux organites (Ge et al., 2013). Les vésicules de type COP-I et -II peuvent ainsi fusionner au

phagophore (Søreng et al., 2018). Des études ont montré que la lipidation de LC3 peut se dérouler dans ces vésicules COP-II (Sanchez-Wandelmer et al., 2015; Shima et al., 2019).

- L'appareil de Golgi qui sert de plateforme pour le passage des protéines produites dans le RE vers le système endosomal jusqu'à la membrane plasmique. Il est structuré en 3 sous-parties : la partie Cis-Golgi, puis les citernes golgiennes, et la partie Trans-Golgi aussi appelé TGN permettant le trafic des composés de l'appareil de Golgi via des vésicules (De Tito et al., 2020). L'appareil de Golgi permet la maturation des protéines et participe à leur transport. Chez la levure, il semble participer à l'élongation du phagophore (Geng et al., 2010).

- Les sites de contact du RE aux mitochondries (MAM pour *mitochondria-associated ER membrane*) qui sont essentiels pour l'homéostasie métabolique (calcium, lipide, énergétique, ou encore les dynamiques mitochondriales) (Hamasaki et al., 2013). Lorsque la carence nutritive est induite, ATG14L est recrutée au niveau des MAM par STX17, une protéine associée aux MAM, ainsi qu'ATG5. De plus, des images de vidéo microscopie montrent la dynamique d'ATG5 au niveau des MAM puis sa libération dans le cytoplasme, en lien avec la formation des autophagosomes.

- Les mitochondries qui sont des organites impliqués dans le métabolisme énergétique de la cellule et dans le transport de calcium ou d'autres ions dans la cellule. Les protéines ATG5 et LC3 s'associent de façon transitoire à la membrane externe des mitochondries. Il semblerait que la membrane externe transmette les lipides et protéines nécessaires à la formation de l'autophagosome (Hailey et al., 2010).

Plusieurs mécanismes seraient utilisés afin d'apporter des membranes ainsi que des lipides. Les membranes peuvent être formées par extrusion membranaire ou bien après fusion de vésicules provenant de diverses origines (Figure 13B) (Melia et al., 2020; Søreng et al., 2018). La protéine ATG9 est une protéine transmembranaire qui réside au niveau de l'appareil de Golgi ou à la membrane plasmique. Après induction de l'autophagie, ATG9 se relocalise au sein de petites vésicules cytoplasmiques et au niveau des endosomes tardifs où elle retrouve ATG16L1 et RAB11A (Duke et al., 2014; Orsi et al., 2012; Puri et al., 2018; Søreng et al., 2018). Les vésicules dérivées de la membrane plasmique contenant ATG16L1 et ATG9 circulent via les endosomes et servent de sources de membrane pour former le précurseur du phagophore (Melia et al., 2020; Noboru Mizushima et al., 2011; Nakatogawa, 2020; Orsi et al., 2012; Puri et al., 2018). La quantité d'ATG9 corrèle avec le nombre de corps autophagiques, donc le niveau d'ATG9 détermine le nombre de phagophores (cf. la quantité de LC3 corrèle avec le nombre d'autophagosomes) (Klionsky et al., 2016; Sánchez-

Wandelmer & Reggiori, 2017). Les vésicules sont acheminées au niveau des complexes formés (soit au niveau de l'oméosome, soit au niveau du cargo) et vont fusionner entre elles pour former le phagophore ou vont fusionner avec celui déjà existant pour l'allonger jusqu'à former l'autophagosome (Nakatogawa, 2020).

La protéine WIPI4 forme un complexe avec ATG2 et serait impliquée dans l'ancrage des précurseurs de l'autophagosome au niveau du RE, ce qui entraîne l'expansion du précurseur via la fusion des vésicules contenant ATG9 (Nakatogawa, 2020). En effet, ATG2 aurait un rôle dans l'ancrage entre une membrane donneuse et le phagophore (Valverde et al., 2019). Le complexe ATG2/WIPI4 servirait de plateforme pour le transfert de lipides vers le phagophore pour permettre son élongation. La protéine ATG2 possède un domaine LIR permettant son interaction avec les protéines GABARAP et GABARAPL1 et cette interaction serait essentielle pour la formation du phagophore (Behrends et al., 2010; Bozic et al., 2020).

En résumé, toutes les membranes de la cellule sont interconnectées, ce qui veut dire que de façon générale, toutes les membranes de la cellule sont utilisées pour former l'autophagosome (Biazik et al., 2015). A ce jour, il n'y a pas de consensus concernant le mécanisme exact de la formation de l'autophagosome, ce qui laisse penser que l'extrusion et la fusion des vésicules provenant de divers organites sont possibles (Molino et al., 2017). Probablement que les conditions environnementales ou le type cellulaire influencent l'utilisation d'un mécanisme plutôt qu'un autre.

III) Détournement des mécanismes de défense cellulaires, exemple de l'autophagie

En réponse aux infections, les cellules ont développé des stratégies pour éliminer les agents pathogènes intracellulaires et pour libérer des signaux de danger permettant d'activer les cellules du système immunitaire. L'autophagie est un processus de dégradation intracellulaire efficace, c'est pourquoi, tous les micro-organismes intracellulaires devront y faire face au cours de leur cycle de multiplication. Certains, moins adaptés à leur hôte, vont être dégradés par ce processus et d'autres, au contraire vont s'échapper ou bloquer ce processus pour permettre leur multiplication.

III.1. Les différents mécanismes de défense cellulaires

Lors d'une infection, la cellule utilise différents mécanismes pour se défendre. L'inflammasome, la mort cellulaire programmée et l'autophagie sont trois mécanismes induits par la détection d'un agent pathogène intracellulaire et sont activés par la reconnaissance de structures spécifiques, qu'on appelle les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP pour *pathogen associated molecular patterns*) ou engendrés par des dommages faits à la cellule (DAMP pour *damage associated molecular patterns*) (Krakauer, 2019). Ces motifs sont alors détectés par des récepteurs PRR (pour *pattern-recognition receptors*) qui peuvent être de différentes classes : les récepteurs de type Toll (TLR pour *Toll-like receptors*) qui sont membranaires, les récepteurs RIG-I like (RLR pour *RIG-I-like receptors*) qui sont des ARN hélicases reconnaissant les motifs ARN, ou encore les récepteurs de type NOD (NLR pour *nucleotide oligomerization domain-like receptors*) qui sont cytoplasmiques (Faure & Lafont, 2013; Krakauer, 2019). Les dommages membranaires causés par l'infection virale ou par d'autres pathogènes lors de la rupture de l'endosome ou du phagosome sont perçus comme des signaux de danger. Les membranes ainsi rompues peuvent être reconnues par le système des galectines qui détecte l'exposition anormale des glycanes normalement dans la lumière des compartiments cytoplasmiques (Nabi et al., 2015). Les fragments de membranes marquées par les galectines sont ensuite reconnus par les récepteurs autophagiques et sont dégradés par la voie autophagique (Coers, 2017; Montespan, Marvin, et al., 2017). La reconnaissance des PAMP et/ou DAMP, entraîne une cascade de signalisation induisant une réponse inflammatoire dans la cellule, telle que la production de caspases apoptotiques et inflammatoires permettant l'élimination des agents pathogènes (Figure 15). De plus, l'interaction PRR/PAMP ou DAMP permet l'activation de voies de signalisation telles que

NF- κ B, ou encore les MAP-kinases permettant la production de cytokines, de chimiokines et d'interférons. Ces voies de signalisation permettent d'engendrer une réponse immunitaire pour signaler l'infection à l'échelle de l'organisme et donc protéger l'organisme hôte contre les infections.

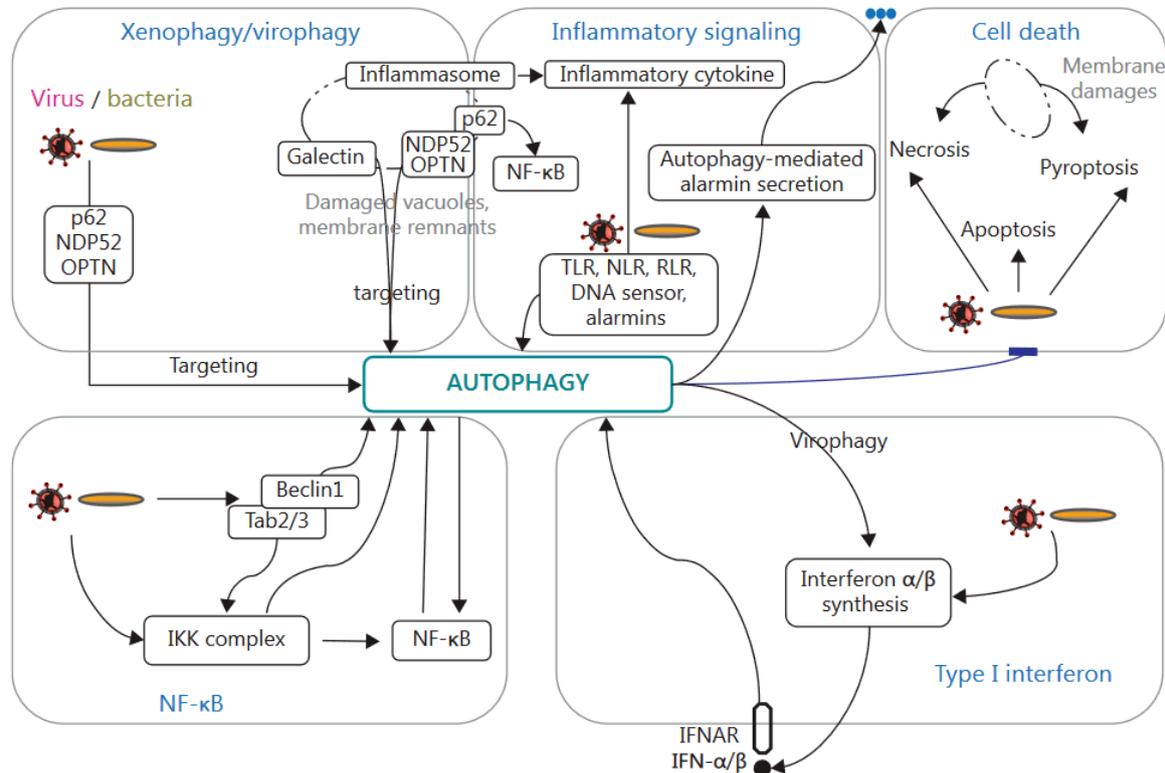


Figure 15 : Schéma général du «cross talk» entre l'inflammasome, la mort cellulaire et l'autophagie.

Les PAMP présentés par les virus ou bactéries intracellulaires sont reconnus par les récepteurs autophagiques comme p62/SQSTM1, NDP52 ou encore optineurine (OPTN) pour induire la dégradation des microorganismes par autophagie (xénophagie). Les PAMP sont également reconnus par les PRR de type TLR, NLR ou RLR pour induire la production de cytokines inflammatoires ainsi que l'autophagie. L'infection induit la mort cellulaire qui est inhibée par l'autophagie pour permettre la survie cellulaire. De plus, il y a activation des voies de signalisation comme la réponse NF- κ B ou encore la production d'interféron. Les agents pathogènes ont développé plusieurs stratégies pour contrer cette reconnaissance cellulaire et passer inaperçu du système immunitaire. D'après « *Pathogen-induced autophagy signaling in innate immunity* » de Faure et Lafont, 2013.

Pour échapper aux réponses de l'hôte et passer inaperçu, les agents pathogènes intracellulaires ont développé des stratégies afin de se multiplier efficacement, masquer les réponses cellulaires, empêcher la mort cellulaire programmée et surtout, empêcher leur dégradation par la cellule. Quelques exemples non exhaustifs de ces défenses vont être donnés dans le cadre d'infections virales. Pour bloquer la réponse cellulaire, certains virus codent pour des protéines mimant des fonctions de protéines cellulaires pour leurrer les cellules (P. Paul & Münz, 2016). Par exemple, l'interleukine 10 (IL-10) est l'une des cytokines les plus

manipulées par les virus à cause de ses rôles immunosuppresseur et anti-inflammatoire. Certains virus stimulent sa synthèse (comme le VIH, les virus de l'hépatite C et B (HCV et HBV) tandis que certains codent pour des orthologues viraux d'IL-10 (vIL-10) (comme les herpesvirus) (Christiaansen et al., 2015). Cette cytokine permet donc d'atténuer le système immunitaire, favorisant ainsi la multiplication du pathogène. Afin de contrer l'infection, les cellules peuvent aussi programmer leur mort pour limiter la propagation des agents pathogènes. En réponse à l'interféron, la protéine PKR (une protéine kinase qui détecte l'ARN double brin) est activée, ce qui lui donne un rôle pro-apoptotique (Nakamura et al., 2010). Cette protéine a également un rôle dans l'arrêt de la synthèse des protéines en se liant à un facteur d'initiation de la traduction protéique (eIF2 α). Il existe de nombreuses protéines virales antagonistes de PKR, produites par exemple par le virus de la vaccine (la protéine K3), HCMV (TRS1 et IRS1) ou encore HSV-1 (la protéine US11) mais aussi des ARN viraux se liant directement à PKR, produits par des adénovirus (*virus-associated RNA-I*) ou l'EBV (ARN EBER-1 et EBER-2) (Crow et al., 2016).

L'autophagie peut être utilisée par la cellule comme mécanisme antiviral, en dégradant spécifiquement les virus ou des composés viraux, on parle de xénophagie et de virophagie (Deretic & Levine, 2018). Les composants viraux comme la capsid virale, peuvent être reconnus par la machinerie autophagique et être dégradés au sein de l'autolysosome. C'est le cas par exemple du virus Sindbis, un virus à ARN appartenant à la famille des *Togaviridae*. Sa protéine de capsid est ubiquitinylée par la protéine SMURF1 (E3 ubiquitine-protéine ligase) ce qui entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice p62/SQSTM1 et sa dégradation par autophagie (Orvedahl et al., 2010, 2011). Un autre exemple est la détection de composants viraux par des PRR appartenant à la famille de protéines cellulaires TRIM (Koepke et al., 2020). Les protéines TRIM interagissent avec ULK1 et BECN1, la protéine adaptatrice p62/SQSTM1 ainsi que les membres de la famille LC3 et sont capables d'induire le processus autophagique (Mandell et al., 2014). La protéine TRIM5 α agit comme un récepteur autophagique en reconnaissant directement la protéine de capsid p24 du VIH-1 entraînant la dégradation de p24.

Depuis quelques années, des études ont montré qu'un grand nombre de virus utilisaient ou détournaient la machinerie autophagique via des mécanismes différents pour favoriser leur multiplication. Les virus peuvent l'utiliser dans son ensemble pour la dégradation de composés ou pour améliorer la survie cellulaire, d'autres vont simplement utiliser des protéines autophagiques pour des fonctions spécifiques ou encore utiliser les

vésicules/membranes autophagiques. J'ai choisi de présenter dans ce manuscrit quelques exemples de détournement de ce processus par les virus à des stades précis de leur cycle.

III.2. Détournement de l'autophagie par les virus (généralités)

III.2.a. Détournement de l'autophagie sélective par les virus

Le virus de la dengue (DENV pour *dengue virus*), virus enveloppé à ARN (+) appartenant à la famille des *Flaviviridae*, induit la dégradation de gouttelettes lipidiques par autophagie (lipophagie) (Heaton & Randall, 2010). Les gouttelettes lipidiques sont des organites de stockage des lipides dans le cytoplasme dont la synthèse est régulée par le métabolisme lipidique. Elles sont majoritairement constituées de triglycérides ainsi que de cholestérol et d'esters de cholestérol. Le DENV induit spécifiquement la dégradation de triglycérides par autophagie permettant d'augmenter la β -oxydation. La β -oxydation est la principale voie métabolique de dégradation des molécules d'acides gras et permet d'engendrer une quantité importante d'énergie que le DENV utilise pour se répliquer. La protéine cellulaire AUP1, localisée au niveau des gouttelettes lipidiques et du RE, permet de réguler le métabolisme lipidique. Elle interagit avec les protéines non structurales du DENV NS4A et NS4B ce qui entraîne la translocation d'AUP1 au niveau des autophagosomes, et donc la lipophagie (J. Zhang et al., 2018).

D'autres virus sont capables d'induire la mitophagie au cours de l'infection. Le HCV, appartenant à la famille des *Flaviviridae*, induit une dégradation sélective des mitochondries tout en bloquant sa propre dégradation par un mécanisme encore inconnu (Kim et al., 2013). Lors de la réactivation de l'EBV, un γ -herpesvirus, on observe une fragmentation et une agrégation des mitochondries, qui vont former une structure proche du noyau : le mito-agrésome (Vilmen et al., 2020). La protéine virale BHRF1 est responsable de la formation du mito-agrésome et elle stimule aussi l'autophagie, ce qui permet de séquestrer les mitochondries fragmentées dans des vésicules autophagiques, entraînant leur dégradation par mitophagie. La mitophagie entraîne la diminution de la production d'interféron (IFN) de la cellule, ce qui pourrait permettre à l'EBV de persister dans l'organisme.

III.2.b. Utilisation de protéines autophagiques par les virus

Une étude de criblage à l'aide de siARN contre un ensemble de protéines autophagiques a été réalisée dans deux types cellulaires pour rechercher l'impact de l'autophagie sur la multiplication des virus (Mauthe et al., 2016). Les auteurs se sont intéressés à six virus

appartenant à des familles différentes : le HSV-1 (*Herpesviridae*), le virus de la vaccine (*Poxviridae*), le virus de l'hépatite murine (*Coronaviridae*), le virus de l'encéphalomyocardite (*Picornaviridae*), le virus de la grippe de type A (*Orthomyxoviridae*) et enfin le virus de la forêt de Semliki (*Togaviridae*). Globalement, l'extinction des protéines autophagiques module la réplication de ces virus, bien que l'impact dépende aussi bien du virus que du type cellulaire. Par exemple, la déplétion des protéines ATG13 et FIP200 augmente la réplication de deux *Picornaviridae* : le virus de l'encéphalomyocardite et le coxsackievirus B3 (CVB3). Cette modulation semble être indépendante de l'autophagie puisque l'inactivation des autres protéines du complexe ULK n'a pas d'effet (Mauthe et al., 2016). Le(s) rôle(s) d'ATG13 et de FIP200 sur ces virus reste(nt) encore à découvrir. Cette étude montre donc que les virus détournent parfois une fonction de ces ATG pas nécessairement liée à l'autophagique (Figure 16).

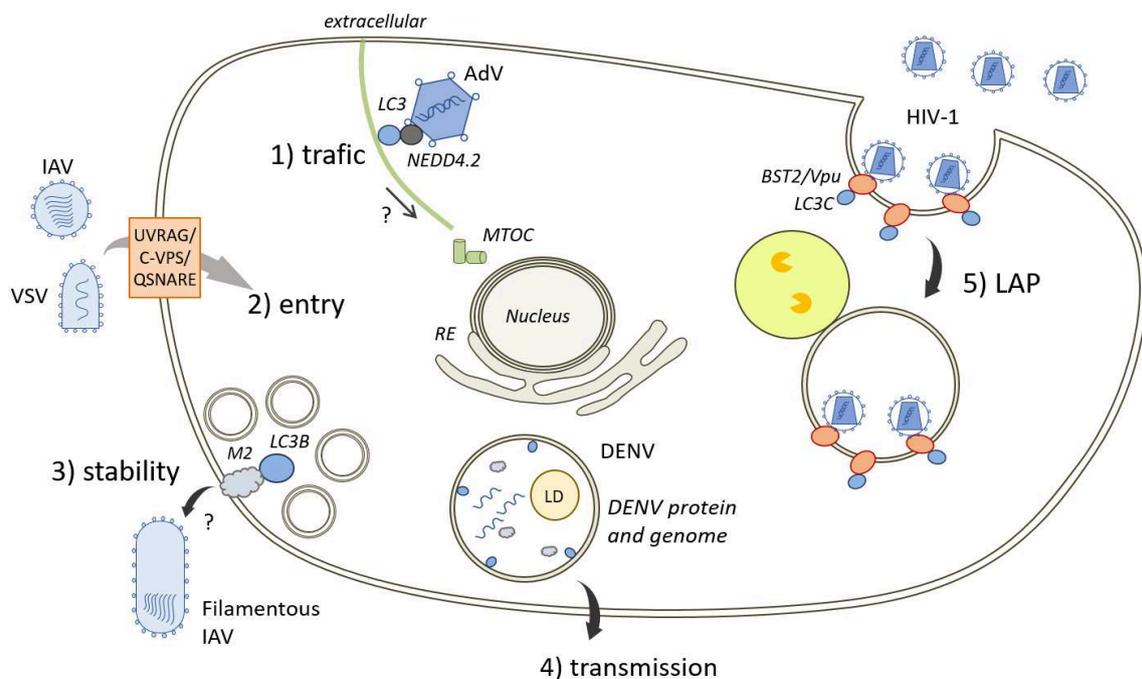


Figure 16 : Schéma représentant des exemples de subversions de protéines autophagiques.

1) La protéine LC3 interagit avec la E3 ubiquitine-protéine ligases NEDD4.2 qui interagit elle-même avec la protéine capsidale PVI de l'adénovirus (AdV). Ces interactions pourraient permettre le trafic de l'AdV jusqu'au noyau (d'après Montespan et al. 2017). 2) L'absence de la protéine UVRAG dans les cellules limite l'entrée du virus de la grippe A (IAV pour *Influenza A virus*) et du VSV (pour *vesicular stomatitis virus*), via son interaction avec les protéines VPS de classe C associés aux Q-SNARE. 3) La protéine M2 du IAV est présente à la membrane plasmique et interagit avec LC3B ce qui pourrait favoriser le bourgeonnement de structures virales filamenteuses ainsi que la stabilité des particules virales extracellulaires. 4) Le virus de la dengue (DENV) induit la sécrétion de vésicules infectieuses contenant du matériel génétique viral, LC3 et des marqueurs de gouttelettes lipidiques ce qui permet d'augmenter sa propagation. 5) Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) induit la

dégradation du facteur de restriction cellulaire BST2/tetherin par la LAP de façon dépendante de LC3C, BECN1 et ATG5 pour favoriser son bourgeonnement (d'après Modjo et al. 2016).

D'autres virus sont capables d'utiliser des éléments de la machinerie autophagique au cours de leur cycle viral, mais indépendamment de l'autophagie. C'est le cas par exemple de l'adénovirus (AdV) qui l'utilise lors de son transport vers le noyau dans les cellules hôtes (Montespan, Wiethoff, et al., 2017). Ce virus nu à ADN double brin appartenant à la famille des *Adenoviridae* entre très rapidement dans les cellules par endocytose. Le pH acide des endosomes permet un changement de conformation de la capsidette mettant en évidence la protéine de capsidette VI (PVI) qui est responsable de la rupture de la membrane endosomale. Cette détérioration membranaire entraîne l'exposition de glycanes coté cytoplasmique, reconnus par la galectine 8 puis le recrutement de récepteurs autophagiques (NDP52, p62/SQSTM1, TAXBP1 ou encore TRIM) entraînant la dégradation des membranes par l'autophagie (Montespan, Marvin, et al., 2017). La PVI interagit avec une protéine membre de la famille des E3 ubiquitine-protéine ligases NEDD4 (NEDD4.2) via son motif PPxY, et NEDD4.2 interagit à son tour avec LC3 via son domaine LIR (Sun et al., 2017; Wodrich et al., 2010). Sachant le rôle de LC3 dans le trafic des autophagosomes le long des microtubules jusqu'au MTOC, les auteurs proposent que les AdV soient acheminés au noyau par l'interaction PVI/NEDD4.2/LC3 associé au moteur moléculaire dynéine (Montespan, Wiethoff, et al., 2017; Viret et al., 2018).

Un autre exemple a été rapporté pour le virus de la grippe de type A (IAV pour *Influenza A virus*) et le virus de la stomatite vésiculaire (VSV pour *vesicular stomatitis virus*), des virus enveloppés à ARN (-) l'un appartenant à la famille des *Orthomyxoviridae* et l'autre à celle des *Rhabdoviridae* respectivement (Pirooz et al., 2014). L'infection de cellules KO pour UVRAG limite l'entrée du IAV et de VSV de façon indépendante de l'autophagie. La protéine UVRAG interagit avec les protéines VPS de classe C (tel que VPS11, VPS16, VPS18 et VPS33) qui en association avec les Q-SNARE, sont nécessaires à l'entrée de ces virus. Le IAV utilise également l'autophagie pour favoriser sa sortie de la cellule hôte (Gannagé et al., 2009). La protéine M2 du IAV est présente à la membrane plasmique et interagit avec LC3B via son domaine LIR, entraînant l'accumulation d'autophagosomes en périphérie de la cellule (Beale et al., 2014). Cette accumulation à la membrane plasmique pourrait favoriser le bourgeonnement de structures virales filamenteuses ainsi que la stabilité des particules virales extracellulaires, ce qui pourrait faciliter la transmission.

Une stratégie pour le DENV est d'augmenter sa propagation en induisant la sécrétion de vésicules contenant du matériel génétique viral (Wu et al., 2016). Cette étude a montré que ces vésicules infectieuses contenaient également la protéine LC3, et des marqueurs de gouttelettes lipidiques favorisant l'infectiosité et la propagation du virus de cellules à cellules. Cependant, cette étude ne met pas en avant l'utilisation de l'autophagie pour la sortie du virus.

Le dernier exemple est celui du VIH-1, virus enveloppé à ARN (+) appartenant à la famille des *Retroviridae*, qui pour favoriser son bourgeonnement, induit la dégradation d'un des facteurs de restriction cellulaire par la LAP. Le facteur de restriction cellulaire BST2/tetherin (pour *bone marrow stromal antigen 2*) est situé à la surface des cellules et est surexprimé lors de l'infection par le VIH-1, ce qui permet la rétention des virions lors de leur bourgeonnement. Afin d'empêcher cette restriction, la protéine virale Vpu reconnaît la partie cytoplasmique de BST2, permettant le recrutement de LC3C (Madjo et al., 2016). Ce complexe active la LAP, qui dépend des protéines BECN1 et ATG5. En induisant la LAP, le VIH-1 permet de dégrader spécifiquement la protéine BST2.

III.3. Utilisation des membranes autophagiques par les virus

Les cellules communiquent entre elles grâce à des échanges de matériels cytoplasmiques. Pour cela les cellules utilisent deux mécanismes pour transporter du matériel cytoplasmique à l'extérieur de la cellule : la voie conventionnelle de sécrétion, permettant d'acheminer des cargos (protéines, ions, lipides, etc.) via le RE, le TGN, l'appareil de Golgi et le système endosomal, et une voie non conventionnelle qui sécrète les protéines en détournant d'autres mécanismes comme les membranes autophagiques ou les exosomes (Ponpuak et al., 2015). Ces échanges se font grâce à des vésicules pouvant être d'origine apoptotique (1000 – 5000 nm), des microvésicules ou microparticules (100 – 1500 nm) ou encore des exosomes (30 - 150 nm) (van der Pol et al., 2012). Ces vésicules sont sécrétées par la plupart des cellules et contiennent des protéines, des lipides ou encore des acides nucléiques. Le contenu des vésicules est régulé par les conditions environnementales et la production de ces vésicules influence le microenvironnement cellulaire (Sadeghipour & Mathias, 2017). Il existe un mécanisme de sécrétion dérivé de l'autophagie et on parle même « d'autophagie sécrétoire » bien que cela ne réponde pas à la définition de l'autophagie, qui est d'apporter du matériel cytoplasmique aux lysosomes pour être dégradé (Zahoor & Farhan, 2018). Ce mécanisme est plutôt un détournement de l'autophagie, c'est-à-dire que des protéines impliquées dans le processus autophagique sont utilisées par la machinerie sécrétoire. Les vésicules intracellulaires produites sont des vésicules à double membrane dont la membrane externe ne

fusionne pas avec les lysosomes mais avec la membrane plasmique pour libérer une vésicule à simple membrane. La cellule peut utiliser la machinerie autophagique pour sécréter du matériel cytoplasmique de même que les virus peuvent l'utiliser pour sortir de la cellule. Pour cela, certains virus détournent ces membranes pour se multiplier, s'envelopper, et sortir, ce qui peut améliorer leur propagation lors de la réinfection des cellules voisines (Figure 17).

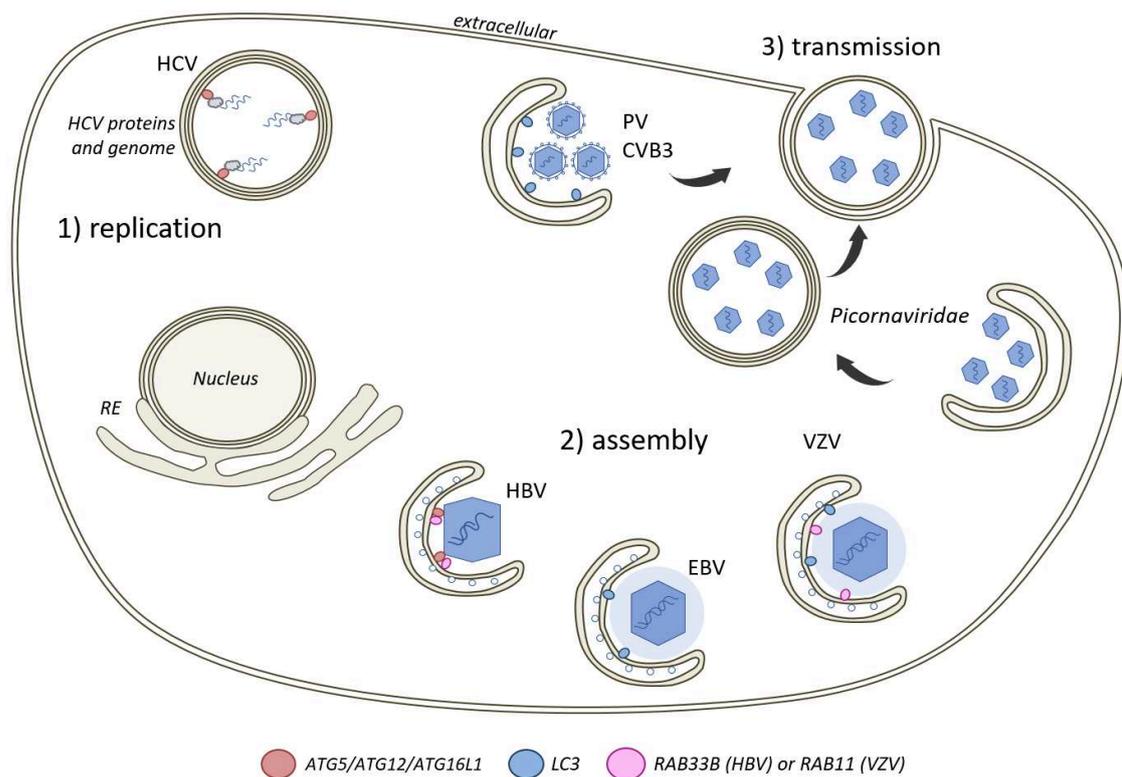


Figure 17 : Schéma représentant des exemples de subversions des membranes autophagiques.

1) Les protéines non structurales du virus de l'hépatite C (HCV) interagissent avec le complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 au sein de vésicules à double membrane dans lesquelles HCV se multiplie. **2)** Le complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 en association avec RAB33B permettent la formation et le trafic des nucléocapsides du virus de l'hépatite B (HBV). De plus, ATG12 est retrouvée associée aux particules HBV. Les herpesvirus comme le virus Epstein barr (EBV) ou virus varicelle-zona (VZV), utilisent des structures à double membrane pour s'envelopper. La protéine LC3 est retrouvée au sein de l'EBV et est nécessaire à son assemblage. Pour le VZV, les protéines LC3B et RAB11 sont retrouvées dans la particule virale et participent à l'enveloppement des virus. **3)** Le poliovirus (PV) et le coxsackievirus B3 (CVB3) induisent la formation de vésicules à double membrane riches en LC3-II, dans lesquelles les virus se répliquent et sortent de la cellule par sécrétion médiée par la machinerie autophagique. La membrane externe fusionne avec la membrane plasmique laissant sortir des vésicules contenant les particules virales. Cette stratégie permet de favoriser la transmission cellule/cellule. Cette stratégie est aussi utilisée par les virus nus appartenant à la famille des *Picornaviridae*, pour sortir de la cellule et augmenter leur propagation.

III.3.a. Membranes utilisées pour la réplication et/ou l'assemblage des virus

Certains virus se répliquent dans le noyau, tandis que d'autres se répliquent dans le cytoplasme. C'est pourquoi, ces derniers ont développé des stratégies pour former des sites de réplication et d'assemblage, appelé « viroplasma » afin de regrouper les composants du futur virion et de se protéger des défenses de la cellule hôte. Différents virus à ARN (+) ont des sites de réplication impliquant des vésicules à simple ou double membrane (D. Paul & Bartenschlager, 2013). Par exemple, le HCV, le poliovirus ou encore les coxsackievirus se répliquent dans des vésicules à double membrane toutes associées au RE (M. Arakawa & Morita, 2019; Mohamud & Luo, 2019; D. Paul & Bartenschlager, 2013; Welsch et al., 2009). Pour le HCV, il a été montré que le complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 interagissait avec des protéines non structurales du HCV dans ces vésicules à double membrane, indépendamment de la protéine LC3B (Fahmy et al., 2018). Le débat est de savoir si les structures détournées par les virus sont 1) des autophagosomes immatures, c'est-à-dire qui ne fusionneront pas avec des lysosomes, 2) des structures utilisant la machinerie autophagique ou 3) des structures indépendantes de l'autophagie.

Les virus enveloppés utilisent également les membranes autophagiques pour s'assembler. C'est le cas du HBV, virus enveloppé à ADN partiellement double brin appartenant à la famille des *Hepadnaviridae* (Döring et al., 2018). Le HBV induit la formation d'autophagosomes et bloque leur fusion avec les lysosomes (Li et al., 2011). Le complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 en association avec RAB33B permet la formation et le trafic des nucléocapsides de HBV au niveau des sites de bourgeonnement dans le cytoplasme (Döring et al., 2018). RAB33 est une protéine de l'appareil de Golgi qui interagit avec ATG16L1 pour moduler la formation des autophagosomes (Itoh et al., 2008; Sørensen et al., 2018). De plus, ATG12 est retrouvée associée aux particules de HBV purifiées. En revanche, LC3 et la lipitation de la famille LC3 en général ne semblent pas jouer de rôle dans la morphogénèse de HBV, puisque la déficience en LC3B ou l'utilisation d'un dominant négatif ATG4B ne semble pas affecter la réplication virale (Döring et al., 2018).

L'EBV utilise également les membranes autophagiques au cours de son cycle productif. Il infecte les lymphocytes B de manière latente mais peut être réactivé soit par l'ajout de drogues, soit par transfection d'un plasmide codant pour un gène viral précoce, afin de produire des particules virales. Il a été montré que la réactivation de l'EBV bloque la formation des autolysosomes afin d'empêcher sa dégradation pour favoriser sa multiplication (Granato et al., 2014). L'invalidation de différentes protéines autophagiques entraîne une

diminution de la production virale, montrant un rôle proviral de l'autophagie pour l'EBV. Il a été également montré que LC3 était présent au sein de la particule virale et que cette protéine est nécessaire pour l'assemblage et la sortie virale (Nowag et al., 2014). Cependant les autres protéines autophagiques n'ont pas été recherchées dans les particules virales. Il semblerait qu'un autre Herpesvirus, le VZV, stimule l'ensemble du processus autophagique et utilise les membranes autophagiques pour s'assembler (Buckingham et al., 2016). En effet, après purification des particules virales extracellulaires, la forme lipidée de LC3B ainsi que la protéine RAB11 sont retrouvées associées aux particules. En microscopie électronique, ces protéines colocalisent avec une protéine d'enveloppe du VZV dans les particules. Dans les cellules infectées, les particules virales sont observées dans des vésicules à simple membrane, ce qui pourrait correspondre à des amphisomes qui comprennent habituellement ATG9, ATG16L1 ainsi que RAB11 (Puri et al., 2018; Søreng et al., 2018). Deux récentes études du même laboratoire décrivent que le traitement des cellules par la Bafilomycine A1 induit une détérioration du compartiment d'assemblage du VZV, ainsi qu'un défaut de morphologie des capsides (Girsch et al., 2019, 2020). La Bafilomycine A1 inhibe les pompes à protons ATPase vacuolaires, ce qui entraîne un blocage de la dégradation dépendante du pH acide comme la dégradation lysosomale. Ces études montrent que le VZV se trouve associé à des protéines retrouvées dans des vésicules de type endosome tardif ou encore lysosome suggérant que le VZV utilise l'ensemble du processus autophagique (Buckingham et al., 2016; Girsch et al., 2020). En revanche, les auteurs n'expliquent pas comment le virus échappe à la dégradation.

III.3.b. L'autophagie utilisée pour améliorer la propagation des virus

Les virus peuvent utiliser la machinerie autophagique pour favoriser leur propagation. C'est le cas du poliovirus, qui induit la formation de vésicules à double membrane dans lequel le virus se réplique (Jackson et al., 2005). Les virus sont englobés dans des structures à double membrane riche en LC3-II, et sortent de la cellule suite à la fusion de la membrane externe de la vésicule, à la membrane plasmique (cf. sécrétion médiée par la machinerie autophagique) (Jackson et al., 2005; D. Paul & Bartenschlager, 2013). Ces vésicules extracellulaires comportent plusieurs particules virales et favorise la transmission cellule/cellule comme un « cheval de Troie » (Mutsafi & Altan-Bonnet, 2018). Le CVB3 augmente la formation de vésicules à double membrane et augmente la quantité de LC3-II, il utiliserait « l'autophagie sécrétoire » pour sortir de la cellule (Robinson et al., 2014). Une stratégie des virus nus, qui sortent habituellement de la cellule par lyse de celle-ci, est d'utiliser « l'autophagie sécrétoire » pour augmenter leur transmission. Il est maintenant admis qu'un certain nombre

de ces virus de la famille des *Picornaviridae* peuvent s'envelopper dans des vésicules qui sont ensuite excrétées par « autophagie sécrétoire », ce qui participe notamment à la transmission de cellule à cellule et pourrait augmenter l'infectivité (Bird et al., 2014).

III.4. Autophagie et HCMV

Dans ce paragraphe, j'ai choisi de parler des études menées sur le détournement de l'autophagie par HCMV qui ont été publiées avant mon arrivée en thèse.

Notre laboratoire a été le premier à mettre en évidence l'interaction entre le HCMV et l'autophagie (Chaumorcel et al., 2008). Dans cet article, il avait été montré que l'infection entraînait une inhibition de l'autophagie à partir de 24h, avec une diminution du nombre d'autophagosomes alors marqués par la GFP-LC3B et une accumulation de p62/SQSTM1 dans des fibroblastes humains. Pour aller plus loin, il avait aussi été montré que l'infection par HCMV module précocement la voie mTORC1 pour inhiber l'autophagie. Puis, un autre laboratoire a montré une activation de l'autophagie plus précocement dans le cycle viral, dès l'entrée du HCMV (McFarlane et al., 2011). Il semble qu'un composant du virion soit responsable de l'induction de l'autophagie. En effet, l'accumulation de LC3-II est toujours visible lorsque les cellules sont exposées au HCMV inactivé par un traitement UV (qui permet de dénaturer l'ADN viral et donc de bloquer la synthèse protéique virale). Cette induction précoce de l'autophagie est retrouvée avec HSV-1, mais pas avec le virus respiratoire syncytial (virus enveloppé à ARN (-) appartenant à la famille des *Paramyxoviridae*). L'infection par un virus enveloppé n'est donc pas suffisante pour induire la lipodation de LC3B. De plus, ni les protéines du tégument, ni les glycoprotéines d'enveloppe ne suffisent à déclencher l'autophagie puisque l'exposition des cellules à des corps denses (DB) ne déclenche pas de stimulation de l'autophagie. Les auteurs proposent que soit le génome viral lui-même soit la nucléocapside permet la stimulation l'autophagie.

Notre laboratoire a ensuite précisé la chronologie du détournement de l'autophagie par HCMV (Chaumorcel et al., 2012; Mouna et al., 2016). Il a été confirmé que dès son entrée dans les cellules, HCMV induit l'autophagie de façon indépendante des protéines virales néosynthétisées. Puis nous avons montré que le HCMV bloque l'autophagie mais aussi le flux autophagique, grâce à deux protéines virales néosynthétisées. En effet, l'expression ectopique des deux protéines TRS1 et IRS1 est suffisante et nécessaire au blocage du flux autophagique (Mouna et al., 2016). De plus, les auteurs mettent en évidence que TRS1 et IRS1 interagissent avec BECN1 via leur domaine N-terminal, et que cette liaison est nécessaire à l'inhibition de

l'autophagie. Des études avaient montré que d'autres protéines virales (ICP34.5 de HSV-1 et vBcl-2 de HHV-8) inhibaient l'autophagie en interagissant avec la protéine BECN1 (Orvedahl et al., 2007; Sinha et al., 2008). Comme ICP34.5 est également capable d'inhiber la voie de signalisation PKR/eIF2 α , nous nous sommes penchés sur les homologues fonctionnels d'ICP34.5 chez HCMV, les protéines TRS1 et IRS1 (Child et al., 2004; Orvedahl et al., 2007; Ziehr et al., 2016). Le blocage de l'autophagie par TRS1 et IRS1 est toujours présent si ces protéines sont exprimées dans des cellules *PKR* *-/-*, ce qui montre que malgré leur liaison directe avec PKR, TRS1 et IRS1 agissent de façon indépendante de cette voie pour inhiber l'autophagie.

Pour aller plus loin, l'effet de la modulation de l'autophagie a été étudié sur la réplication virale. Le traitement des cellules infectées par HCMV avec un inhibiteur de l'autophagie : 3-MA ou Spautine, entraîne une diminution des titres viraux (Mouna et al., 2016; Zhao et al., 2013). De même, la réplication virale est plus faible dans des cellules exprimant un shARN dirigé contre le gène codant ATG16L1. A l'inverse, l'induction de l'autophagie par traitement à la rapamycine, à la méthyl beta cyclodextrine ou simplement par la carence nutritive, augmente les titres viraux par rapport aux contrôles.

L'ensemble de ces résultats indique que l'autophagie pourrait avoir un effet bénéfique sur la réplication du HCMV. La question est de savoir à quelle étape du cycle du HCMV l'autophagie joue un rôle.

Présentation des travaux

Introduction de l'article

L'autophagie est un processus permettant d'apporter du matériel cytoplasmique au lumen lysosomal pour dégrader ou recycler des composés. Ce processus peut être utilisé comme mécanisme antiviral par la cellule, pour dégrader les virus ou leurs composants ou encore pour participer à l'immunité innée ou humorale. La cellule utilise elle-même la machinerie autophagique pour sécréter du matériel (cf. autophagie sécrétoire), ou pour la dégradation par phagocytose associées à LC3 (LAP pour *LC3-associated phagocytosis*). Au cours de l'évolution, les virus ont développé des stratégies pour détourner ou neutraliser ce mécanisme cellulaire.

Le cytomégalovirus humain (HCMV) est un Herpesvirus ubiquitaire responsable d'infection congénitale et d'infection opportuniste chez les sujets immunodéprimés. Le virus entre dans les cellules par endocytose ou par fusion directe avec la membrane plasmique, la nucléocapside (NC) est acheminée au noyau où les protéines très précoces puis précoces sont exprimées. L'ADN viral est ensuite répliqué, puis les protéines tardives sont exprimées. Les NC subissent un premier enveloppement au travers la membrane nucléaire afin d'atteindre le cytoplasme. Puis, les NC acquièrent leur enveloppe finale dans le compartiment d'assemblage viral (vAC) puis les virions sortent de la cellule par exocytose.

Le laboratoire s'intéresse aux interactions hôte-pathogène et en particulierité, le détournement du processus autophagique par les Herpesvirus. Il a précédemment été montré au laboratoire que le HCMV stimulait l'autophagie dans des fibroblastes humains au début du cycle viral, puis, qu'au cours de l'infection, le virus inhibait ce processus grâce à des protéines virales néosynthétisées (Chaumorcel et al., 2008, 2012). Ces études ont été approfondies et deux protéines virales impliquées dans l'inhibition de l'autophagie ont été identifiées, IRS1 et TRS1. Elles interagissent avec BECN1 via leurs domaines N-terminal, ce qui entraîne l'inhibition de l'autophagie et notamment du flux autophagique (Mouna et al., 2016). L'infection par le HCMV dans des fibroblastes entraîne une accumulation de LC3B-II, un marqueur des autophagosomes, dans les cellules infectées. Cette accumulation est due à une diminution de la dégradation de LC3 par blocage du flux autophagique mais son rôle au cours de l'infection reste à déterminer. D'autre part, il a été montré par une approche pharmacologique que l'autophagie est bénéfique pour la multiplication virale (Mouna et al., 2016). L'utilisation de molécule chimique n'est pas la meilleure technique pour étudier précisément l'autophagie, c'est le cas par exemple d'une étude menée sur HCMV qui,

contredit le papier de notre laboratoire Mouna et al, 2016 (Belzile et al., 2016). Dans ce papier, les auteurs étudient l'effet du tréhalose, une molécule non toxique retrouvée dans certains organismes capable d'induire l'autophagie, sur le cycle du HCMV. Les auteurs montrent que le tréhalose inhibe la multiplication du HCMV, mais ne démontrent pas que cette inhibition est due à la stimulation de l'autophagie. Ce résultat montre que l'utilisation de molécules pharmacologiques n'est pas un bon modèle pour démontrer et conclure sur le rôle anti ou pro-virale de l'autophagie.

Dans cet article nous avons établi des lignées stables déficientes en autophagie et confirmé son rôle pro-viral. Nous avons également regardé l'impact de l'autophagie sur l'entrée du HCMV, l'expression de ses protéines et de son génome, et enfin sur l'assemblage final des virus dans ces différentes lignées. Nous avons ensuite caractérisé l'implication de certaines protéines de l'autophagie sur l'étape d'enveloppement des virus.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Human cytomegalovirus hijacks the autophagic machinery and LC3 homologs in order to optimize cytoplasmic envelopment of mature infectious particles

Clémence Taisne¹, Marion Lussignol¹, Eva Hernandez¹, Arnaud Moris^{1,2}, Lina Mouna^{1,3} & Audrey Esclatine¹

During its life cycle, Human cytomegalovirus (HCMV) tightly modulates autophagy, a vesicular pathway allowing degradation and recycling of cellular components. To study the interplay between autophagy and the viral life cycle, we established various autophagy-deficient human fibroblastic cell lines. By knocking down the expression or activity of five autophagy-related proteins, we confirmed the proviral function that the autophagic machinery exerts on HCMV production. Using 3D reconstruction from confocal microscopy and electron microscopy, we demonstrated that lipidated LC3-positive vesicles accumulated at the viral assembly compartment (vAC). The vAC is a juxtannuclear ring-shaped structure containing several organelles and membranes, where assembly and final envelopment of HCMV particles occur. Two LC3 homologs, GABARAPL1 and GATE16, also accumulated during HCMV infection and were associated with the vAC, in proximity with fragmented Golgi stacks. Additionally, we observed the formation of a pre-assembly compartment (PrAC) in infected cells, which consists of a juxtannuclear structure containing both fragmented Golgi and LC3-positive vesicles. Finally, we showed that highly purified extracellular viral particles were associated with various autophagy proteins. Our results thus suggest that autophagy machinery participates to the final cytoplasmic envelopment of HCMV viral particles into the vAC and that autophagy-related proteins can be spotted in the virions.

Human cytomegalovirus (HCMV) is one of the 8 Herpesviruses that can specifically infect humans, along with Herpes Simplex virus type 1 (HSV-1), Epstein-Barr virus (EBV) or Varicella Zoster virus (VZV). Its genome consists of a large double-stranded DNA, protected by an icosahedral capsid, surrounded by a tegument formed of viral phosphoproteins and an envelope derived from cell membranes decorated with viral glycoproteins¹. HCMV infects many cell types, such as endothelial cells, macrophages or epithelial cells but its replication cycle is primarily studied in human fibroblasts. In these cells, HCMV enters the cytoplasm by fusion with the plasma membrane and its nucleocapsid (NC) is targeted to the nucleus using the microtubule network. The viral genome is introduced into the nucleus through nuclear pores, transcribed in a temporal pattern and immediate-early, early and late viral proteins are sequentially expressed in the cytoplasm. Capsid and tegument proteins are transported within the nucleus where NC assembly occurs. NCs surrounded by tegument proteins then translocate to the cytoplasm by transient wrapping with the inner nuclear membrane and fusion with the outer one. Simultaneously, the nucleus enlarges and adopts a kidney shape characteristic of HCMV-infected cells^{2,3}. The viral assembly compartment (vAC), a structure specific to HCMV is housed in the area of the cytoplasm delimited by the nucleus indentation^{4,5}. The vAC is composed of a set of vesicles organized concentrically around a microtubule organizing center (MTOC) and is a consequence of a drastic rearrangement of the secretory and endocytic organelles within the cytoplasm⁶. Early endosomes, surrounded by Trans Golgi Network (TGN) are found in the inner part

¹Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198, Gif-sur-Yvette cedex, France. ²Sorbonne Université, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), INSERM U1135, CNRS ERL 8255, Paris, France. ³Virologie, APHP, Hôpital Paul Brousse, 94800, Villejuif, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.E. (email: audrey.esclatine@u-psud.fr)

of the vAC, while Golgi stacks form a ring at the outer part of the structure⁷. Markers of late endosomes are also found in the vAC while endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria are excluded. Viral tegument and envelope proteins accumulate in the vAC allowing final tegumentation and envelopment of NCs released from the nucleus. The exact composition of HCMV envelopes is still discussed: although it is accepted that these are TGN membranes, studies show that other vesicular membranes can be used^{5,8}. Both the mechanism of vAC formation and the acquisition of viral final envelope are still not clearly elucidated. Finally, enveloped viruses surrounded by vesicles travel to the plasma membrane, where they exit the cell by exocytosis. In fibroblasts, the entire process of the viral cycle is long and lasts for 4 to 5 days.

We previously studied the relationships between HCMV and a vesicular process that degrades and recycles many cellular components and organelles, named autophagy^{9–11}. The autophagic vesicles, or autophagosomes, are double-membrane structures in charge of capturing cytoplasmic cargos¹². The autophagosome arises from a phagophore, a transient cup-shaped double-membrane structure, which gradually elongates and seals to constitute the autophagosome. From the formation of the phagophore to the fusion of the autophagosome with the lysosome, autophagy requires dozens of Atg proteins related (ATG) proteins which were initially identified by genetic analysis in yeast. LC3, a mammalian homolog of yeast ATG8, can be conjugated with a lipid, phosphatidylethanolamine (PE) thanks to several ATG proteins to form LC3-PE, also called LC3-II. The ubiquitin-like conjugation system of LC3 requires an E3-like ATG5-ATG12/ATG16L1 complex. A second conjugation system comprising the E1-like ATG7 and E2-like ATG10 allows the conjugation of ATG5 with ATG12¹³. LC3-II mediates several functions, elongation and/or sealing of phagophores but also recognition of selective cargoes through autophagic receptors such as p62/SQSTM1. Human cells encode several ATG8 homologs, divided into two subfamilies: LC3, which includes LC3A B and C, and GABARAP, which includes GABARAPL1 and GATE16 (GABARAPL2), and all of them can be lipidated¹⁴. To be conjugated with PE, ATG8 homologs need to be first processed by ATG4B, the sole protease among ATG proteins, exposing a glycine residue at their C-terminus¹⁵. The second role of ATG4B is to hydrolyze lipids from LC3 (and its homologs) to recycle it into LC3-I. Autophagy is highly regulated by several key complexes. The complex containing ULK1, ATG13, FIP200 and ATG101 is essential for membrane nucleation and, in response to stress, it activates the complex containing ATG14, BECN1 and VPS34, which promotes autophagosome formation^{16,17}. A second BECN1 complex is involved in autophagosome maturation. It is also important to mention that lipidated LC3 can be inserted into single membrane compartments of the endolysosomal system, including LC3-associated phagocytosis, macropinocytosis or entosis^{18,19}. These processes are referred to as non-canonical autophagy and in that case, LC3 lipidation is independent from the upstream autophagic regulators, such as ULK1.

We and others have observed that HCMV is able to regulate autophagy throughout the viral cycle^{11,20,21}. It initially activates the formation of autophagosomes to secondly block the fusion of autophagosomes with lysosomes and thus blocks the degradation step¹⁰. HCMV thus inhibits the so-called autophagic flux, leading to an accumulation of non-degraded LC3 during viral infection¹¹. At least two viral proteins, IRS1 and TRS1, are involved in inhibiting autophagy, whereas early autophagy activation could be related to the presence of the viral genome in infected cells^{11,20}. We previously reported that pharmacological induction of autophagy leads to an increased viral production while its inhibition decreases HCMV production¹¹. Autophagy thus exerts a proviral activity. However, the specific part(s) of the viral cycle favored by autophagy is currently unknown as well as the step of autophagy (i.e. initiation, maturation, and degradation) required to mediate this enhancement of HCMV production.

In this work, we aimed at studying the impact of autophagy on the different stages of HCMV multiplication using different cell lines deficient in autophagy. Invalidation of several autophagy proteins makes it possible to differentiate the specific role of a particular ATG protein or of the whole autophagic process.

Results

Knockdown of autophagy proteins decreases production of infectious viral particles. We have previously shown that pharmacological inhibition of autophagy reduced HCMV production¹¹. In order to define the effector(s) involved in this process, we studied HCMV multiplication in human foreskin fibroblasts (HFF) invalidated for different autophagy proteins. To this purpose, we first established cell lines stably expressing a *trans*-dominant negative form of ATG4B (ATG4B C74A) or shRNA targeting the expression of LC3B (shLC3B), ATG5 (shATG5), BECN1 (shBECN1) and ULK1 (shULK1), using transduction with different lentiviral vectors as described in the Methods section²². Inhibition of autophagy and protein silencing were confirmed in the different cell lines (Fig. 1A). The inhibitory activity of ATG4B C74A was demonstrated by accumulation of the non lipidated form of LC3 (LC3-I) because ATG4B C74A both impairs LC3 lipidation (LC3-II formation) and sequesters LC3 from cytosol²³. Moreover, cell proliferation was not significantly impacted by the knockdown of autophagy proteins (Supplementary Fig. S1). In order to evaluate viral production in these different cell lines, cells were infected with HCMV at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 during 10 days and viral titers were evaluated in the supernatant (Fig. 1B). We observed a decreased production of HCMV in all the autophagy-deficient cell lines tested. Viability of cells infected in the same conditions at the same MOI was not significantly affected by the knockdown of autophagy proteins (Supplementary Fig. S1).

In order to test whether the effect of autophagy was not restricted to the HCMV strain we used (AD169), we also infected cells with TB40/E HCMV strain, which has a broad cell tropism²⁴. In ATG4B C74A HFF, we observed a similar decrease in TB40/E viral production (Supplementary Fig. S1), showing a beneficial effect of autophagy independently of the viral strain used. These results demonstrate that several components of the autophagic process are required to improve HCMV production.

LC3-positive vesicles accumulate in the viral assembly compartment. We had previously reported a progressive accumulation of LC3-II during HCMV infection¹⁰. In order to study the subcellular localization of

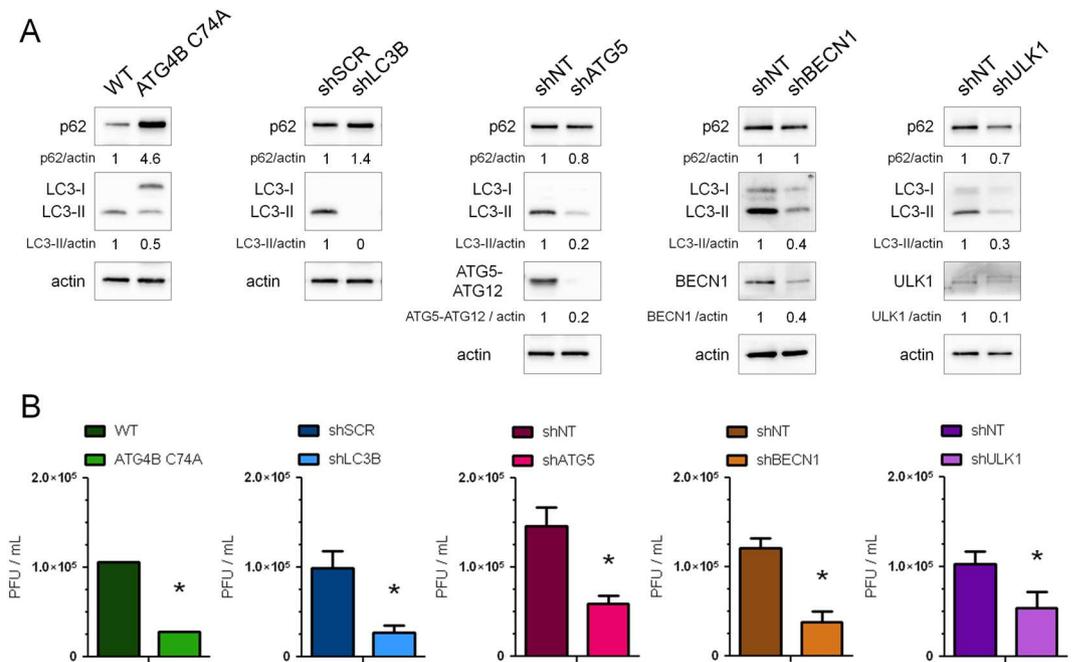


Figure 1. Several autophagic proteins are beneficial for HCMV production. Stable HFF cell lines either expressing a dominant-negative mutant of ATG4B or knockdown for the indicated autophagic proteins (LC3B, ATG5, BECN1 or ULK1) and their corresponding control cell lines (WT: wild type HFF, shSCR: scrambled shRNA, shNT: non-target shRNA) have been used. **(A)** Immunoblot analysis of p62, LC3B, ATG5, BECN1 and ULK1 expression confirms the inhibition of autophagy in the indicated cell lines. Actin was used as a loading control. Full-length blots are presented in Fig. S7 **(B)** Viral titers were determined 10 days post-infection with HCMV AD169 strain at MOI 0.01 in the different cell lines. Error bars indicate SEM from at least three independent experiments. * $p < 0.05$ (Student's t test).

LC3 during HCMV life cycle, we co-immunostained LC3 with pp28, a tegument viral protein or with GM130, a Golgi marker, (Fig. 2A,B respectively), which both localize within the viral assembly compartment (vAC) during infection^{3,4,6}. We clearly observed an accumulation of LC3 puncta within this juxtanuclear compartment four days post-infection (pi). In contrast, LC3 puncta were homogeneously distributed in the cytoplasm of mock-infected cells (Fig. 2). Three-dimensional reconstructions from z-series confocal microscopy images confirmed the accumulation of LC3 puncta mainly in a ring-shaped structure centered on the vAC with partial colocalization with pp28 and minimal colocalization with Golgi fragments (Supplementary Information S2,S3). We noticed that the vAC was located in the hollow of the characteristic kidney-shaped nucleus of infected cells (clearly visible in Fig. S3). Early endosomes, labeled with EEA1 (early endosome antigen 1), localized in the center of vAC in HCMV infected cells (Fig. 2C and Supplementary S4), as expected⁷, and were surrounded by LC3 puncta. Late endosomes/lysosomes (LAMP1-positive) were also observed within the vAC and partially colocalized with LC3 (Fig. 2D). Therefore, our studies suggest that LC3 puncta are present at the outer edge of the vAC in a ring-like pattern, interspersed with a Golgi marker. In order to explore whether LC3 puncta present inside the vAC were lipidated LC3 or not, we used two tagged versions of LC3, p41-LC3, which corresponds to the native form of LC3 and p41-LC3 G120A, which contains a well-characterized mutation of LC3 impeding its lipidation²². By immunostaining of either GM130 or pp28 to visualize the vAC and staining of exogenous LC3, we observed that LC3 G120A was homogeneously distributed in the cytoplasm, whereas wild-type LC3 was present into the vAC (Fig. 2E). To confirm that LC3 was associated with membranes, HFF cells infected by HCMV were permeabilized before fixation to remove soluble proteins from the cytosol and immunostained for LC3 and vAC. LC3 staining was still visible in the vAC in these conditions (Fig. 2F), demonstrating that LC3 present in the vAC is associated with membranes. Taken together, our results clearly demonstrated that vAC contained LC3-II-positive vesicles.

We then performed time-course experiments to determine when LC3-positive vesicles start to accumulate in the area close to the nucleus after HCMV infection (Fig. 3). To identify infected cells, we used an antibody directed against immediate-early antigens IE1 and IE2 (nuclear localization), since pp28 is expressed later and therefore would not be detected at early times of infection. In HCMV-infected cells, we observed that modifications of the nucleus shape occurred as early as 10 hours pi. At this time point, LC3 also started to accumulate in the hollow of the nucleus in proximity with the Golgi marker (Fig. 3A). Between 24 and 48 hours pi, LC3 began to localize in a pre-assembly compartment (PrAC) together with Golgi fragments.

Autophagy does not play a role in HCMV infection before assembly of viral particles. Impact of autophagy deficiency in different steps of HCMV life cycle was studied using cells stably expressing ATG4B C74A or cells expressing shLC3B, shATG5 or shBECN1 (Fig. 4). The appearance in the nucleus of the tegument protein pp65, which is contained in the incoming viral particles, can be used to monitor viral entry²⁵. We infected

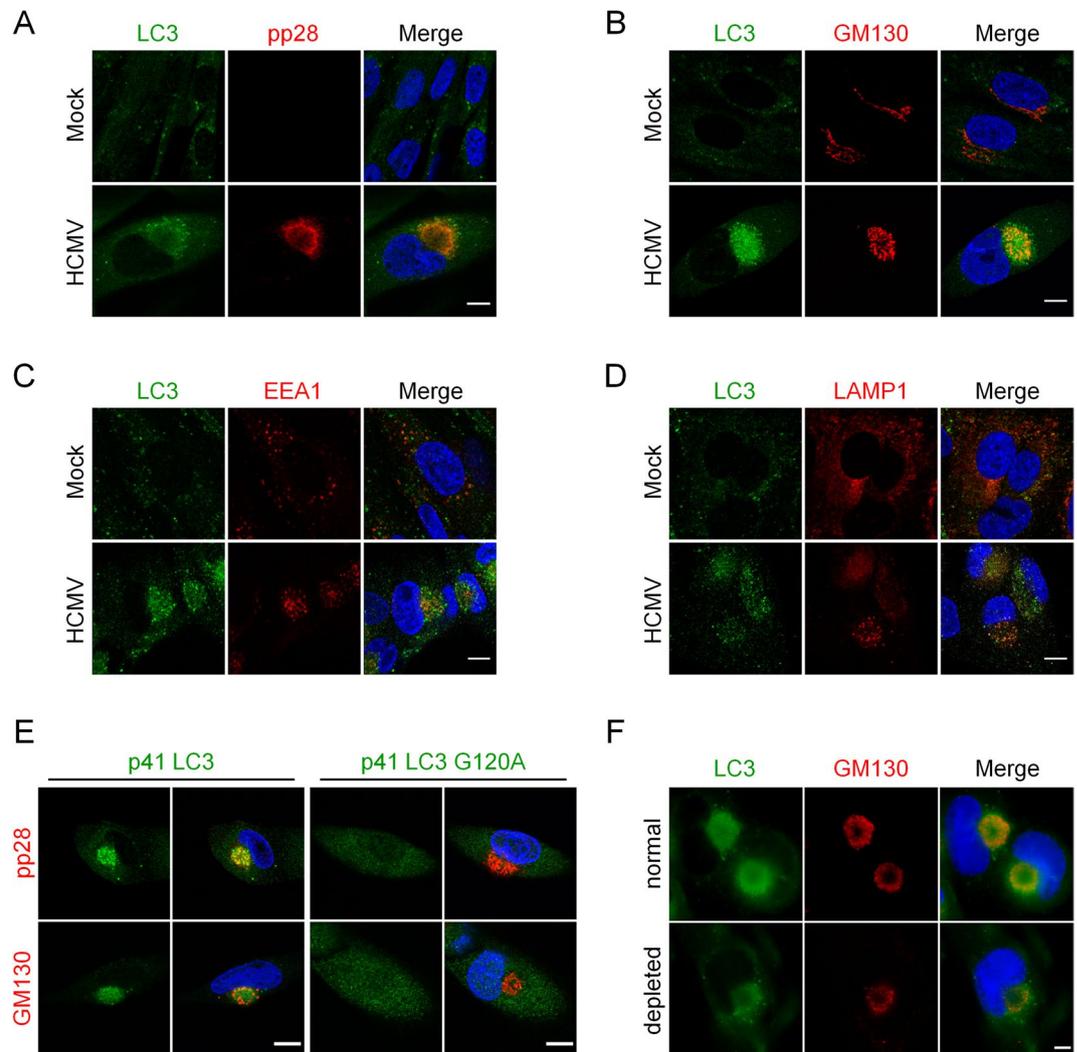


Figure 2. Vesicles containing lipidated form of LC3 accumulate in the vAC. Confocal images of HFF mock-infected (Mock) or infected with HCMV AD169 strain at MOI 0.5 for 4 days and immunostained for LC3 and (A) pp28 (viral tegument protein), (B) GM130 (Golgi marker), (C) EEA1 (early endosome marker), or (D) LAMP1 (late endosome/lysosome marker). Representative images of 3 independent experiments. See also supplementary videos S2-4. (E) Confocal images of cells stably expressing p41-LC3 or p41-LC3 G120A infected with HCMV at MOI 0.5 for 4 days and immunostained for exogenous LC3 with pp28 or GM130. (F) Representative images of WT HFF infected with HCMV at MOI 0.5 for 4 days, and permeabilized either after fixation (“normal”) or before fixation (“depleted”) to eliminate soluble cytosolic proteins. Cells were immunostained for LC3 and GM130. Nuclei were subsequently stained with DAPI. Scale bar = 10 μm .

cells with HCMV for 2 hours and labelled for pp65 and DAPI to determine the percentage of pp65-positive cells (Fig. 4A). No significant difference in viral entry was noted between the different cell lines. Using qPCR, we also quantified viral genome accumulation four days pi, and observed that knocking down the expression of autophagy proteins such as LC3B, ATG5, BECN1 or ATG4B did not modulate viral genome replication (Fig. 4B). We also monitored the expression of viral proteins IE1/IE2, TRS1/IRS1 and pp28 in different deficient cell lines (Fig. 4C). Globally, we did not observe a clear impact on viral protein expression, although we noticed a slight decrease of pp28 expression in the different cell lines and a decreased expression of TRS1 and IRS1 in ATG4B C74A cells. Extension of our analysis to 7 days pi (Supplementary Fig. S5) suggested that expression of IRS1/TRS1 was only delayed in ATG4B C74A cells. Finally, we evaluated the impact of autophagy on viral release from fibroblasts by titration of cell-associated viral particles in single step growth experiments (Fig. 4D). We observed that viral titers are lower in deficient cells, demonstrating that the role of autophagy precedes the exit of HCMV by exocytosis. Taken together, our results suggested that the autophagic machinery did not significantly participate in viral entry, genome replication, viral protein expression and viral release.

ATG8 homolog-positive vesicles accumulate in the vAC. Until now, we have focused our work on the subcellular localization of LC3 in infected cells. We then decided to investigate the fate of other mammalian ATG8 homologs, GABARAP1 and GATE16 (GABARAP2) during HCMV infection^{14,26}. Co-immunostaining

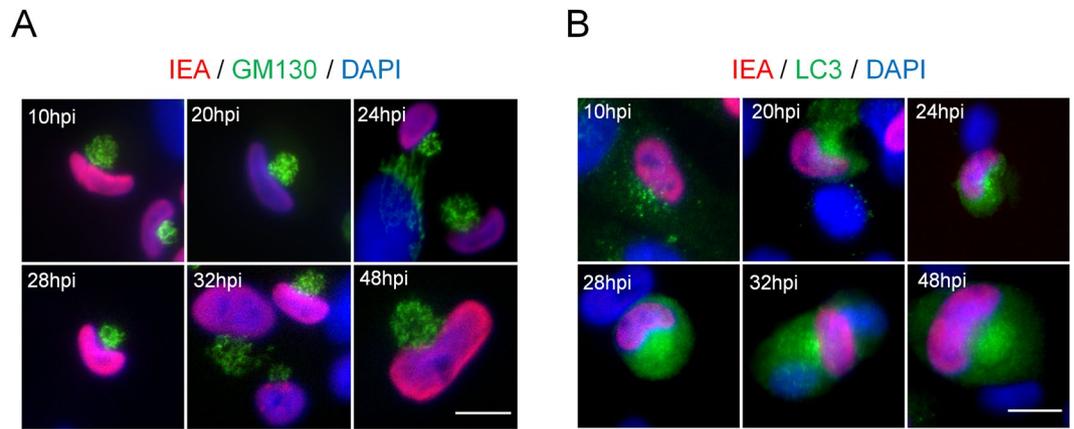


Figure 3. Formation of a pre-assembly compartment (PrAC) containing Golgi stacks and LC3 starts early in the viral life cycle. (A,B) Representative images of HFF infected with HCMV AD169 strain at MOI 1 during 10 to 48 hours and immunostained for IEA (immediate-early viral antigens) and for GM130 (A) or LC3 (B). Nuclei were subsequently stained with DAPI. Representative images of 2 independent experiments. Scale bars = 10 μm .

demonstrated that GABARAPL1 was found inside the vAC 4 days pi and colocalized with LC3 (Fig. 5A). Like previously, the vAC was labeled with GM130/pp28 staining. Similarly, GATE16 localized in the vAC after HCMV infection (Fig. 5B). Interestingly, in the same images, GATE16 and GABARAPL1 were almost undetectable in neighboring non-infected cells, suggesting an overexpression in HCMV-infected cells. Immunoblot analysis of GABARAPL1 and GATE16 expression confirmed that the proteins accumulated during HCMV infection, whereas their expression is less modified by starvation-induced autophagy (Fig. 5C). Treatment with chloroquine induced a limited increase of GABARAPL1-II in HCMV infected cells until 3 days post-infection, indicating a restricted autophagic flux.

Since ATG4B also participates in the processing of GABARAPs, we tried to determine whether GABARAPL1 and GATE16 present inside the vAC are lipidated or not, by using cells stably expressing ATG4B C74A, which are unable to lipidate any ATG8 homologs²⁷. Cells were infected with HCMV for 4 days and labeled for GM130 and different ATG8 homologs (Fig. 5D). We observed an important accumulation of LC3 in infected cells but this pool of non-lipidated LC3 seems excluded from the vAC, confirming results obtained using LC3 G120A (Fig. 2E). A similar experiment showed that non-lipidated forms of GABARAPL1 and GATE16 were homogeneously present in the cytoplasm of ATG4B C74A expressing cells, whereas they accumulated in the vAC in cells which did not express the dominant negative protein (Fig. 5D). Taken together, our results demonstrate that vesicles associated with different ATG8 homologs are part of the vAC during HCMV infection.

Interestingly, we still observed the formation of vAC in these deficient cells, labeled with GM130 (Fig. 5D), meaning that ATG4B is not necessary for the formation of vAC. Similarly, vAC was present in absence of LC3B or ATG5 (Supplementary Fig. S6). These results suggest that the autophagic process is not involved in the formation of vAC.

Autophagy proteins are present in purified infectious extracellular HCMV. Given the localization of ATG8 homologs in the vAC, we hypothesized that HCMV uses autophagic membranes for the maturation of the viral particle and the acquisition of its final envelope in the vAC. If so, membrane-associated proteins such as ATG8 homologs should be incorporated into purified extracellular viral particles. To test this, we enriched viral material from cell-free supernatants of HCMV-infected human fibroblasts by ultracentrifugation and blotted virus pellets against the tegument protein pp28, autophagic proteins and membranous markers such as GM130 and EEA1. Supernatants from infected cells contain two classes of enveloped particles, HCMV virions and larger structures corresponding to non-infectious capsidless dense bodies²⁸. As a negative control, we used supernatants from mock-infected cells enriched under the same conditions. We detected high levels of pp28 and LC3-II, and slightly detectable levels of LC3-I, associated with viral pellets (Fig. 6A). We also observed the presence of two forms of GABARAPL1 and one weak band of GATE 16 that we supposed to be the lipidated form. We looked for other proteins of the autophagic machinery and found that ATG5, BECN1 and the autophagy receptor p62 were pelleted with HCMV particles. All these different autophagy proteins were not detected (or at very low levels for LC3-II and GABARAPL1) in the supernatants of mock-infected cells. In order to exclude any association with cellular debris, exosomes and viral dense bodies, HCMV particles were further purified with a tartrate/glycerol gradient purification²⁹ and we confirmed the presence of the same autophagy proteins associated with purified virions, except for GATE16 (Fig. 6A). To show the specificity of the association between autophagic proteins and HCMV particles, we also tested the presence of EEA1 and GM130. They are almost undetectable in both enriched supernatant of infected cells and purified viral fractions and only a small amount of Golgi marker was detected in the purified fraction, as previously described⁸. Since ATG5 and BECN1 are enriched with purified virions, we wanted to know whether they accumulated during HCMV infection. We found that their expression was modestly increased in HCMV infected cells (Fig. 6B). Since we had previously published that p62 accumulated during HCMV infection as a consequence of the autophagic flux inhibition¹⁰, we performed an immunostaining and observed a relocation of p62 during HCMV infection, mainly at the periphery of the vAC (Fig. 6C).

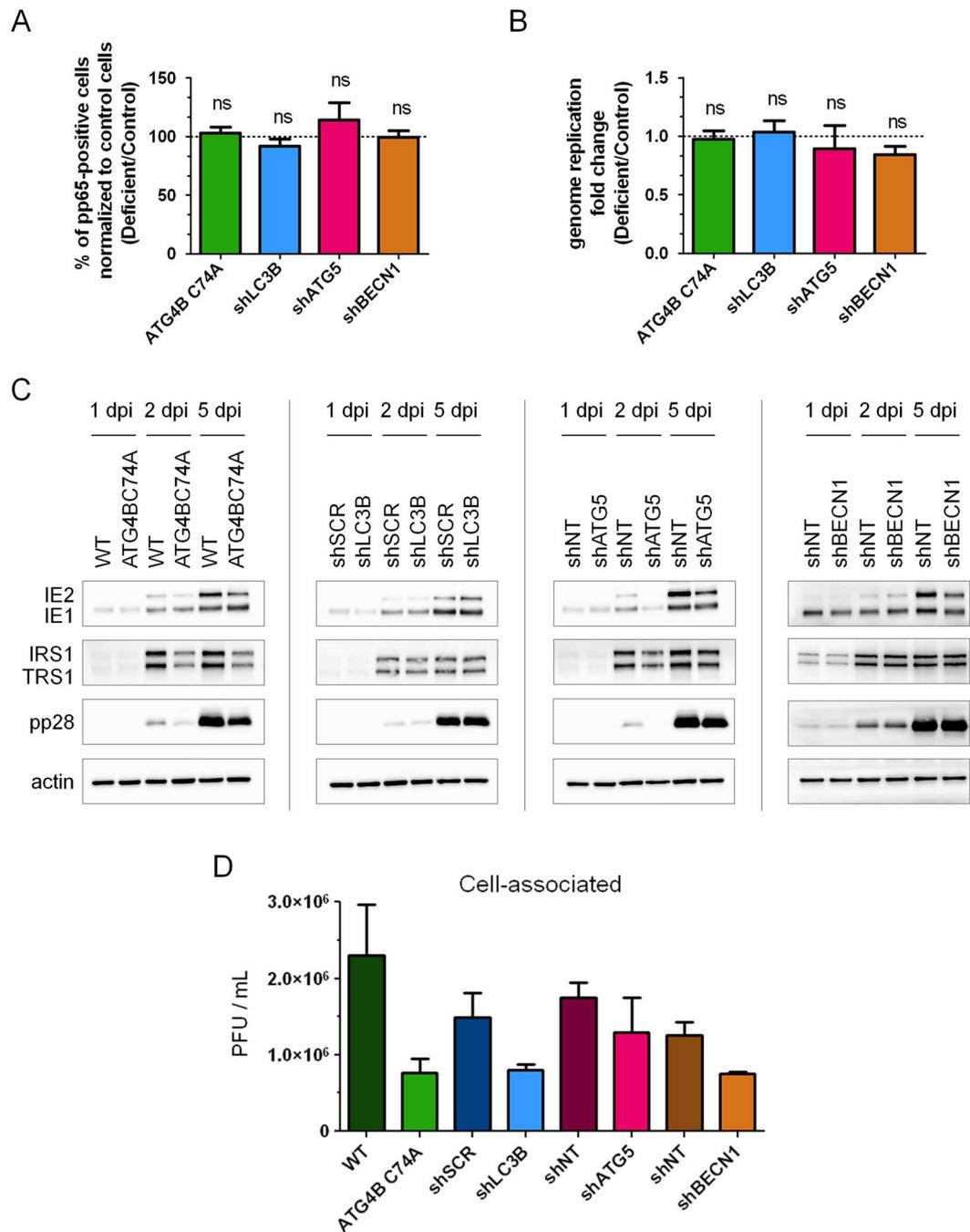


Figure 4. Roles of the autophagy machinery in different steps of the viral cycle. (A) Quantification of HCMV entry by immunofluorescence detection of the viral tegument protein pp65 2 h after contact with the virus (MOI 1). DAPI was used to stain nuclei. Percentages of pp65-positive cells correspond to viral entry into the indicated cell lines compared to control cells (deficient: Autophagy-deficient). (B) Quantification of HCMV genome replication 4 dpi at MOI 0.5 by real time PCR in the indicated cell lines, compared to control cells. (C) Expression of several viral proteins after HCMV infection of control and autophagy-deficient cell lines at MOI 0.5 for 1, 2 or 5 days post infection (dpi). Actin was used as a loading control. Full-length blots are presented in Fig. S7. (D) Indicated control and deficient cells were infected at MOI 0.5 with HCMV AD169 strain. Cell-associated viruses were collected 4 dpi and the amount of infectious virus was measured. Results represent the mean values of 3 independent experiments. ns: non-significant (Student's t test).

Thus, our results suggest that ATG proteins are incorporated in the viral particle during its cytoplasmic envelopment inside the vAC. To go further, we used transmission electron microscopy (TEM) to visualize ultra-structure of the vAC and cytoplasmic HCMV envelopment (Fig. 7A). As expected from our immunofluorescence studies, we observed numerous double membrane vesicles that we considered as autophagosomes in the vAC. We also noted that these autophagosomes were smaller than expected (average diameter: 200 nm) and

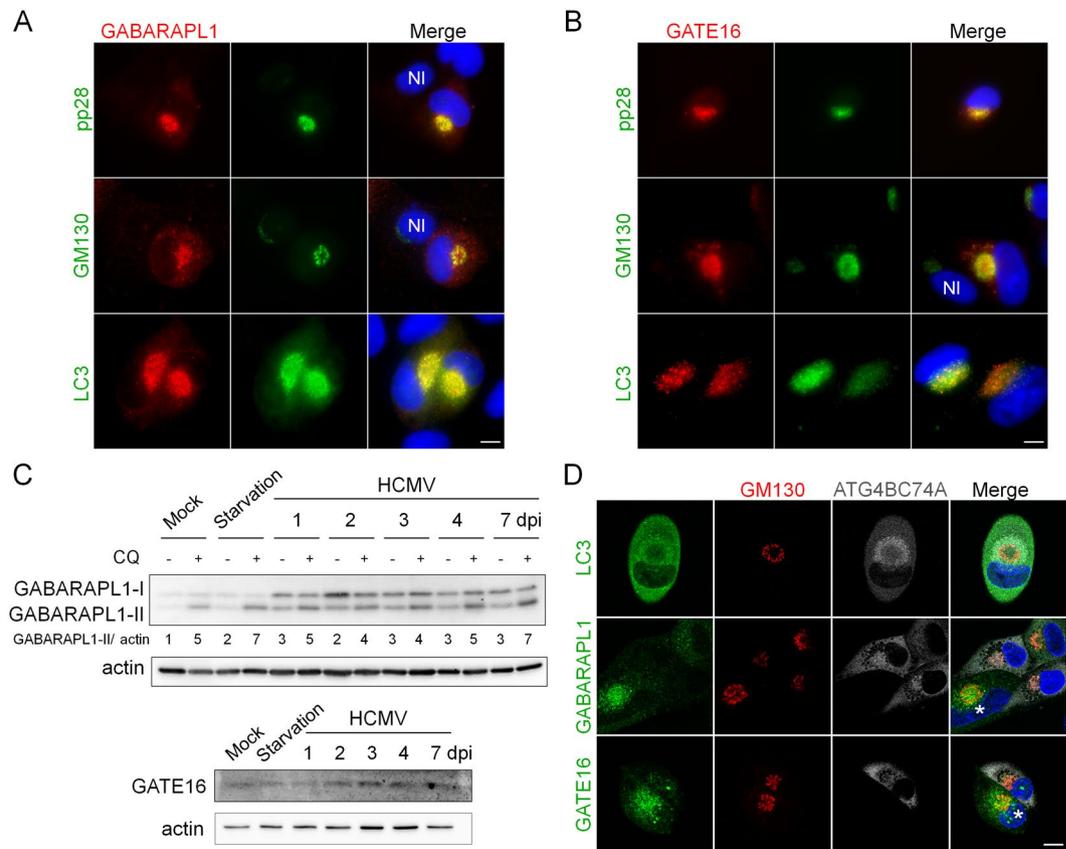


Figure 5. ATG8 homologs accumulate in the vAC in their lipidated form. (A,B) Representative images of HFF cells infected with HCMV AD169 strain at MOI 0.5 for 4 days and immunostained for (A) GABARAPL1, and pp28 (viral tegument protein), GM130 or LC3; (B) GATE16 and pp28, GM130 or LC3 (NI: non-infected cells) (C) Immunoblot analysis of GABARAPL1 and GATE16 expression in HCMV-infected cells at the indicated times after infection. Autophagic flux was measured by addition of chloroquine (CQ) 4 h before lysis. Actin was used as a loading control. Full-length blots are presented in Fig. S7 (D) Confocal images of autophagy-deficient cells stably expressing ATG4B C74A infected with HCMV at MOI 0.5 for 4 days and immunostained for GM130 (Golgi) with LC3 or GABARAPL1 or GATE16. (*) non-transduced cells. Nuclei were subsequently stained with DAPI. Scale bars = 10 μ m.

morphologically close to vesicles containing viral particles or dense bodies. We also confirmed the absence of degradative autophagic vacuoles in infected cells, as we had previously described¹⁰. In the same area of the cytoplasm, several events of capsid envelopment in a crescent-shaped double membrane (insert b) were observed. Taken together, our results suggest a role of the autophagic machinery in the acquisition of the final envelope of HCMV.

Discussion

In this study, the establishment of different autophagy-deficient human cell lines allowed us to confirm that autophagy exerts a proviral effect on HCMV multiplication. We had previously reported, but mainly by pharmacological approaches and by inducible invalidation of ATG16L1 gene, that inhibition of autophagy negatively impacts HCMV production¹¹. It was important now to extend this study by extinction of other autophagy proteins in order to differentiate the effect of the whole autophagic process from the effect of one specific autophagy protein. Whereas ATG4B, ATG5 and ATG16L1 have a role on lipidation of LC3 and its homologs, BECN1 intervenes in two complexes regulating initiation and maturation of autophagosomes. However, it is clear that the functions of each ATG protein are not solely related to autophagy *per se*. Several ATG proteins essential for the autophagy process are also necessary for other membrane-related functions¹⁸. For example, UVRAG, although well known to activate autophagy, promotes entry of Vesicular stomatitis Virus (VSV) and influenza A Virus (IAV) independently of autophagy, through multiple interactions with the membrane fusion cellular machinery³⁰. Similarly, it has been recently reported that ULK1 also regulates ER to Golgi trafficking and the assembly of ER exit sites³¹. The impact on HCMV multiplication was similar in all the autophagy-deficient cell lines tested and we thus concluded that most of the core autophagic machinery seems beneficial for HCMV. As we observed a decrease in LC3-II in all the deficient cell lines, we cannot exclude that the proviral role is mainly related to LC3. This effect was not limited to the HCMV laboratory adapted AD169 strain since similar results were obtained with the clinical-like TB40/E strain. Now, it will be important to pursue this study by blocking autophagosome

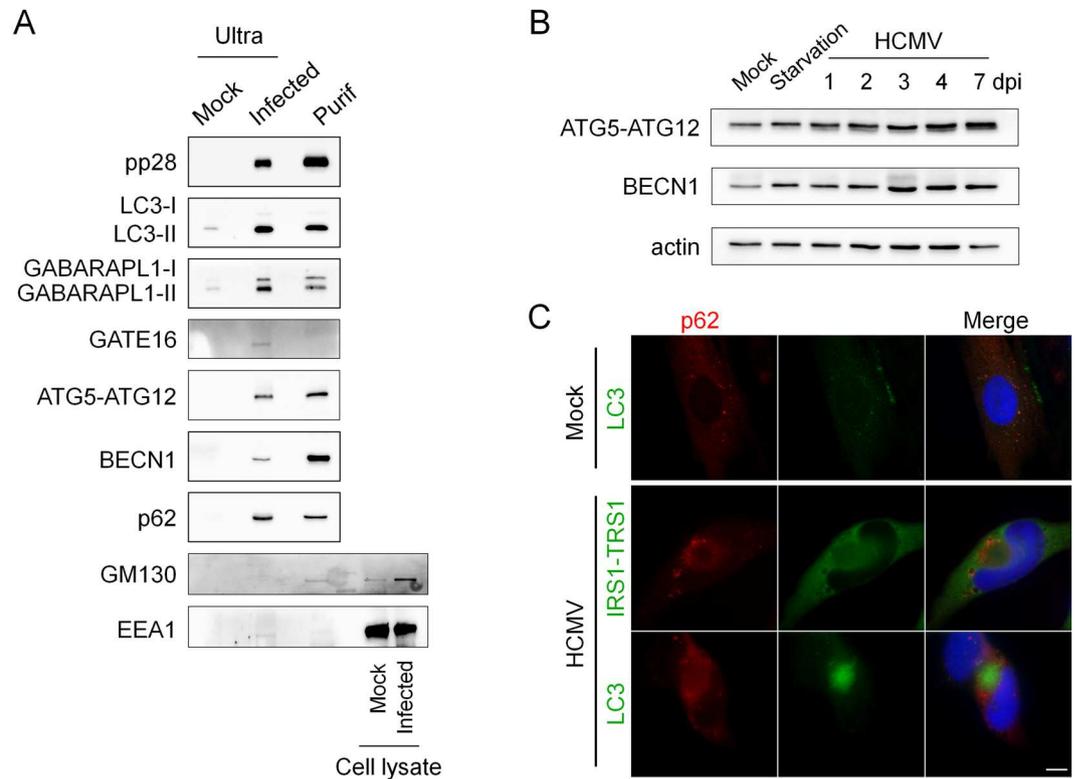


Figure 6. Autophagic proteins accumulate during infection and are present in extracellular viral particles. **(A)** Immunoblot analysis of cellular proteins contained in purified extracellular viral particles. Ultra (ultracentrifuged supernatant); Purif (purified virus by tartrate/glycerol gradient centrifugation). Supernatant of mock-infected cells was ultracentrifuged and used as a negative control and cell lysate are used as a positive control. **(B)** Immunoblot analysis of ATG5 and BECN1 expression in HCMV-infected cells at the indicated times after infection. Actin was used as a loading control. Full-length blots are presented in Fig. S7. **(C)** Representative images of HFF cells infected with HCMV AD169 strain at MOI 0.5 for 4 days and immunostained for p62 and IRS1/TRS1 (viral proteins) or LC3. Nuclei were subsequently stained with DAPI. Scale bars = 10 μ m.

maturation and fusion with lysosomes by using invalidation of protein expression or genes specifically required for this step. The machinery involved in this process is based on three sets of protein families: Rab GTPases, membrane-tethering complexes such as HOPS (homotypic fusion and protein sorting), and SNAREs (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors)³².

In order to investigate the precise role of autophagy on HCMV multiplication, we focused on cytoplasmic viral assembly in this study, because autophagy has no significant role on HCMV viral entry, genome replication, viral protein expression and viral release. In the case of HCMV infection, the formation of vAC, which ensures the final cytoplasmic steps of the particle assembly, was described by numerous groups^{2,4,6,33–35}. We confirmed the organization of vAC in concentric rings by confocal analysis and multiple co-immunostaining of cellular and viral components, as previously observed⁷ (Fig. 7B). Early endosomes were mainly located in the center of the vAC, whereas late endosomes/lysosomes (LAMP1+) were present more homogeneously inside the vAC, together with the viral tegument protein pp28. Short Golgi stacks, formed by HCMV-induced fragmentation of the Golgi apparatus, were organized in a ring-shaped structure, as previously described³⁵. Moreover, we described for the first time that LC3 and two GABARAP homologs (GABARAPL1 and GATE16) were present in the vAC, mainly at the outer edge, during HCMV infection. Antibodies used against LC3 in our confocal analyses recognize the three homologs of LC3, (LC3 A, B and C) and prevented us from concluding for a specific recruitment of one of them. However, we demonstrated that LC3 puncta within the vAC were LC3-II positive vesicles by different approaches. Indeed, the main form of LC3 present in the vAC is lipidated and associated with membranes. We also confirmed that the other ATG8 homologs accumulated in the assembly compartment in their lipidated form. Colocalization of LC3 with GABARAPL1 and GATE16 (Fig. 5A,B) and partial colocalization with LAMP1 suggest that the LC3/GABARAP+ vesicles observed in the vAC could be phagophores, autophagosomes or amphisomes. Moreover, using transmission electron microscopy, we observed numerous double membrane vesicles in close proximity to enveloped viruses. The autophagic receptor p62 also accumulated during the course of infection and was recruited mainly in the periphery of the vAC and to a less extent in the vAC. We visualized vAC in different HCMV-infected autophagy-deficient cells, suggesting that autophagy is not required to initiate the formation of the vAC. Moreover, a structure we named PrAC, containing LC3 positive vesicles and fragmented Golgi stacks was observed as early as 10 hours pi and seemed to precede the formation of the vAC *per se*. Identification of the viral proteins involved in the PrAC formation are now necessary. They are probably early rather than late proteins.

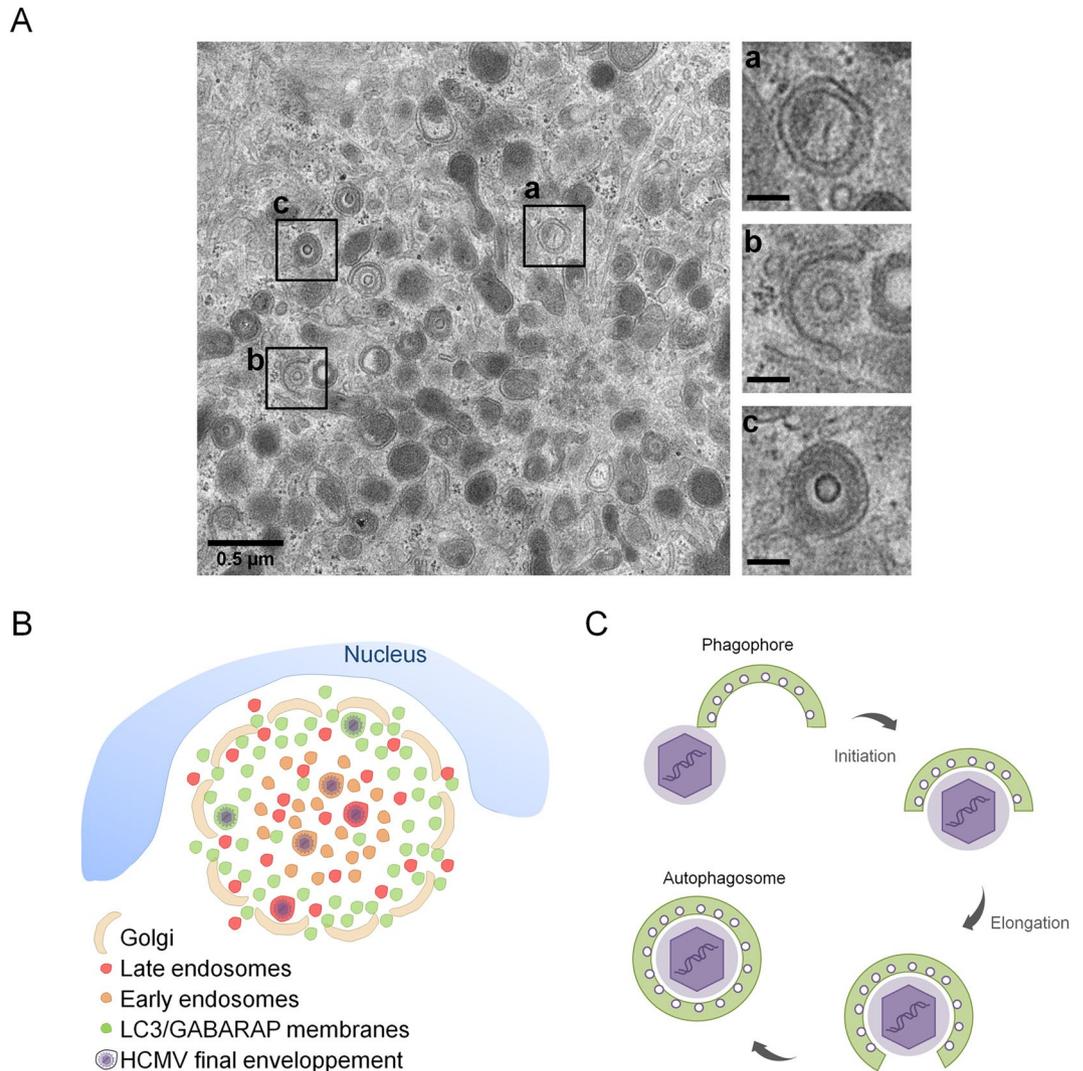


Figure 7. HCMV uses autophagic membranes for its assembly. **(A)** Transmission electron micrographs of HFF infected by HCMV at MOI 0.5 during four days. Inserts showed a) autophagosome, b) tegumented nucleocapsid envelopment c) enveloped virus in a vesicle. Insert scale bars = 0.1 μm . **(B,C)** Model based on our data and prior confocal and ultrastructural analyses. **(B)** Schematic representation of vAC structure and localization of LC3/GABARAP-positive vesicles in vAC with respect to cellular and viral components. HCMV could use membranes from different compartments and in particular autophagic vesicles for its final envelopment. **(C)** Schematic representation of HCMV envelopment. (1) The viral budding process involves a small double membrane crescent-shape structure which contains viral glycoproteins; (2) this double membrane elongates and fuses around the tegumented nucleocapsid to give rise to (3) an enveloped viral particle within a single-membrane vesicle. This process shares common points with phagophore and autophagosome formation.

HCMV uses cytoplasmic membranes to acquire its final envelope but the precise origin of these membranes is still controversial³⁶ and according to Schaeflinger *et al.*, different types of membranes could be used to form its envelope⁵. This is in accordance with our data, which showed that in autophagy-deficient cells, viral production was clearly decreased, but less than 10 times. We think that autophagic membranes, although non-essential, could contribute to HCMV envelopment. Interestingly, our electron micrographs of HCMV-infected cells showed accumulation of autophagosomes and HCMV nucleocapsids budding into crescent-shaped double-membrane vacuoles which look like phagophores. Presence of autophagosomes in HCMV-infected cells had been previously reported by us and, in fact, as early as 1978 by Smith and de Harven^{9,37}. Nucleocapsids being wrapped into cytoplasmic vesicles closely resemble images of autophagosome formation, from the elongation and curvature of the phagophore to the closure of the double membrane vacuole⁵ (Fig. 7A,C). Based on that, we purified extracellular viral particles by two different ways, and analyzed their content for ATG proteins. As anticipated in our model, we found LC3 homologs associated with purified virions but also more surprisingly p62, BECN1 and ATG5-ATG12. To exclude cellular debris, we further purified the virions on a tartrate/glycerol gradient, and we confirmed the association of ATG proteins with viral particles. Moreover, we mainly observed lipidated forms of LC3B and GABARAPL1 in virions and high levels of BECN1. We had previously observed that BECN1 is able to interact

with TRS1 and IRS1¹¹, which are viral proteins included in the tegument inside the viral particle. Therefore, BECN1 could be present in the tegument of the virions. The presence of p62 with purified HCMV particles could be related to its function as an autophagy receptor, since it allows recruitment of cargos into autophagosomes by interacting with ATG8 homologs. Interestingly, binding of viral components with p62 has already been reported for two viruses, Sindbis and Chikungunya, but in both cases this interaction leads to virophagy, a selective degradation of the viral proteins^{38,39}. The role of p62 in the context of HCMV infection needs to be further investigated. More generally, we observed accumulation of several autophagy proteins during infection, and it would be interesting to investigate their mRNA levels. Finally, we tested the presence of the early endosomal marker EEA1 and the Golgi marker GM130 in the same conditions and observed no detectable level of EEA1 and a slight band for GM130 in purified HCMV virions. These results confirmed previous data from Cepeda *et al.*, suggesting that EEA1 may not be incorporated into virions or at least that protein levels are under the detection threshold⁸. It will be interesting to investigate by super resolution microscopy and by immuno-electron microscopy where BECN1, p62, ATG5, LC3 and GABARAPs are located with respect to each other in the viral particle.

Our results are comparable with data obtained with two other human Herpesviruses, EBV and VZV, which modulate autophagy²¹. Interestingly, Nowag *et al.* showed that LC3 is associated with highly purified EBV virions⁴⁰ and another recent study showed the co-purification of LC3 and Rab11 with extracellular VZV particles⁴¹. It would be interesting to seek whether other ATG proteins are associated with EBV and VZV virions, in particular LC3 homologs and BECN1. In fact, the use of autophagy proteins could be a general feature of Herpesviruses to optimize their cytoplasmic envelopment. Although both EBV and VZV use autophagy for their own profit, EBV blocks the autophagic flux^{40,42} like HCMV, whereas VZV induces a complete functional autophagy process but somehow manages to escape autophagic degradation⁴³. For VZV, the authors proposed a model where autophagy plays a role in exocytosis because enveloped viral particles were found in single membrane vesicles decorated with amphisome markers⁴¹. However, it cannot be excluded that the virus acquires its envelope thanks to autophagic membranes since envelopment from a phagophore structure would also lead to viral particles in single membrane vacuoles (Fig. 7B). Regarding HCMV, another additional role of ATG proteins association with viral particles could be related to an improvement of its infectivity or its stability. It has been reported that the stability of influenza A extracellular viral particles is promoted by virus-induced redistribution of LC3 at the plasma membrane during infection⁴⁴.

In conclusion, our study contributes to a better characterization of the HCMV assembly compartment. We identified novel cellular partners proposing a new function of autophagy and LC3 homologs in HCMV envelopment and thus viral replication.

Methods

Cells and viruses. Human foreskin fibroblasts (HFF), provided by Thomas Shenk (Princeton University, Princeton, USA), were maintained in Dulbecco minimum essential medium (DMEM) (Gibco, 41965–039) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Primary human embryonic lung fibroblasts MRC5 were purchased from Biomerieux and used between passages 23 and 28 post-isolation. These cells were maintained in MEM (Gibco, 21090-055) supplemented with 10% FCS, penicillin G (100 U/ml), streptomycin sulfate (100 µg/ml), l-glutamine (1%), and nonessential amino acids (1%). Cells were cultured at 37 °C under 5% CO₂. AD169 strain of HCMV was obtained from ATCC and was propagated in MRC5 cells as previously described⁴⁵. TB40/E strain of HCMV was provided by Christian Sinzger (Institute for Virology, Ulm University Medical Center, Germany) and was propagated in HUVEC cells followed by amplification in MRC5 cells⁴⁶. Starvation-induced autophagy was carried out by culturing the cells in Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) (Gibco, 24010-045) for 4 h before fixation and autophagic flux was monitored by addition of chloroquine (Sigma, C6628) 4 h before cell lysis. Previously described lentiviruses bearing p41-LC3 or p41-LC3 G120A were used to transduce HFF²².

Autophagy-deficient HFFs. Stable HFF cell lines deficient in autophagy were established using lentiviral transduction. Lentiviruses bearing *trans*-dominant negative ATG4B (ATG4B C74A) fused to the fluorescent protein Strawberry, LC3B, and scrambled shRNA had been previously described²². ATG5, BECN1, ULK1 and non-target shRNA were purchased from Sigma (MISSION pLKO.1-puro shRNA lentiviruses). After transduction, ATG4B C74A HFF were sorted by flow cytometry (FACSariaII, IPSIT, Antoine-Béclère hospital, France), while shLC3B, shSCR, shATG5, shBECN1, shULK1 and shNT-expressing HFF were selected by addition of puromycin in culture media (5 µg/ml; InvivoGen). Due to the different lentiviral vectors used, cells stably expressing the shRNA targeting ATG5 (shATG5), BECN1 (shBECN1) and ULK1 (shULK1) were compared to control cells expressing a non-target shRNA (shNT), whereas we used cells expressing a scrambled shRNA (shSCR) as a negative control to compare with cells invalidated for LC3B expression (shLC3B) cells. HFF overexpressing ATG4B-C74A (ATG4B C74A) were compared to wild type (WT) cells, because it had been described earlier that overexpression of WT ATG4B also inhibits autophagy²³.

To study cell proliferation, cells were detached 4 days after seeding by trypsinization and enumerated by trypan blue exclusion and counting with a hemocytometer. Viability of cells infected with HCMV AD169 strain at MOI 0.01 during 4 days was assessed by MTT assay using 0.3 mg/mL thiazolyl blue tetrazolium bromide (Sigma, M5655). Absorbance was measured using the infinite f50 microplate reader (Tecan) at 550 nm with a reference wavelength at 630 nm. Each treatment was performed in triplicate.

Antibodies. To detect HCMV-infected cells, we used mouse monoclonal antibodies directed against the viral proteins IE1 and IE2 (clone E13; Biomerieux, 11–003), tegument proteins pp65 (Novus, B051M) and pp28 (Santa Cruz, clone CH19, sc-69749). We also used a rabbit polyclonal antibody directed against the viral proteins IRS1 and TRS1 provided by Adam Geballe⁴⁷. Additional primary antibodies used in this study included anti-SQSTM1 (p62) (Abnova clone 2C11, H00008878-M01), anti-BECN1 (BD bioscience, 612112), anti-β-actin

(Merck Millipore MAB1501 clone C4), anti-LC3 (MBL-PM036 and MBL-M152-3B), anti-LC3B (Sigma L7543, used for immunoblot analysis), anti-ULK1 (Santa Cruz, H-240 sc-33182), anti-GM130 (BD transduction, 610822), anti-GABARAPL2/Gate16 (R&D, 853746), anti-GABARAPL2/Gate16 (ProteinTech, 18724-1-AP), anti-GABARAPL1 (Cell-signaling, D5R9Y), anti-LAMP1 (Cell-signaling, D2D11), anti-EEA1 (Cell-signaling, C45B10), anti-ATG5 (sigma, A0731), anti-Gag/p41 (Abcam, ab63917) and DAPI (Invitrogen, D1306). Secondary antibodies used in this study included Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit, anti-mouse and anti-rat (Life technology, A21428 – A21424 – A21434), Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit and anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, 111-545-003 and 115-545-003), Alexa Fluor 647 donkey anti-rabbit and anti-mouse (Life technology, A31573 and A31571). Horseradish peroxidase (HRP)-labeled goat anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (115-035-003, 111-035-003).

HCMV infection and titration. HCMV suspended in serum-free DMEM, or serum-free DMEM alone (mock-infected) was adsorbed onto cells for 1 h at 37 °C at various MOI. After the inoculum was removed, the cells were maintained in DMEM containing 10% FCS and processed for the different assays at various times pi. For growth analysis, viruses were adsorbed onto cells for 2 h at 37 °C and after removal of inoculum, extracellular virus particles were inactivated using citrate buffer (40 mM citric acid, 10 mM KCl, 135 mM NaCl, pH = 3). At the indicated times, viruses were collected from cell-free supernatant fractions or infected cells and quantified as previously described⁴⁸. The cell-associated virus was isolated through 3 rounds of freezing and thawing.

HCMV purification. Purification of HCMV AD169 virions on glycerol-tartrate gradient was performed as described before¹⁰. Briefly, after ultracentrifugation of supernatants from infected MRC5 cells, virion-containing pellets were resuspended in 0.5 ml of MEM and transferred onto a preformed linear glycerol-tartrate gradient (15 to 35% Na-tartrate and 30 to 0% glycerol in 0.04% Na-phosphate). Virion fractions were harvested using syringes and needles after ultracentrifugation of the gradient. Subsequently, virions were washed and pelleted by an additional ultracentrifugation. Pellets obtained either after the first ultracentrifugation or after the whole purification process were resuspended in lysis buffer for western-blot analysis.

Real-time PCR. To determine viral DNA levels in infected cells, cells were harvested and lysed in the presence of proteinase K and total DNA was purified using the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, 69506) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed using Taqman probes and primers specific for the UL123 viral gene and CXCR4 cellular gene as previously described⁴⁹. PCR data were analyzed using CFX manager software.

Immunoblot analysis. HFF cells were lysed in 65 mM Tris, pH 6.8, 4% SDS, 1.5% β -mercaptoethanol and held at 100 °C for 10 min. Protein extracts were resolved on SDS-PAGE gels (8% for TRS1 and IRS1, 12.5% for others) and electrotransferred onto a polyvinylidene fluoride membrane (Amersham). Membranes were incubated in blocking buffer and then probed with primary antibodies overnight. HRP-labeled antibodies were used as a secondary antibody, revealed using the ECL detection system under conditions recommended by the manufacturer (Immobilon, Millipore) and anti-actin was used to ensure equal loadings. Quantification of protein levels was performed using ImageJ software.

Immunofluorescence analysis. Cell monolayers were washed with phosphate buffered saline (PBS) and cells were either fixed with 4% paraformaldehyde in PBS or methanol and were permeabilized using 0.2% Triton X-100 in PBS. When specified, cells were first permeabilized using buffer (0.1% Triton, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 mM Hepes) in order to deplete soluble proteins from the cytosol, and subsequently fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. Cells were then incubated for 1 h in PBS, gelatin 0.2% supplemented with 5% of goat serum for blocking, and then with appropriate primary antibodies. The cells were washed 3 times in PBS Tween20 0.1%, and then incubated with appropriate secondary antibodies. When using rabbit polyclonal antibodies, ChromPure human IgG Fc fragment (Jackson ImmunoResearch) was added in blocking buffer, as well as with primary and secondary antibody incubations, in order to limit cross-reaction with Fc receptor-like HCMV proteins³⁵. Coverslips were mounted in Glycergel (Dako, C0563) and examined using a Zeiss Axiovert 200 M epifluorescence microscope (Zeiss instruments) or a Leica TCS SP8 confocal microscope (IPSiT, cellular imaging, Châtenay-Malabry, France). Photographic images were resized, organized, and labeled using ImageJ software or LAS AF Lite.

Electron microscopy. Cell monolayers were fixed for 30 min at 37 °C in 1% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, washed, and fixed again in aqueous 1% osmium tetroxide and 1.5% potassium ferrocyanide, then progressively dehydrated in ethanol, and embedded in Epon. Ultrathin sections were cut using ultramicrotome LEICA UC6 from IMAGIF facility and processed for electron microscopy. Samples were imaged using a JEOL1400 transmission electron microscope at 80 kV and camera Orius SC1000. Micrographs were resized, organized, and labeled using ImageJ software.

Statistics. Data are expressed as means \pm standard error of the means (SEM) and were analyzed with Prism software (GraphPad) by using Student's t test or one way analysis of variance (ANOVA) test comparisons. P values less than 0.05 were considered statistically significant. Experiments were performed a minimum of three times.

Data Availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

References

- Mocarski, E. S., Shenk, T., Griffiths, P. & Pass, R. F. In *Fields Virology, 6th ed.* Vol. vol2 (eds Knipe, D. M. & Howley, P. M.) (Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, 2013).
- Procter, D. J. *et al.* The HCMV Assembly Compartment Is a Dynamic Golgi-Derived MTOC that Controls Nuclear Rotation and Virus Spread. *Developmental cell* **45**, 83–100 e107, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.03.010> (2018).
- Sanchez, V., Sztul, E. & Britt, W. J. Human cytomegalovirus pp28 (UL99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment. *Journal of virology* **74**, 3842–3851 (2000).
- Alwine, J. C. The human cytomegalovirus assembly compartment: a masterpiece of viral manipulation of cellular processes that facilitates assembly and egress. *PLoS pathogens* **8**, e1002878, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002878> (2012).
- Schaufinger, M., Villinger, C., Mertens, T., Walther, P. & von Einem, J. Analysis of human cytomegalovirus secondary envelopment by advanced electron microscopy. *Cellular microbiology* **15**, 305–314, <https://doi.org/10.1111/cmi.12077> (2013).
- Das, S. & Pellett, P. E. Spatial relationships between markers for secretory and endosomal machinery in human cytomegalovirus-infected cells versus those in uninfected cells. *Journal of virology* **85**, 5864–5879, <https://doi.org/10.1128/JVI.00155-11> (2011).
- Das, S., Vasanji, A. & Pellett, P. E. Three-dimensional structure of the human cytomegalovirus cytoplasmic virion assembly complex includes a reoriented secretory apparatus. *Journal of virology* **81**, 11861–11869, <https://doi.org/10.1128/JVI.01077-07> (2007).
- Cepeda, V., Esteban, M. & Fraile-Ramos, A. Human cytomegalovirus final envelopment on membranes containing both trans-Golgi network and endosomal markers. *Cellular microbiology* **12**, 386–404, <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01405.x> (2010).
- Chaumorcet, M., Souquere, S., Pierron, G., Codogno, P. & Esclatine, A. Human cytomegalovirus controls a new autophagy-dependent cellular antiviral defense mechanism. *Autophagy* **4**, 46–53 (2008).
- Chaumorcet, M. *et al.* The human cytomegalovirus protein TRS1 inhibits autophagy via its interaction with Beclin 1. *Journal of virology* **86**, 2571–2584, <https://doi.org/10.1128/JVI.05746-11> (2012).
- Mouna, L. *et al.* Analysis of the role of autophagy inhibition by two complementary human cytomegalovirus BECN1/Beclin 1-binding proteins. *Autophagy* **12**, 327–342, <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1125071> (2016).
- Molino, D., Zemirli, N., Codogno, P. & Morel, E. The Journey of the Autophagosome through Mammalian Cell Organelles and Membranes. *Journal of molecular biology* **429**, 497–514, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.12.013> (2017).
- Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I. & Codogno, P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell research* **20**, 748–762, <https://doi.org/10.1038/cr.2010.82> (2010).
- Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**, 1–222, <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356> (2016).
- Maruyama, T. & Noda, N. N. Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition. *The Journal of antibiotics*. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.104> (2017).
- Matsunaga, K. *et al.* Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nature cell biology* **11**, 385–396, <https://doi.org/10.1038/ncb1846> (2009).
- Papinski, D. & Kraft, C. Regulation of Autophagy By Signaling Through the Atg1/ULK1 Complex. *Journal of molecular biology* **428**, 1725–1741, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.03.030> (2016).
- Cadwell, K. & Debnath, J. Beyond self-eating: The control of nonautophagic functions and signaling pathways by autophagy-related proteins. *The Journal of cell biology* **217**, 813–822, <https://doi.org/10.1083/jcb.201706157> (2018).
- Florey, O. & Overholzer, M. Autophagy proteins in macroendocytic engulfment. *Trends in cell biology* **22**, 374–380, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.04.005> (2012).
- McFarlane, S. *et al.* Early induction of autophagy in human fibroblasts after infection with human cytomegalovirus or herpes simplex virus 1. *Journal of virology* **85**, 4212–4221, <https://doi.org/10.1128/JVI.02435-10> (2011).
- Lussignol, M. & Esclatine, A. Herpesvirus and Autophagy: “All Right, Everybody Be Cool, This Is a Robbery!”. *Viruses* **9**, <https://doi.org/10.3390/v9120372> (2017).
- Coulon, P. G. *et al.* HIV-Infected Dendritic Cells Present Endogenous MHC Class II-Restricted Antigens to HIV-Specific CD4+ T Cells. *Journal of immunology* **197**, 517–532, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600286> (2016).
- Fujita, N. *et al.* An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogs and causes defects in autophagosome closure. *Molecular biology of the cell* **19**, 4651–4659, <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-03-0312> (2008).
- Sinzger, C. *et al.* Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E. *The Journal of general virology* **89**, 359–368, <https://doi.org/10.1099/vir.0.83286-0> (2008).
- Bodaghi, B. *et al.* Entry of human cytomegalovirus into retinal pigment epithelial and endothelial cells by endocytosis. *Investigative ophthalmology & visual science* **40**, 2598–2607 (1999).
- Martens, S. N. A. T. G. 8s no problem? How LC3/GABARAP proteins contribute to autophagy. *The Journal of cell biology* **215**, 761–763, <https://doi.org/10.1083/jcb.201611116> (2016).
- Tanida, I. *et al.* HsAtg4B/HsAtg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *The Journal of biological chemistry* **279**, 36268–36276, <https://doi.org/10.1074/jbc.M401461200> (2004).
- Tandon, R. & Mocarski, E. S. Viral and host control of cytomegalovirus maturation. *Trends in microbiology* **20**, 392–401, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.008> (2012).
- Irmiere, A. & Gibson, W. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* **130**, 118–133 (1983).
- Pirooz, S. D. *et al.* UVRA9 is required for virus entry through combinatorial interaction with the class C-Vps complex and SNAREs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 2716–2721, <https://doi.org/10.1073/pnas.1320629111> (2014).
- Joo, J. H. *et al.* The Noncanonical Role of ULK/ATG1 in ER-to-Golgi Trafficking Is Essential for Cellular Homeostasis. *Molecular cell* **62**, 982, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.030> (2016).
- Nakamura, S. & Yoshimori, T. New insights into autophagosome-lysosome fusion. *Journal of cell science* **130**, 1209–1216, <https://doi.org/10.1242/jcs.196352> (2017).
- Britt, B. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunophylaxis* (eds Arvin, A. *et al.*) (2007).
- Jean Beltran, P. M., Mathias, R. A. & Cristea, I. M. A Portrait of the Human Organelle Proteome In Space and Time during Cytomegalovirus Infection. *Cell systems* **3**, 361–373 e366, <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.08.012> (2016).
- Rebmann, G. M., Grabski, R., Sanchez, V. & Britt, W. J. Phosphorylation of Golgi Peripheral Membrane Protein Grasp65 Is an Integral Step in the Formation of the Human Cytomegalovirus Cytoplasmic Assembly Compartment. *mBio* **7**, <https://doi.org/10.1128/mBio.01554-16> (2016).
- Homman-Loudiyi, M., Hultenby, K., Britt, W. & Soderberg-Naucler, C. Envelopment of human cytomegalovirus occurs by budding into Golgi-derived vacuole compartments positive for gB, Rab 3, trans-golgi network 46, and mannosidase II. *Journal of virology* **77**, 3191–3203 (2003).
- Smith, J. D. & de Harven, E. Herpes simplex virus and human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. III. Cytochemical localization of lysosomal enzymes in infected cells. *Journal of virology* **26**, 102–109 (1978).
- Judith, D. *et al.* Species-specific impact of the autophagy machinery on Chikungunya virus infection. *EMBO reports* **14**, 534–544, <https://doi.org/10.1038/embor.2013.51> (2013).

39. Orvedahl, A. *et al.* Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell host & microbe* **7**, 115–127, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.01.007> (2010).
40. Nowag, H. *et al.* Macroautophagy Proteins Assist Epstein Barr Virus Production and Get Incorporated Into the Virus Particles. *EBioMedicine* **1**, 116–125, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2014.11.007> (2014).
41. Buckingham, E. M., Jarosinski, K. W., Jackson, W., Carpenter, J. E. & Grose, C. Exocytosis of varicella-zoster virions involves a convergence of endosomal and autophagy pathways. *Journal of virology*, <https://doi.org/10.1128/JVI.00915-16> (2016).
42. Granato, M. *et al.* Epstein-barr virus blocks the autophagic flux and appropriates the autophagic machinery to enhance viral replication. *Journal of virology* **88**, 12715–12726, <https://doi.org/10.1128/JVI.02199-14> (2014).
43. Buckingham, E. M., Carpenter, J. E., Jackson, W. & Grose, C. Autophagy and the effects of its inhibition on varicella-zoster virus glycoprotein biosynthesis and infectivity. *Journal of virology* **88**, 890–902, <https://doi.org/10.1128/JVI.02646-13> (2014).
44. Beale, R. *et al.* 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, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.006> (2014).
45. Esclatine, A. *et al.* Differentiation-dependent redistribution of heparan sulfate in epithelial intestinal Caco-2 cells leads to basolateral entry of cytomegalovirus. *Virology* **289**, 23–33, <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1122> (2001).
46. Sinzger, C. *et al.* Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation *in vitro* is associated with changes in the viral genome. *The Journal of general virology* **80**(Pt 11), 2867–2877, <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-11-2867> (1999).
47. Marshall, E. E., Bierle, C. J., Brune, W. & Geballe, A. P. Essential role for either TRS1 or IRS1 in human cytomegalovirus replication. *Journal of virology* **83**, 4112–4120, <https://doi.org/10.1128/JVI.02489-08> (2009).
48. Terhune, S. *et al.* Human cytomegalovirus UL38 protein blocks apoptosis. *Journal of virology* **81**, 3109–3123, <https://doi.org/10.1128/JVI.02124-06> (2007).
49. Leruez-Ville, M. *et al.* Monitoring cytomegalovirus infection in adult and pediatric bone marrow transplant recipients by a real-time PCR assay performed with blood plasma. *Journal of clinical microbiology* **41**, 2040–2046 (2003).

Acknowledgements

We wish to thank for their technical assistance Valérie Nicolas and Claudine Deloménie from cellular imaging MIPSIT facility and TransProt facility respectively. We would like to thank for advice and technical assistance Claire Boulogne and Cynthia Gillet, from ImaGif electron microscopy facility. Finally, special thanks to François Saller and Barbara Trimbach for their critical reading of the manuscript. This work was supported by institutional funding from CNRS and from Univ. Paris-Sud, and grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE14-0022) to AE and AM.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: C.T., M.L., A.E. Performed the experiments: C.T., M.L., E.H., L.M. Analyzed the data: C.T., M.L., A.M., A.E. Contributed reagents/materials: A.M. Wrote the paper: C.T., M.L., A.E.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41029-z>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



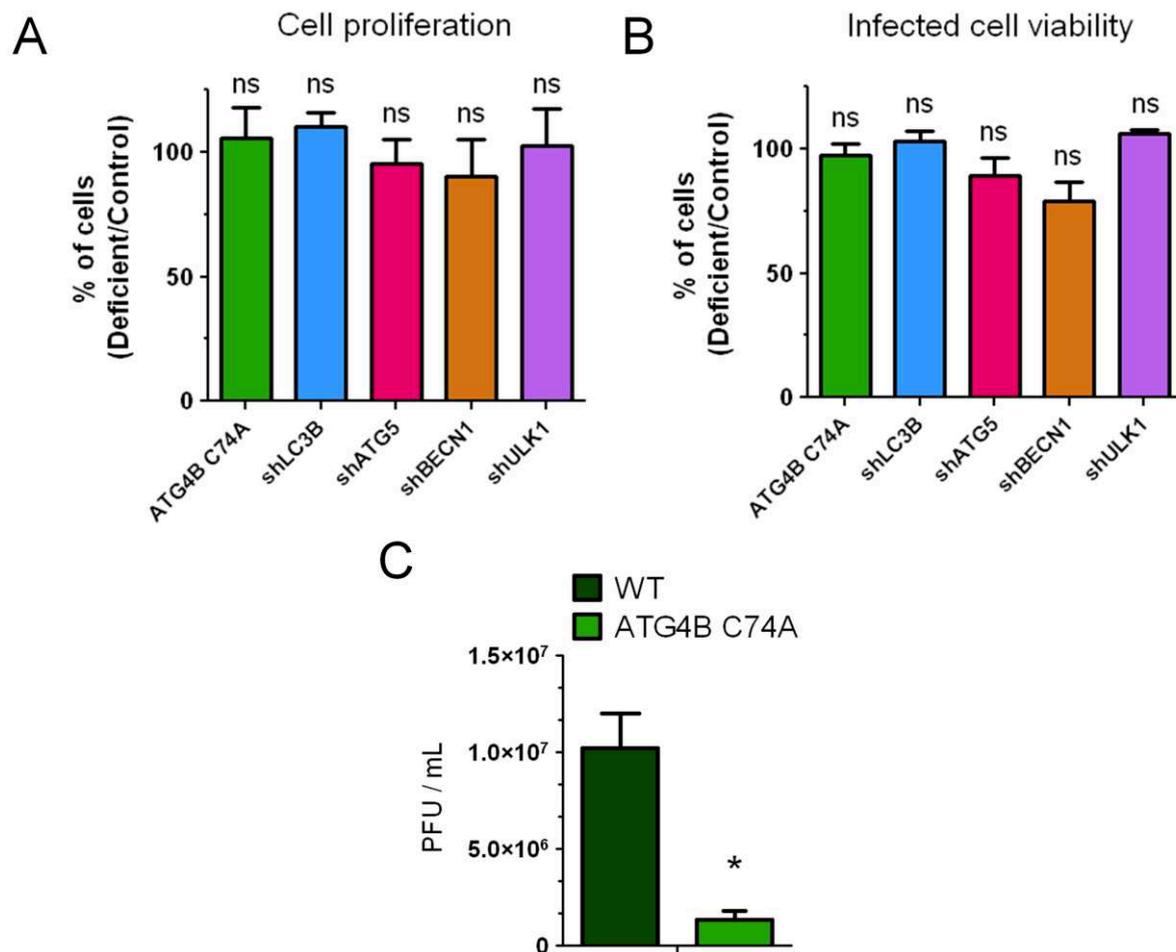
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Supplementary Figure Legends

Human cytomegalovirus hijacks the autophagic machinery and LC3 homologs in order to optimize cytoplasmic envelopment of mature infectious particles

Clémence Taisne, Marion Lussignol, Eva Hernandez, Arnaud Moris, Lina Mouna, and Audrey Esclatine

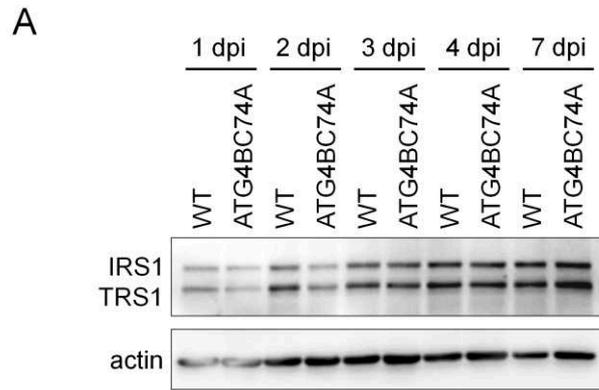


Supplementary Figure S1. Autophagy deficiency does not impact cell proliferation or infected cell viability and autophagy is beneficial for multiplication of TB40/E strain. HFF control cells (WT, shSCR, shNT) and autophagy deficient cells were compared for (A) cell proliferation, using cell enumeration by trypan blue exclusion and (B) cell viability during infection at MOI 0.01 for 4 days using MTT assay. Graphs indicate percentage of autophagy deficient cells compare to control cells. Error bars indicate SEM from three independent experiments. ns non-significant (One-way ANOVA test). (C) Human fibroblasts stably overexpressing a dominant negative of ATG4B or their wild type counterparts were infected with TB40/E strain at MOI 0.1 during 8 days and viral titers were determined in the supernatant. Error bars indicate SEM from three independent experiments. * $p < 0.05$ (Student's t test).

Supplementary figure S2. 3D Imaris reconstruction video of HCMV-infected HFF cells immunostained for LC3 (green) and for pp28 (tegument viral protein located to the AC -red). Nuclei were subsequently stained with DAPI.

Supplementary figure S3. 3D Imaris reconstruction video of HCMV-infected HFF cells immunostained for LC3 (green) and for GM130 (Golgi marker -red). Nuclei were subsequently stained with DAPI.

Supplementary figure S4. 3D Imaris reconstruction video of HCMV-infected HFF cells immunostained for LC3 (green) and for EEA1 (early endosome marker -red). Nuclei were subsequently stained with DAPI.



B

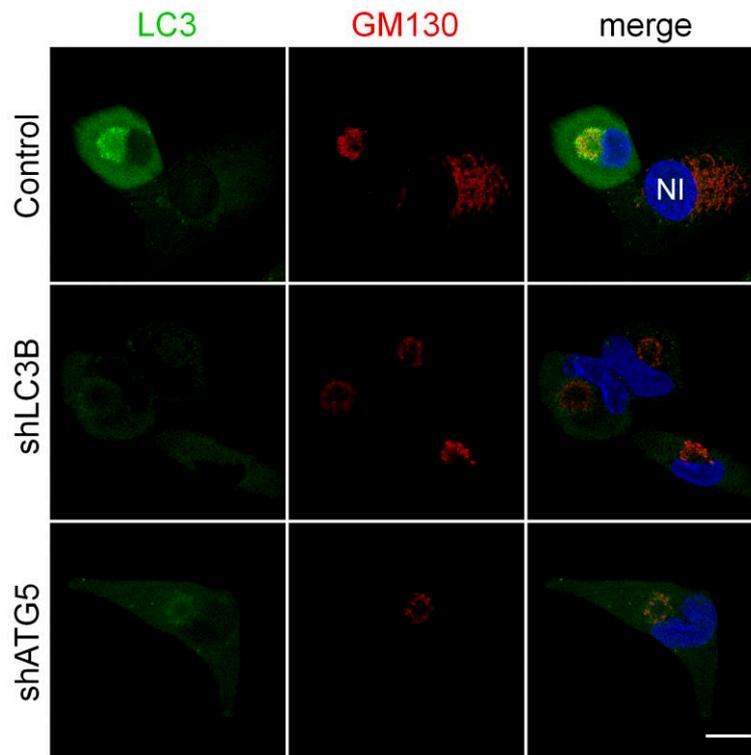
	1 dpi		2 dpi		5 dpi	
	WT	ATG4B C74A	WT	ATG4B C74A	WT	ATG4B C74A
IE2	0.0	0.0	0.2	0.1	0.9	0.6
IE1	0.5	0.4	0.5	0.5	1.8	1.1
IRS1	0.1	0.0	0.7	0.3	1.3	0.9
TRS1	0.1	0.1	0.8	0.3	1.2	0.8
pp28	0.0	0.0	0.2	0.1	1.5	1.0

	1 dpi		2 dpi		5 dpi	
	shSCR	shLC3B	shSCR	shLC3B	shSCR	shLC3B
IE2	0.0	0.0	0.1	0.1	0.7	0.8
IE1	0.5	0.4	0.3	0.4	1.0	0.9
IRS1	0.1	0.1	0.5	0.4	0.9	1.0
TRS1	0.2	0.1	0.6	0.5	0.6	0.9
pp28	0.0	0.0	0.0	0.1	1.2	1.3

	1 dpi		2 dpi		5 dpi	
	shNT	shATG5	shNT	shATG5	shNT	shATG5
IE2	0.0	0.0	0.1	0.1	1.0	0.8
IE1	0.4	0.4	0.5	0.7	0.9	1.1
IRS1	0.1	0.1	1.0	0.8	1.4	1.6
TRS1	0.2	0.1	1.0	0.8	1.3	1.6
pp28	0.0	0.0	0.1	0.0	1.5	1.5

	1 dpi		2 dpi		5 dpi	
	shNT	shBECN1	shNT	shBECN1	shNT	shBECN1
IE2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.4
IE1	1.1	0.6	1.4	1.4	1.3	2.1
IRS1	0.2	0.3	1.4	1.2	1.5	1.8
TRS1	0.3	0.3	1.6	1.2	1.4	1.8
pp28	0.0	0.0	0.2	0.3	4.0	4.0

Supplementary Figure S5. Viral protein expression in autophagy deficient cell lines. (A) Expression of IRS/TRS1 after HCMV infection of ATG4B C74A cells at MOI 0.5 for 1 to 7 days post infection (dpi). Actin was used as a loading control. (B) Quantification of 3 representative western blots of viral protein expression in autophagy deficient cell lines compared to their own control. Actin was used as a loading control.



Supplementary Figure S6. vAC is present in autophagy deficient cells. Confocal images of control HFF or autophagy-deficient cells infected with HCMV AD169 strain at MOI 0.5 for 4 days and immunostained for LC3, GM130 (Golgi), DAPI (Nuclei). Note the low level of LC3 expression and the normal Golgi apparatus in the non-infected cell (NI). Scale bar = 20 μ m.

Figure 1 A

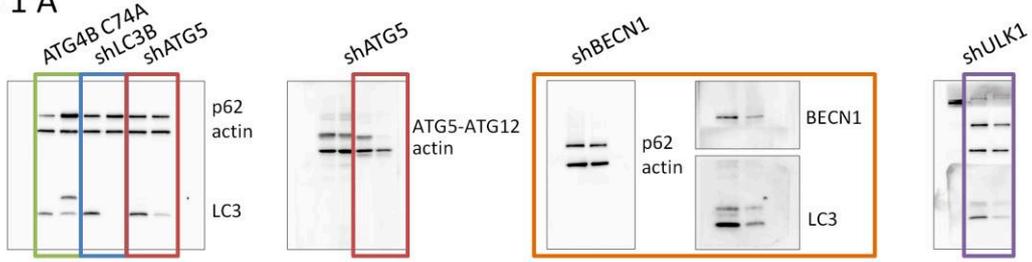


Figure 4 C

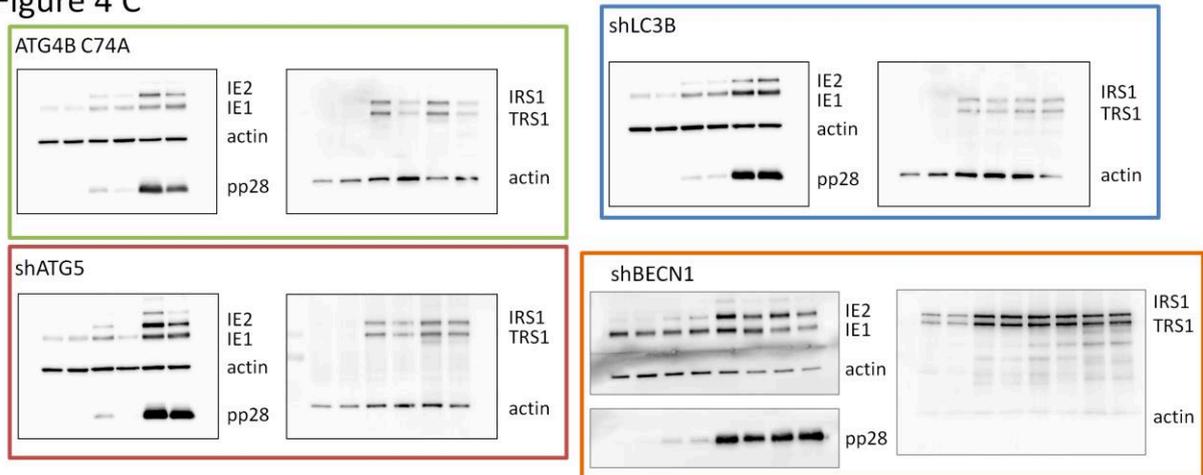


Figure 5C

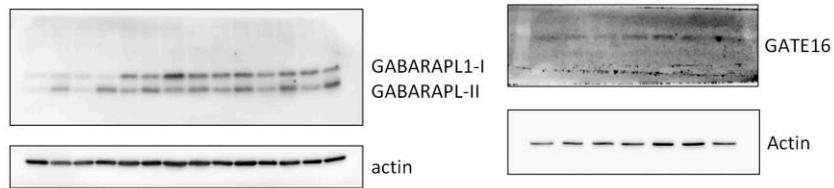


Figure 6A

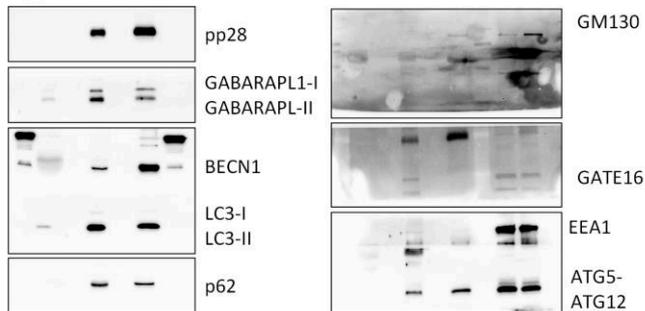
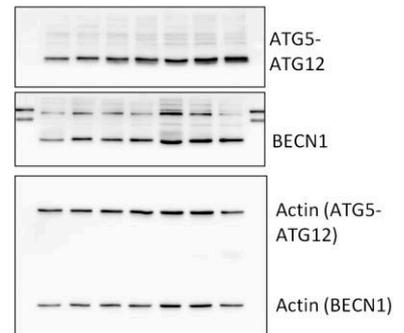


Fig.6B



Supplementary Figure S7. Full-length western blots.

Discussion de l'article

Dans cet article nous avons généré des lignées stables déficientes en autophagie permettant de confirmer le rôle bénéfique de l'autophagie sur la multiplication du HCMV. En revanche cette diminution reste peu importante, ce qui laisse penser que dans ces conditions, l'autophagie n'est pas indispensable mais optimise la production virale. Ce cas de figure a déjà été observé pour d'autres virus. En effet, l'inactivation de l'autophagie par l'utilisation de shRNA dirigé contre une protéine de l'autophagie entraîne une diminution d'un facteur 2 des titres viraux dans le cas de l'EBV (*Epstein barr virus*, un γ -Herpesvirus) et du HPIV3 (*Human parainfluenza virus type 3*, de la famille des *Paramyxoviridae*) (Ding et al., 2014; Granato et al., 2014). Cependant l'utilisation concomitante de 2 shRNA dirigés contre deux protéines de l'autophagie entraîne une diminution plus importante de la production de particules virales de virus parainfluenza de type 3 (HPIV3) (Ding et al., 2014). Les Fibroblastes sont des lignées compliquées à transduire/transfecter. C'est pourquoi, une double transfection en plus d'une infection pourraient être compliquée à réaliser, mais il pourrait être judicieux d'utiliser des lignées knock-out.

Grâce à l'élaboration de ces lignées, nous avons étudié à quelle étape du cycle virale l'autophagie était détournée par le virus. Sachant que le virus inhibe l'étape de dégradation du processus nous avons utilisé le terme « machinerie autophagique ». Nous avons étudié l'entrée du HCMV, l'expression de ses protéines et de son génome, et enfin l'assemblage viral dans ces différentes lignées et nous avons conclu que la machinerie autophagique était nécessaire lors de l'assemblage du virus. Nous avons également montré que les protéines membres de la famille LC3, soit LC3B, GABARAPL1 et GATE-16 s'accumulent sous leur forme lipidée et sont associées à des membranes au niveau du compartiment d'assemblage viral (vAC). D'après les images de microscopie confocale, LC3 colocalise partiellement avec pp28 au niveau de la périphérie du compartiment. Il serait intéressant de vérifier si LC3 interagit avec pp28 qui joue un rôle dans l'enveloppement et la sortie du virus (Seo et al., 2020; Seo & Britt, 2007).

Nous avons également étudié la structure du vAC par MET dans les cellules WT et nous avons observé l'accumulation de vésicules à double membrane ne contenant ni de corps denses (DB pour *dense bodies*), ni de virus, ainsi que des virus enveloppés dans des vésicules à simple membrane comme décrit précédemment (Chaumorcel et al., 2008). Cependant nous avons également observé des structures en forme de croissant englobant des capsides

entourées de téguments rappelant la formation des autophagosomes. Ces observations suggèrent que l'autophagie est requise pour l'enveloppement final du HCMV. Nous avons ensuite mis en évidence que des protéines de l'autophagie étaient associées à des particules virales extracellulaires purifiées. L'hypothèse serait donc que le virus acquiert son enveloppe grâce à la membrane interne de l'autophagosome, que le virus enveloppé atteigne la membrane plasmique en circulant dans la vésicule à simple membrane (correspondant à la membrane externe de l'autophagosome), et sorte par exocytose une fois que la vésicule ait fusionné avec la membrane plasmique. Il serait intéressant de regarder si la particule virale comporte des protéines LC3 au niveau de son enveloppe virale, ce qui irait en faveur d'un rôle de LC3 au niveau de l'assemblage comme il a été décrit pour l'EBV (Nowag et al., 2014).

Enfin, nous avons mis en évidence la formation d'un prAC, un pré-compartiment d'assemblage viral, après avoir observé l'accumulation de LC3 proche du noyau dès 10h après infection, ainsi qu'un changement de morphologie de l'appareil de Golgi marqué par la protéine GM130. Le vAC est étudié principalement à 96 hpi, cependant, le phénotype de l'appareil de Golgi est changé dès 48h (Rebmann et al., 2016). La fragmentation de l'appareil de Golgi est observée en même temps que le passage de la protéine virale pp65 du noyau vers le cytoplasme. Ce phénotype est indépendant de pp65 mais est lié à la protéine Golgienne Grasp65 qui induit cette fragmentation et participe à la formation du vAC. Il serait intéressant d'étudier quels composants du HCMV (protéines, ARN ou génome) ont un rôle dans l'induction de l'autophagie et la mise en place du prAC.

Résultats complémentaires

En complément de ce travail, nous avons étudié quel(s) étai(en)t le(s) rôle(s) des protéines autophagiques sur l'assemblage du HCMV. Pour y répondre, nous avons centré notre étude sur la protéine ATG5.

L'absence de la protéine ATG5 induit des structures atypiques dans les fibroblastes.

a) Validation des cellules KO pour ATG5

Sachant que le virus incorpore des protéines autophagiques dans la particule virale, notamment la protéine ATG5, nous avons établi une lignée stable de HFF knock out (KO) par la technique CRISPR/cas9 et une séquence guide dirigée contre le gène ATG5 (HFF CRISPR ATG5) ainsi que ses deux contrôles (HFF CRISPR et HFF CRISPR NT) (voir matériels et méthodes des Figures 18 et 19).

L'extinction d'ATG5 et l'inhibition de l'autophagie ont été validées par western blot dans les conditions *mock* et infectée par HCMV 4 jpi (Figure 18). Dans la lignée HFF CRISPR ATG5, ATG5 est indétectable aussi bien dans les cellules *mock* que dans les cellules infectées (Figure 18A). Afin de vérifier l'inhibition de l'autophagie dans ces cellules, nous avons étudié l'expression de la protéine adaptatrice p62/SQSTM1. L'expression de p62/SQSTM1 semble modulée de la même façon dans les cellules contrôles et WT tandis que dans la lignée CRISPR ATG5, p62/SQSTM1 s'accumule fortement, indépendamment de l'infection, ce qui suggère que l'autophagie est bien déficiente. Nous avons ensuite regardé l'expression et la lipidation de deux membres de la famille des LC3 : LC3B et GABARAPL1. La quantité des deux LC3 est la même entre les lignées contrôles et WT et on retrouve l'accumulation de la forme lipidée de ces deux protéines lorsque les cellules sont infectées. Ce résultat nous permet de valider que la modulation de l'autophagie est similaire entre les lignées contrôles et WT et nous confirme que les lignées HFF CRISPR et HFF CRISPR NT sont deux bons contrôles (Figure 18B). Pour la lignée CRISPR ATG5, les protéines LC3B-I et GABARAPL1-I s'accumulent par rapports aux lignées contrôles alors que LC3B-II et GABARAPL1-II sont quasiment indétectables dans les deux conditions. L'ensemble de ces résultats valident la déficience de l'autophagie de la lignée CRISPR ATG5 car elle présente un défaut de la lipidation des protéines LC3B et GABARAPL1 ainsi qu'une accumulation de p62.

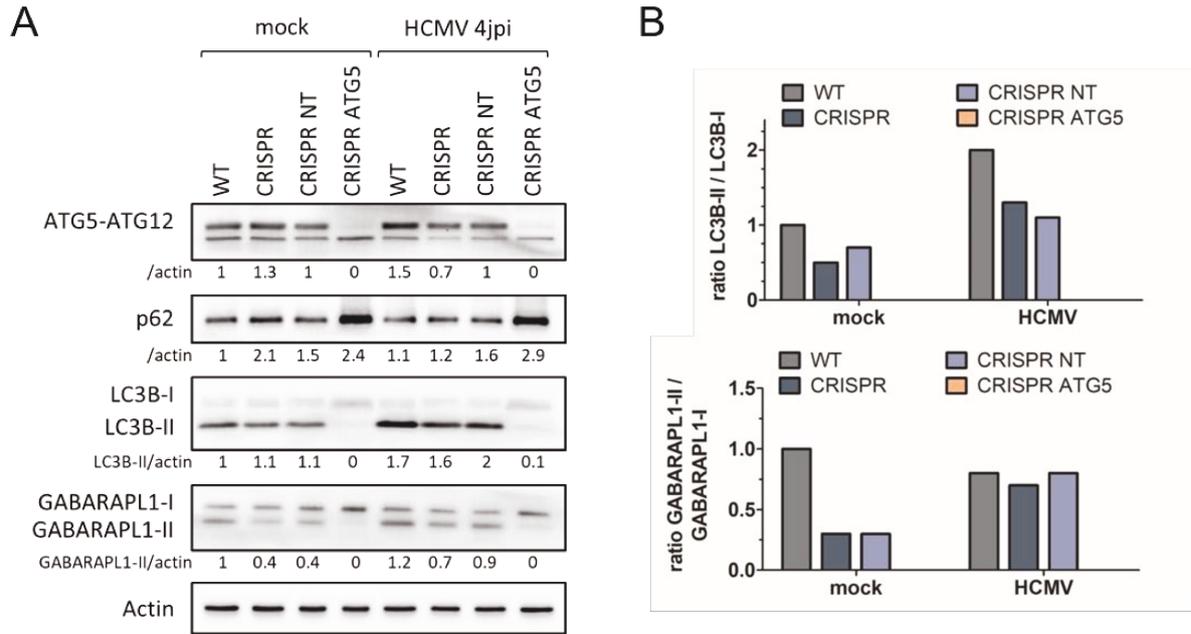


Figure 18 : La lignée HFF CRISPR ATG5 est déficiente en autophagie et présente un défaut de lipodation des protéines LC3.

La lignée WT (WT pour *wild type* ou sauvage), et les lignées stables exprimant CRISPR/cas9 seul (CRISPR), le CRISPR/cas9 et la séquence guide « *non target* » (CRISPR NT) ou le CRISPR/cas9 la séquence guide ATG5 (CRISPR ATG5) sont infectées pendant 4 jours à MOI 0,5. (A) Les lysats cellulaires sont analysés par western blot pour l'expression d'ATG5, p62/SQSTM1, LC3B et GABARAPL1 dans des cellules non-infectées (*mock*) ou infectées. L'actine est utilisée comme contrôle de charge. (B) Ratio des formes-II/formes-I, pour les protéines LC3B et GABARAPL1 (cellules *mock* et infectées) correspondant aux quantifications du western blot. Les ratio *mock* de la lignée WT sont standardisés à 1.

Les différentes lignées cellulaires ont ensuite été infectées afin de rechercher l'impact de l'absence d'ATG5 sur la production du HCMV (Figure 19A). Après 10 jours d'infection, la production virale est 4x plus faible dans la lignée CRISPR ATG5 comparé aux lignées contrôles, ce qui est plus important que dans les lignées shATG5 obtenues précédemment. Afin de vérifier si l'expression des protéines virales est impactée dans la lignée CRISPR ATG5, un western blot est réalisé 4 jpi des différentes lignées (Figure 19B). L'expression des protéines IE1, IE2, TRS1, IRS1 et pp28 semble légèrement modifiée entre les cellules WT et les lignées stables établies, mais on ne retrouve pas de différence entre les lignées contrôles et la lignée CRISPR ATG5. Ce résultat suggère que l'absence de la protéine ATG5 n'impacte pas l'expression des protéines du HCMV.

Jusqu'à présent, nous n'avons pas observé de différences majeures entre les lignées contrôles et WT, c'est pourquoi nous avons décidé de comparer la morphologie du vAC de la lignée WT avec la lignée CRISPR ATG5. La protéine cellulaire GM130 de l'appareil de Golgi est utilisée pour marquer le vAC et les cellules infectées sont marquées avec la protéine

MCP (Figure 19C). Nous observons la formation d'un vAC similaire dans les deux lignées, ce qui suggère que l'absence d'ATG5 n'impacte pas la morphologie du vAC.

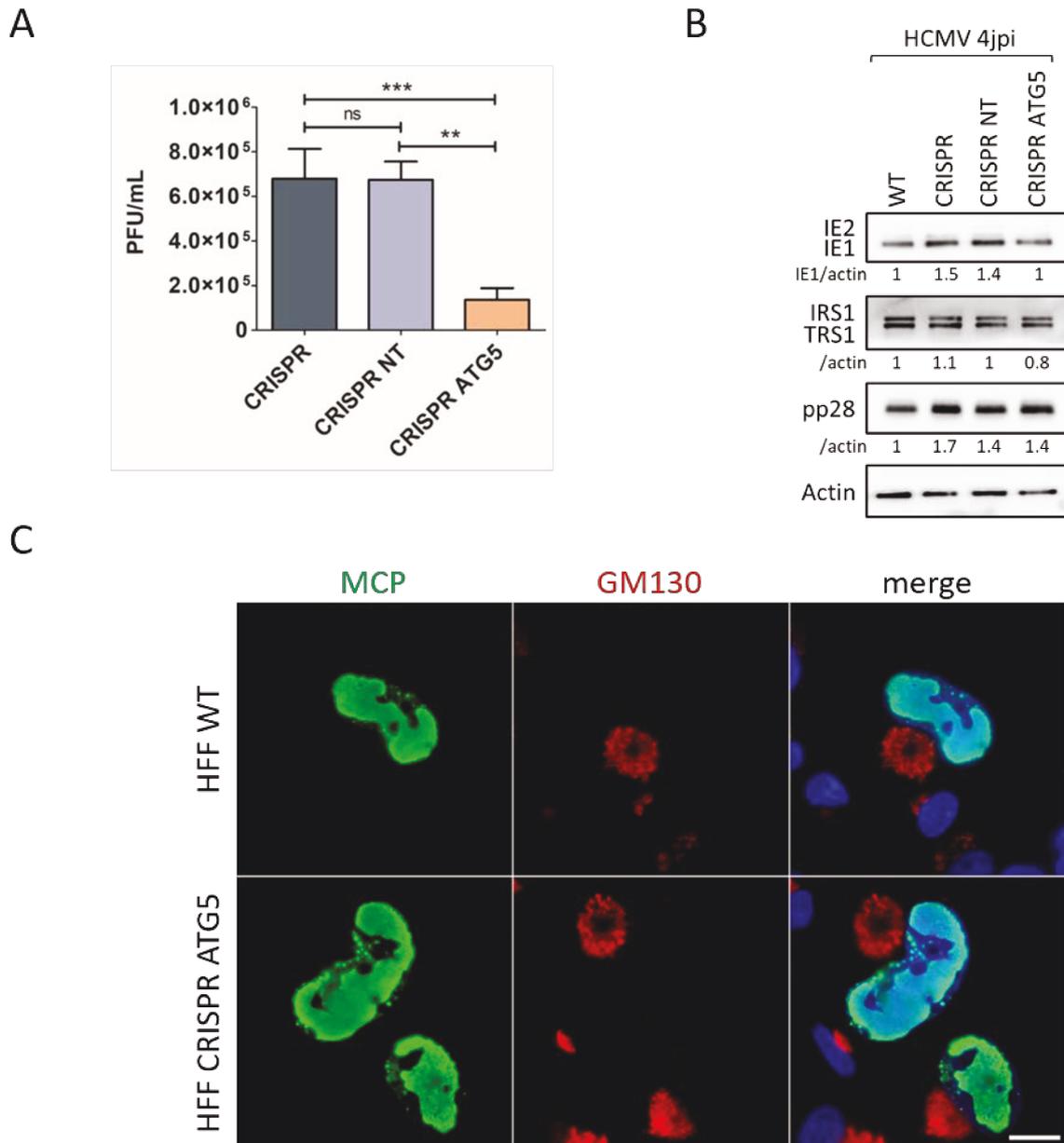


Figure 19 : L'absence de la protéine ATG5 entraîne une diminution de la production virale mais n'impacte ni l'expression des protéines du HCMV ni la formation du vAC.

La lignée WT et les lignées HFF CRISPR, HFF CRISPR NT ou HFF CRISPR ATG5 sont infectées par le HCMV à MOI 0,5. (A) Le titre du virus infectieux produit dans le surnageant des cellules est déterminé à 10 jpi. ** p<0,005, *** p<0,0005, test « one way » ANOVA, n=6. (B) Les lysats cellulaires sont analysés par western blot pour l'expression des protéines virales IE1, IE2, IRS1, TRS1 et pp28 dans des cellules infectées pendant 4 jours. L'actine est utilisée comme contrôle de dépôt. (C) Images représentatives des lignées WT et CRISPR ATG5 infectées par HCMV pendant 4 jours. Les cellules sont marquées contre la protéine majeure de capsid (MCP en vert) et une protéine de l'appareil de Golgi (GM130 en rouge). Les noyaux sont marqués au DAPI. La barre d'échelle = 20µm.

L'ensemble de ces résultats confirment que l'infection des cellules HFF CRISPR ATG5 entraîne une diminution de la production du HCMV, sans impacter l'expression des protéines virale ni la morphologie du vAC, représenté ici par la protéine GM130.

MATERIELS ET METHODES Figures 18 et 19

LIGNEES CELLULAIRES ET SOUCHES VIRALES

La lignée HFF est cultivée dans du DMEM supplémenté à 10% de SVF et incubée à 37°C à 5% de CO₂. Pour l'obtention des différentes lignées CRISPR, une monocouche de cellules HFF a été transduite à l'aide d'un vecteur lentiviral fourni par le laboratoire de Clarisse Berlioz-Torrent [Institut Cochin, Paris, France] (non publié). Les cellules ont été transduites avec les lentivirus fabriqués à partir du plasmide lentiCRISPRv2 (Addgene #52961) (HFF CRISPR) contenant soit une séquence guide dirigée contre aucun gène de la cellule (« non target ») (HFF CRISPR NT) soit une séquence dirigée contre le gène ATG5 conçue par Clarisse Berlioz-Torrent (HFF CRISPR ATG5). Les cellules transduites ont ensuite été sélectionnées par ajout de 5µg/mL de puromycine puis amplifiées. La lignée primaire MRC5 est utilisée pour déterminer les titres viraux en immunohistochimie. La souche virale utilisée est AD169 obtenue de l'ATCC.

INFECTION VIRALE ET TITRAGE

Le virus dilué dans du milieu sans sérum, ou uniquement du milieu sans sérum (condition mock) sont ajoutés sur les cellules pendant 1 ou 2h à 37°C à différentes MOI. Les cellules sont ensuite cultivées dans du DMEM supplémenté à 10% de sérum pendant des durées variables suivant l'expérience. Pour déterminer le titre viral, le surnageant est collecté à 10 jpi puis quantifié comme décrit précédemment (Esclatine et al., 2001).

ANTICORPS UTILISES

Afin de détecter les cellules infectées nous avons utilisé des anticorps monoclonaux de souris contre les protéines IE1 et IE2 (clone E13; Biomerieux, 11-003), la protéine pp28 (Santa Cruz, clone CH19, sc-69749) et la protéine MCP (UL86 28-4 fourni par William Britt [Departments of Microbiology, Pediatrics, and Neurobiology, School of Medicine, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, USA]). Nous avons également utilisé un anticorps polyclonal de lapin contre les protéines IRS1 et TRS1 (fourni par Adam Geballe [University of Washington, Seattle, Washington]). Afin de détecter les marqueurs cellulaires nous avons utilisé les anticorps anti-β-actine (Merck Millipore MAB1501 clone C4), anti-ATG5 (sigma, A0731), anti- GABARAPL1 (Cell-signaling, D5R9Y), anti-GM130 (BD transduction, 610822), anti-LC3B (Sigma L7543), anti-SQSTM1 (p62) (Abnova clone 2C11, H00008878-M01) et DAPI (Invitrogen, D1306). Les anticorps secondaires de chèvre anti-souris et anti-lapin couplé à l'enzyme HRP proviennent des laboratoires Jackson ImmunoResearch (115-035-003, 111-035-003). Les anticorps secondaires de chèvre couplé à Alexa Fluor 555 anti-souris (Life technology, A21424) et Alexa Fluor 488 anti-souris (Jacskon ImmunoResearch 115-545-003).

ANALYSE EN WESTERN BLOT

Les cellules sont lysées dans du tampon contenant 65 mM Tris, pH 6,8, 4% SDS, 1,5% β-mercaptoethanol et incubées à 100°C pendant 10 min. Les extraits protéiques sont ensuite séparés sur des gels SDS-PAGE

(8% ou 12,5% de poly-acrylamide) et électrotransférés sur des membranes polyfluorure de vinylidène (Amersham). Les membranes sont incubées dans du tampon de blocage contenant 5% de lait puis dans l'anticorps primaire toute la nuit à 4°C. Les anticorps secondaires couplés à l'enzyme HRP sont utilisés puis révélés à l'ajout du système de détection ECL (Immobilon, Millipore). La quantification de l'expression des protéines est réalisée en utilisant le logiciel FIJI et normalisée grâce au contrôle de charge représenté par l'actine.

ANALYSE EN IMMUNOFLUORESCENCE

Les cellules sont lavées au tampon PBS (pour phosphate buffered saline) et fixées dans du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde puis perméabilisées dans du PBS 0,2% Triton X-100. Les cellules sont ensuite incubées 1h dans du PBS 0,2% de gélatine supplémenté de 5% de sérum de chèvre additionnés de fragment Fc d'IgG humaines (ChromPure Jackson ImmunoResearch) pour le blocage, puis avec les anticorps primaires appropriés. Les cellules sont rincées dans du PBS Tween20 0,1%, et incubées avec l'anticorps secondaire approprié. Les lamelles sont montées dans du milieu de montage Glycergel (Dako, C0563) et observées en utilisant le microscope à épifluorescence Nikon Eclipse 80i. Les photos sont redimensionnées, organisées et légendées en utilisant le logiciel FIJI.

STATISTIQUES

Les données sont exprimées en moyennes +/- l'erreur standard de la moyenne et sont analysées avec le logiciel Prism (GraphPad) en utilisant le test d'analyse « one way » ANOVA. Les P values inférieures à 0,05 sont considérées comme statistiquement significatives. Les statistiques sont déterminées sur au minimum 3 expériences.

b) Caractérisation des cellules HFF CRISPR ATG5

Afin d'étudier de façon plus approfondie le déroulement de l'infection dans les cellules HFF CRISPR ATG5, une étude ultrastructurale a été réalisée (Figure 20). Nos premières observations suggèrent que les virus ne présentent pas de défaut d'enveloppement au sein du vAC formé dans les cellules CRISPR ATG5. La Figure 20A est une image de microscopie électronique à transmission (MET) correspondant à une portion du vAC des cellules CRISPR ATG5. On y observe l'accumulation de vésicules à double membrane mais également des structures en forme de croissant, ce qui ressemble respectivement aux autophagosomes et aux phagophores. De plus, nous retrouvons des particules virales dans des vésicules tout comme les images obtenues précédemment dans les cellules WT. Les autres images en MET montrent dans le cytoplasme des zones denses aux électrons, proches du noyau, exclus du vAC (Figure 20B). Dans les cellules WT, ces zones denses présentent des petites vésicules cytoplasmiques en périphérie d'un diamètre moyen de 44 nm (têtes de flèche orange). En revanche, ces zones semblent beaucoup plus vastes dans les cellules CRISPR ATG5 et semblent très différentes de celles observées dans les cellules WT. Au sein de ces zones denses aux électrons, se

regroupent les mêmes petites vésicules cytoplasmiques de diamètre moyen de 67 nm (têtes de flèche orange) mais aussi des vésicules dont le contenu semble vide (certainement dû à la préparation des échantillons) de diamètre moyen de 160 nm (têtes de flèche violette).

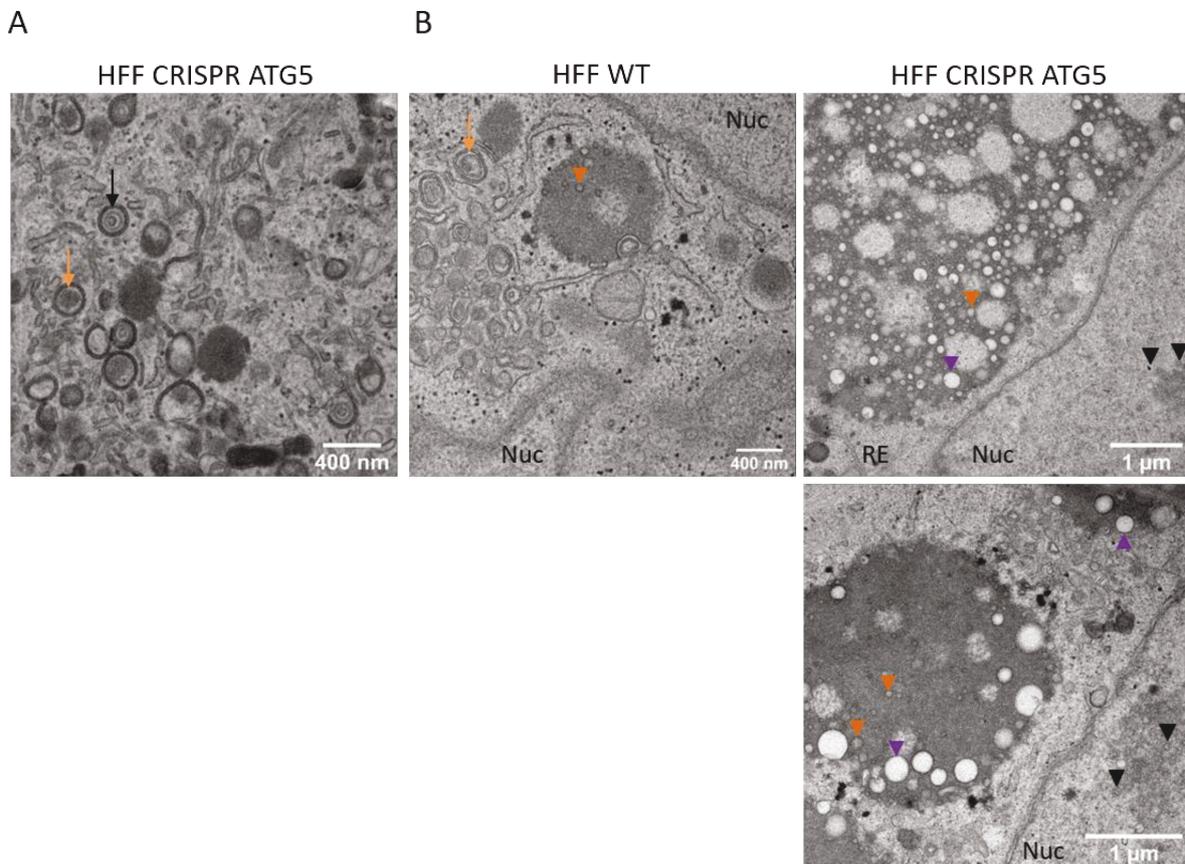


Figure 20 : Etude ultrastructurale des HFF CRISPR ATG5 et HFF WT infectées par HCMV.

Analyse d'images d'inclusion en résine en microscopie électronique à transmission (MET) de cellules infectées par HCMV à MOI 0,5 pendant 4 jours. **(A)** Une image du vAC des cellules HFF CRISPR ATG5 montre la présence d'autophagosomes (→) ainsi que des particules virales dans un autophagosome (la membrane interne forme l'enveloppe virale) (→). **(B)** Dans le cytoplasme des cellules HFF WT et HFF CRISPR ATG5, proche du noyau et exclus du vAC, se trouve une zone dense aux électrons, contenant des petites vésicules cytoplasmiques (▶) et dans le noyau se trouvent les capsides virales (▶). Dans les cellules CRISPR ATG5, un grand nombre de vésicules qui paraissent vides (sûrement dû à la préparation des échantillons) (▶) s'accablent dans ces zones denses aux électrons. Nuc : *nucleus* ou noyau; RE : réticulum endoplasmique.

Afin d'identifier ces différentes structures, nous avons marqué des protéines virales par immunofluorescence et observé les cellules en microscopie (Figure 21). Il est décrit dans la littérature que la protéine pp28 forme des vésicules cytoplasmiques dans les fibroblastes (Seo & Britt, 2006, 2008; Sharon-Friling & Shenk, 2014). C'est pourquoi, nous avons choisi de comparer le marquage de cette protéine virale dans les cellules CRISPR ATG5 et WT et de regarder en lumière blanche (LB) ces vésicules (Figure 21A). Nous pouvons observer la

présence de vésicules formées par pp28 et des vésicules réfringentes en LB dans les deux lignées. Les vésicules observées dans les cellules CRISPR ATG5 semblent visuellement plus grandes que celles dans les cellules WT, nous avons donc estimé leur diamètre. Les diamètres des vésicules formées par pp28 dans les cellules WT vont de 0,3 à 3 μm et celles en LB de 0,4 à 5,2 μm , tandis que les diamètres des vésicules formées par pp28 dans les CRISPR ATG5 vont de 0,6 à 9,6 μm et celles en LB de 0,9 à 9,6 μm . Ces résultats montrent que les vésicules cytoplasmiques ont un diamètre 2 fois plus grand dans les cellules CRISPR ATG5. Les images en LB montrent d'autres vésicules qui ne semblent pas contenir de protéines pp28. C'est pourquoi, nous avons essayé de les identifier en utilisant les marqueurs protéiques LAMP1 (lysosomes tardifs) ainsi que EEA1 (endosomes précoces) (Figure 21B). En effet, il a été décrit que les vésicules marquées par pp28 colocalisent avec EEA1 dans les fibroblastes infectés (Sharon-Friling & Shenk, 2014). Les protéines EEA1 et LAMP1 s'accumulent au niveau du vAC comme dans les cellules WT. En revanche, les vésicules réfringentes en lumière blanche ne semble pas correspondre aux marquages LAMP1 ou EEA1. Aussi, il a été décrit que la formation des vésicules marquées par pp28 est corrélée à l'activation de la synthèse des acides gras (Sharon-Friling & Shenk, 2014). Nous avons donc marqué les gouttelettes lipidiques à l'aide d'une sonde BODIPY (Figure 21B). D'après les résultats, le marquage BODIPY s'accumule au niveau du vAC et semble colocaliser avec le marquage pp28 de façon similaire, aux cellules WT (non montrés). Nous ne pouvons pas conclure à ce jour sur la nature de ces vésicules retrouvées en MET, il est fondamental de poursuivre cette analyse en utilisant une technique plus résolutive afin de caractériser de façon plus précise ces structures.

Les images de MET montrent des structures délimitées par une membrane dans le noyau des cellules KO pour ATG5, comprenant des particules virales matures ainsi que des vésicules (Figure 22A). La présence de particules virales enveloppées dans le noyau des cellules CRISPR ATG5 laisse penser que soit 1) les virus s'accumulent dans le noyau, soit 2) il s'agit d'un repliement de la membrane nucléaire interne. Afin d'explorer ces hypothèses, nous avons regardé si les composants viraux s'accumulaient davantage dans le noyau des cellules CRISPR ATG5, que dans les cellules contrôles (CRISPR et CRISPR NT) et les cellules WT. Pour cela, nous avons analysé le nombre relatif de copies de génome viral par PCR ainsi que l'expression de certaines protéines virales par western blot dans la fraction nucléaire ou dans la fraction cytoplasmique (Figure 22B). Afin de valider le fractionnement cellulaire, nous avons utilisé le marquage de la protéine poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1, qui est une enzyme intervenant dans la réparation de l'ADN) pour la fraction

nucléaire et le marquage de la protéine α -tubuline, composant des microtubules, pour la fraction cytoplasmique. Il n'y a pas de différence dans la quantité de génome viral entre les différentes lignées, aussi bien dans la fraction nucléaire que dans la fraction cytoplasmique. La protéine d'enveloppe virale gB et les protéines très précoces IE1 et IE2 sont retrouvées à la fois dans le noyau et à la fois dans le cytoplasme, tandis que la protéine de capsid MCP est localisée principalement dans le noyau après 4 jours d'infection. Ce résultat laisse penser que la technique utilisée ne permet pas de séparer le RE de la fraction nucléaire. On peut observer que l'expression de gB et MCP ne semble pas différente entre les lignées contrôles et la lignée KO mais semble plus importante dans la lignée WT. En revanche l'expression des protéines IE1 et IE2 semble similaire entre les différentes lignées. Nous pouvons conclure que l'absence d'ATG5 n'a pas d'impact sur l'accumulation de protéines et sur l'accumulation du génome viral dans le noyau.

En conclusion, l'infection des cellules HFF KO pour ATG5 n'entraîne pas l'accumulation de virus dans le noyau. Des structures atypiques sont observées dans le cytoplasme mais nous n'avons pas pu à ce jour déterminer leur nature. C'est pourquoi, nous avons établi une collaboration avec le laboratoire de Jens von Einem à Ulm en Allemagne, spécialisé dans la régulation de la morphogénèse du HCMV. Ce laboratoire possède un microscope électronique à balayage et à faisceau d'ions focalisés (FIB-SEM pour *Focused Ion Beam milling combined with Scanning Electron Microscopy*) ce qui permettra de vérifier par une autre technique de préparation des échantillons, si ces structures sont liées au KO du gène ATG5 ou s'il s'agit d'un artefact de notre préparation des échantillons. De plus, une étude plus résolutive en microscopie photonique nous permettra de mieux conclure sur la nature des vésicules observées.

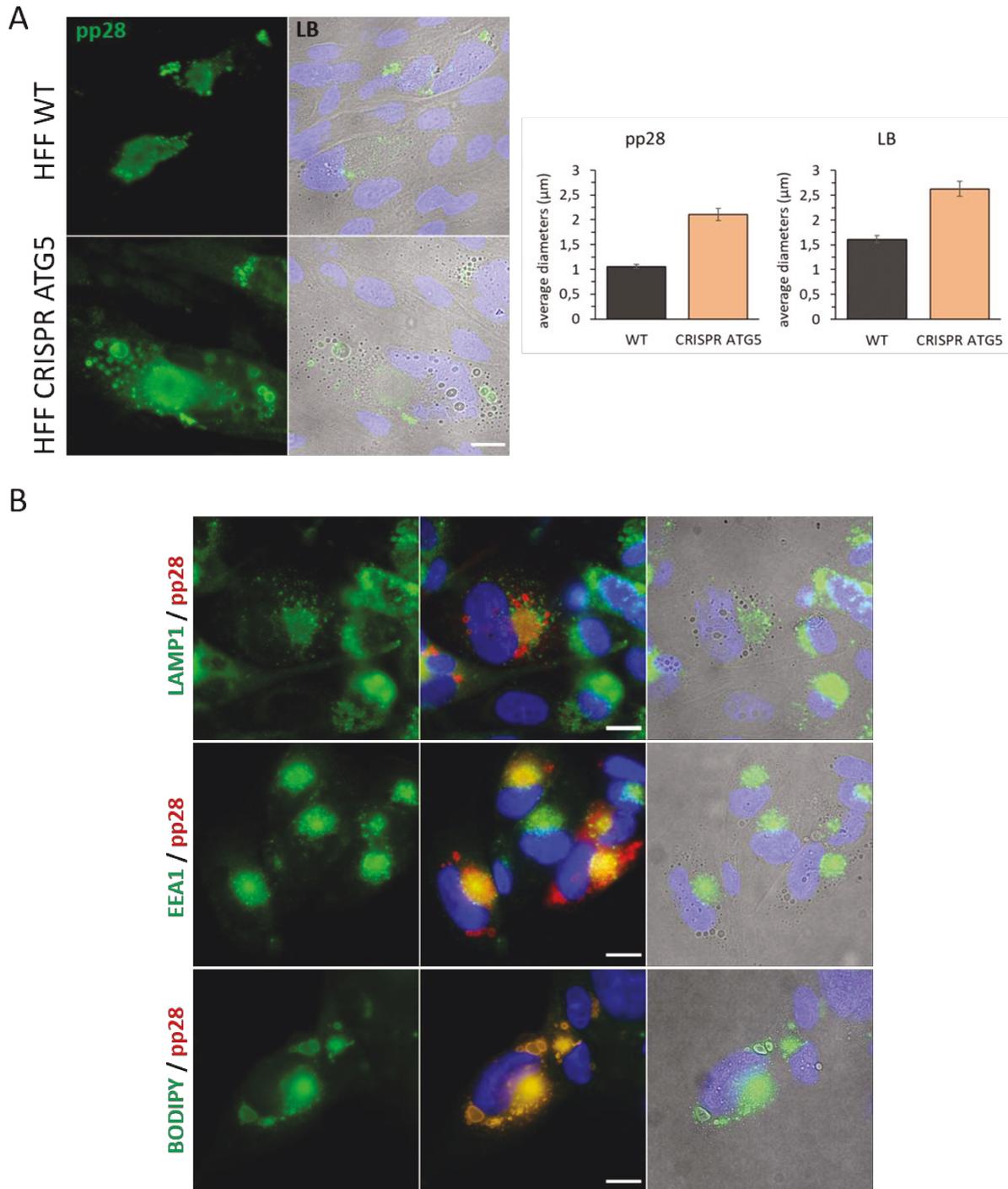


Figure 21 : Caractérisation des vésicules présentes dans les HFF CRISPR ATG5 infectées par HCMV.

Images représentatives des cellules infectées par HCMV à MOI 0,5 pendant 4 jours. (A) Marquage et comparaison des diamètres des vésicules de pp28 (vert) et des vésicules réfringentes en lumière blanche (LB) dans les cellules CRISPR ATG5 et WT. SEM sur 90 à 120 vésicules. N=2 (B) Caractérisation des vésicules dans les cellules CRISPR ATG5 grâce aux protéines cellulaires LAMP1 pour les lysosomes tardifs et EEA1 pour les endosomes précoces et grâce à la sonde BODIPY (493/503 nm) pour marquer les gouttelettes lipidiques. Les cellules sont aussi visualisées en LB pour localiser les vésicules dans le cytoplasme des cellules infectées. Les noyaux sont marqués au DAPI. La barre d'échelle = 20 μm .

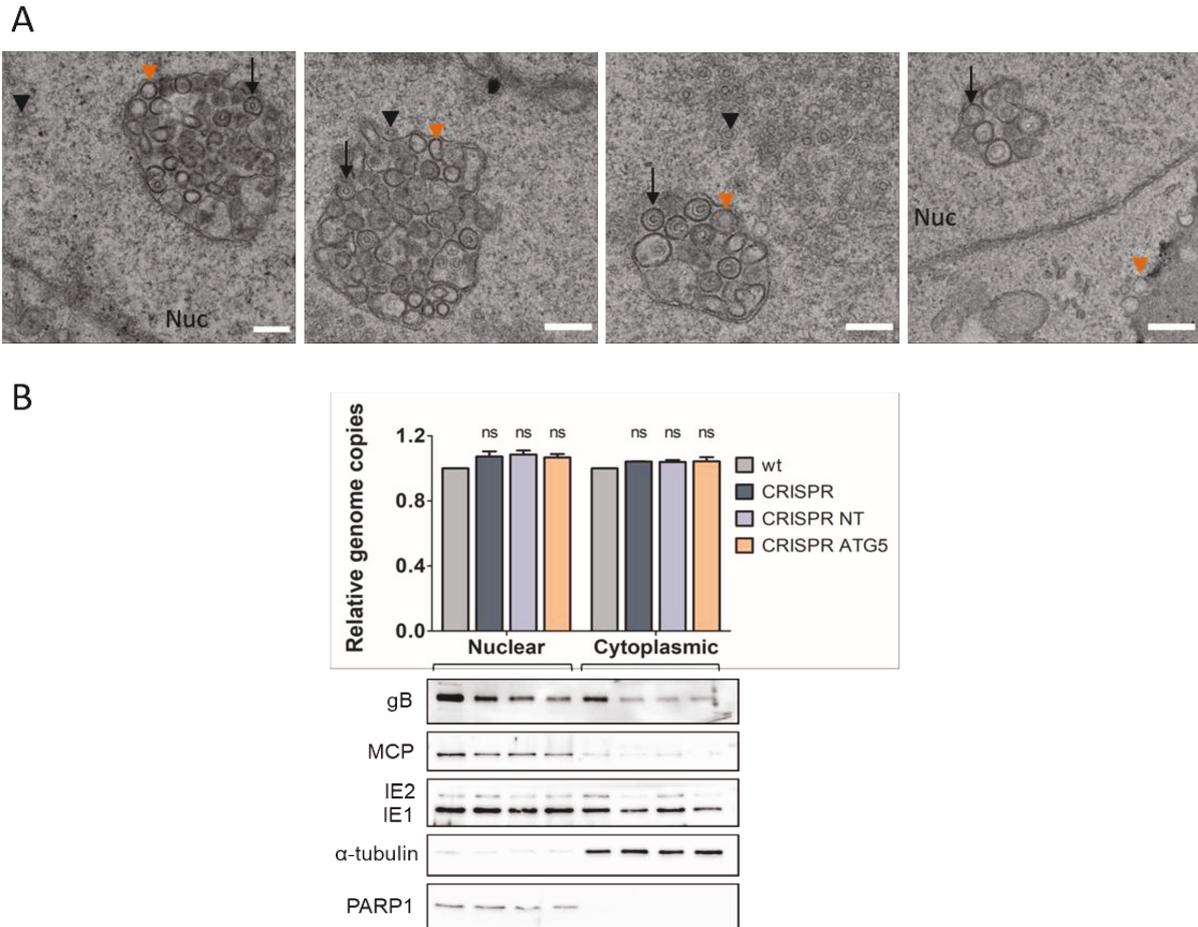


Figure 22 : Les composants du HCMV ne s'accumulent pas dans le noyau des HFF CRISPR ATG5.

Les cellules sont infectées avec du HCMV à MOI 0,5 pendant 4 jours. **(A)** Analyse d'images d'inclusion en résine de cellules CRISPR ATG5 infectées, au MET. (▶ : vésicules, → : particules virales dans une vésicule, ► : capsid virale). Barre d'échelle = 400 nm. **(B)** Fractionnement subcellulaire de la lignée WT, des lignées contrôles et CRISPR ATG5. Les fractions sont obtenues après différentes centrifugations et la quantité relative de génome de HCMV est déterminée par PCR en temps réel après extraction d'ADN viral du surnageant cellulaire. La quantité de génome produite dans la lignée WT est standardisée à 1. La distribution des protéines virales (gB, MCP, IE1 et IE2), et du marqueur nucléaire (PARP1) ou cytoplasmique (α -tubuline) est évaluée par western blot. Représentation de 3 expériences indépendantes. ns = non significatif, test « one way » ANOVA.

MATERIELS ET METHODES des Figures 20 à 22

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (MET)

Les cellules sont fixées 30 min à 37°C dans du tampon phosphate 0,1M supplémenté de 1% paraformaldehyde et de 2,5% glutaraldehyde, lavées puis fixées dans 1% tétr oxyde d'osmium et 1,5% ferrocyanure de potassium, puis déshydratées dans des bains successifs d'éthanol anhydre 50%, 70%, 90% puis 100% de 10 min et enfin incluses en résine Epon. Des sections ultrafines sont réalisées en utilisant l'ultramicrotome LEICA UC6 de la plateforme IMAGIF (Gif-sur-Yvette, France) et sont contrastées à l'acétate d'uranyle puis au citrate de plomb. Les échantillons sont observés en utilisant le

microscope électronique JEOL1400 à 80 kV et la camera Orius SCI1000. Les images sont redimensionnées, organisées et légendées en utilisant le logiciel Fiji.

ANTICORPS ET SONDE UTILISES (EN PLUS)

Afin de détecter les cellules infectées, nous avons en plus utilisé l'anticorps monoclonal de souris contre la protéine gB (UL55 27-156 fourni par William Britt). Afin de détecter les marqueurs cellulaires nous avons également utilisé les anticorps α -tubuline (sigma clone DM1A), EEAI (Cell-signaling, C45B10), LAMP1 (Cell-signaling, D2D11), PARP1 (santa-cruz (F-2) sc-8007). L'anticorps secondaire de chèvre couplé à Alexa Fluor 555 anti-lapin (Life technology, A21428) et la sonde BODIPY 493/503 nm (ThermoFisher Scientific, D3922).

FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE

Les HFF sont rincées dans du PBS froid après 4 jours d'infection. Les cellules sont grattées dans 1mL de milieu de fractionnement (Hépès 20mM, NaCl 10mM, MgCl₂ 2mM, EDTA 1mM, cocktail d'inhibiteurs de protéases et β -mercaptoéthanol 1mM) et laissées 10min dans la glace. Les cellules sont lysées mécaniquement par environ 10 passages au travers d'une aiguille 22G et puis laissées 20 min dans la glace. Pour séparer les 2 fractions, le lysat est centrifugé 5 min à +4°C à 3000 rpm. Le surnageant contient la fraction cytoplasmique et le culot contient la fraction nucléaire. Afin de lyser les noyaux, le culot est repris dans 1mL de milieu de fractionnement à l'aide d'une aiguille 22G puis le lysat est centrifugé 10 min à +4°C à 3500 rpm. Le culot est repris dans 500 μ L de milieu de fractionnement supplémenté de 0,1% de SDS afin de le concentrer. Les deux fractions sont, d'une part, analysées par PCR, après avoir extrait l'ADN dans 200 μ L, et d'autre part, analysées en western blot, après avoir rajouté du tampon de lyse.

EXTRACTION DE L'ADN VIRAL ET PCR EN TEMPS REEL

L'extraction d'ADN se fait sur 200 μ L de surnageant à l'aide du kit Roche « HIGH PURE VIRAL NUC.ACID KIT » de référence 11858874001. L'ADN est élué dans 50 μ L final et conservé à -20°C. La PCR en temps réel se fait en utilisant la sonde Taqman et les amorces spécifiques du gène viral UL123 (Leruez-Ville et al., 2003) sur un thermocycleur Biorad CFX96. Les données de PCR sont analysées en utilisant le logiciel « CFX manager ».

La protéine ATG5 améliore l'infectivité et la propagation du HCMV.

a) L'infectivité des virus produits dans des cellules CRISPR ATG5 est diminuée

Dans le but de caractériser l'infectivité des virus produits dans des cellules déficientes en ATG5, nous avons étudié la production virale dans les cellules contrôles et dans les cellules CRISPR ATG5 de 1 à 13 jours après l'infection (Figure 23A). En effet, un cycle viral se fait en 4-5 jours, puis on peut imaginer qu'un second a lieu de 5 à 10 jours, ce qui sous-entend que l'infection de toutes les cellules soit synchronisée. Au bout de 13 jours, on peut observer un déclin de la production virale, dû à la mort des cellules. Après 5 jours d'infection,

les productions virales sont similaires entre les différentes lignées contrôles mais sont plus faibles pour la lignée CRISPR ATG5. Ce résultat confirme nos précédents résultats obtenus à MOI 0,5 après un seul cycle de multiplication, soit 5 jpi (Figure 19A). En revanche, de 6 à 10 jpi, la production du HCMV est fortement diminuée dans la lignée CRISPR ATG5, ce qui confirme l'importance d'ATG5 dans la production de particules virales. Ce résultat apporte une information intéressante, il suggère que les virus produits dans les cellules CRISPR ATG5 présentent un défaut lors de la réinfection des cellules. Précédemment, nous avons montré qu'ATG5 était associée aux particules virales extracellulaires purifiées. Une hypothèse serait que l'infectivité des virus produits dans les cellules CRISPR ATG5 soit diminuée parce que les virus ne contiennent pas ATG5. Pour explorer cette hypothèse, nous avons en parallèle titré les virus infectieux et mesuré la quantité de génome viral dans le surnageant pour rechercher une potentielle accumulation de virus non infectieux en absence d'ATG5. En détail, nous avons regardé si le titre des virus produits dans les cellules CRISPR ATG5 est plus faible parce qu'il y a moins de particules virales totales (Figure 23B, cas n°1), ou parce qu'il y a plus de virus non-infectieux (Figure 23B, cas n°2). Pour cela, nous avons comparé le nombre relatif de copie d'ADN viral total aux titres des virus produits dans le surnageant des différentes lignées cellulaires à 10 jpi. On observe que la quantité de génome viral dans le surnageant n'est pas impactée par l'absence d'ATG5 alors que le titre viral à 10 jours est significativement plus faible dans les cellules CRISPR ATG5 (Figure 23C). L'infectivité relative est exprimée par le ratio du titre viral sur le nombre relatif de copie de génome dans le surnageant des cellules contrôles et CRISPR ATG5. La comparaison des trois lignées montre une différence significative d'environ 3 fois moins de virus infectieux libérés dans les cellules CRISPR ATG5 par rapport aux cellules contrôles (Figure 23D). Ce résultat indique que la présence d'ATG5 dans les cellules participe à l'infectivité des virus produits. Nous avons donc appelé le virus produit dans les cellules CRISPR ATG5 : HCMV « atg5ko », et par opposition, le virus produit dans les cellules contrôles ou les cellules WT : HCMV (wt).

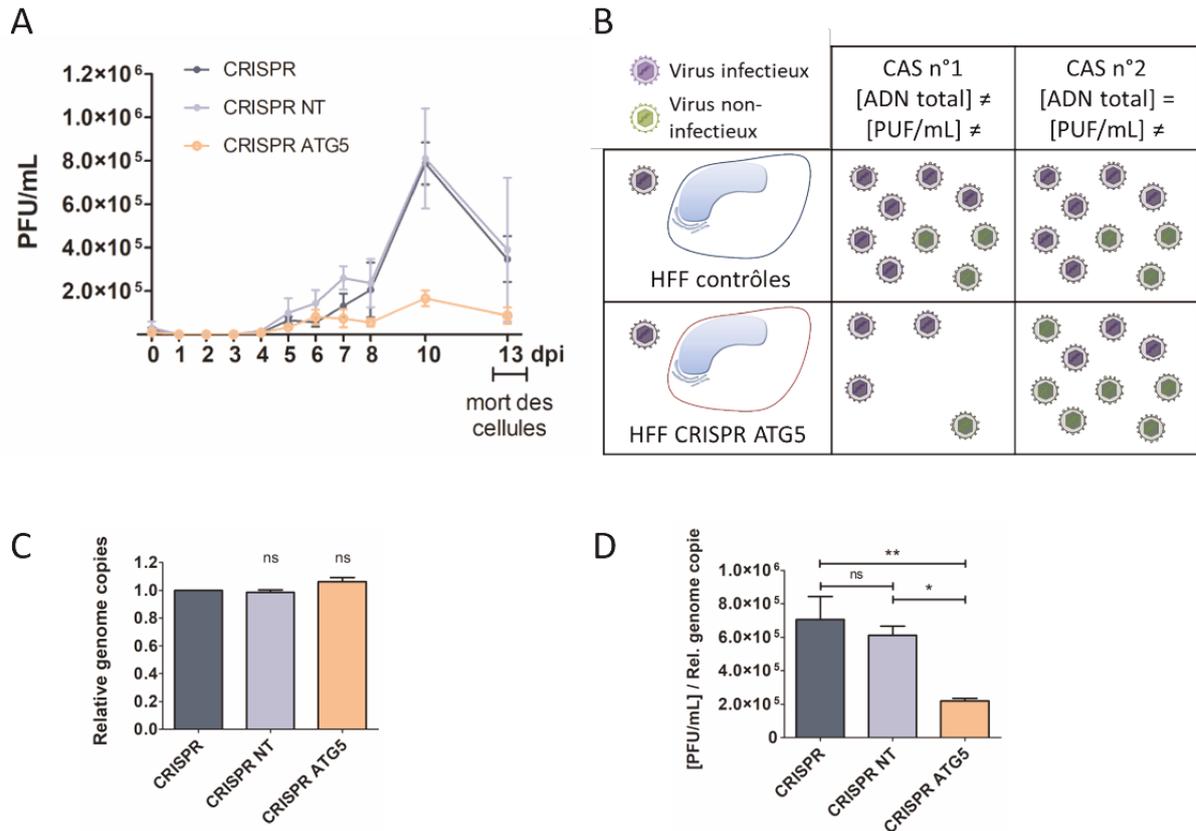


Figure 23 : Les virus produits dans les cellules CRISPR ATG5 sont moins infectieux.

(A) Cinétique de la production de HCMV infectieux dans les cellules HFF CRISPR, CRISPR NT et CRISPR ATG5 à MOI 0,5. Une partie du surnageant est prélevée chaque jour et le titre viral est déterminé (comme précédemment) aux temps indiqués. Le titre indiqué au jour 0, correspond au titre 6 hpi. Au 13^{ème} jour, la courbe décline dû à la mort des cellules. Représentation des moyennes et SEM de 3 ou 6 expériences indépendantes. (B) Tableau explicatif de l'expérience pour calculer l'infectivité relative des virus produit dans les cellules. Cas n°1, le titre viral est plus faible à 10jpi dans les cellules CRISPR ATG5 car la quantité d'ADN viral retrouvée dans le surnageant des cellules contrôles est plus importante que celle retrouvée dans le surnageant des cellules CRISPR ATG5. Cas n°2, les virus produits dans les cellules CRISPR ATG5 sont moins infectieux : la quantité d'ADN total retrouvée dans le surnageant des cellules contrôles et des cellules CRISPR ATG5 est la même malgré la différence des titres viraux. (C) Quantification relative des génomes viraux présents dans le surnageant 10 jpi. ns = non significatif, test « one way » ANOVA, n = 3. (D) Ratio entre la quantité relative de génome et le titre viral dans le surnageant à 10 jpi. * p<0,05, ** p<0,005, test « one way » ANOVA.

b) La stabilité de HCMV n'est pas significativement impactée dans le surnageant des cellules CRISPR ATG5

L'infectivité du HCMV « atg5ko » (virus produit dans les cellules CRISPR ATG5) est donc 3 fois inférieure à celle du HCMV (wt). Afin de rechercher si HCMV « atg5ko » est moins stable dans le surnageant des cellules, nous avons réalisé un stock de ce virus à partir du surnageant de cellules CRISPR ATG5 infectées. Puis, nous avons étudié l'impact de la température et du temps de conservation sur le titre viral en mettant les virus en suspension

dans du milieu pendant 24h ou 48h à 4°C, 20°C (température ambiante) et 37°C (Figure 24). Nous n'avons pas observé de différence de stabilité significative entre les virus. Nous avons cependant observé une tendance qui suggère que les virus produits dans les cellules CRISPR ATG5 pourraient être légèrement moins stables dans le surnageant des cellules, mais la différence observée ne permet pas d'expliquer la différence d'infectivité observée.

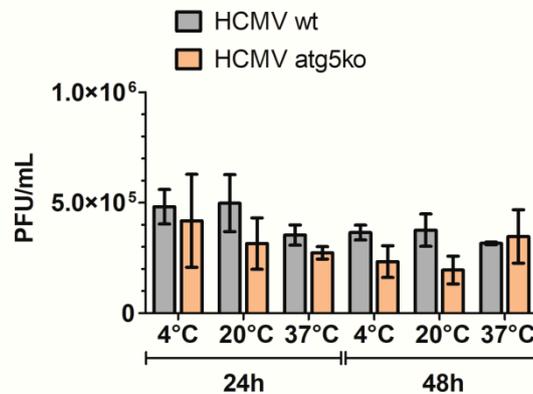


Figure 24 : La stabilité du HCMV n'est pas significativement impactée par l'absence d'ATG5.

La même quantité de virus est dispersée dans des microtubes aux différentes températures indiquées pendant 24h ou 48h puis le titre viral est déterminé pour chacune des conditions. $p > 0,05$ (non significatif), test « one way » ANOVA. N = 3 expériences indépendantes.

c) L'absence de la protéine ATG5 entraîne un défaut dans les étapes précoces lors de l'infection des cellules

Le défaut d'infectivité du HCMV « atg5ko » n'étant pas lié à la stabilité du virus, l'hypothèse serait que l'infection des cellules CRISPR ATG5 par HCMV « atg5ko » soit encore plus impactée que l'infection de ces cellules par le HCMV (wt). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé les expériences présentées dans ce paragraphe en parallèle des expériences de la Figure 23. Le but de cette expérience est de regarder si l'infection des cellules contrôles par HCMV « atg5ko », permet au virus de récupérer un phénotype proche du virus sauvage grâce à la présence d'ATG5 dans les cellules (et de ses activités, comme la lipidation des LC3 par exemple). Cette expérience nous indiquerait si le défaut d'infectivité est uniquement lié au virus lui-même ou aussi aux cellules CRISPR ATG5. Pour cela, nous avons comparé la production virale dans les différentes cellules infectées par HCMV « atg5ko » à MOI 0,5 jusqu'à 13 jours (Figure 25A). La production virale du contrôle CRISPR n'est pas montrée pour améliorer la clarté des résultats, mais les courbes de productions virales des différentes lignées (courbes bleu, orange et celle des cellules CRISPR) sont très similaires. Nous n'observons pas de différence significative entre les titres viraux obtenus dans les surnageants des différentes lignées cellulaires aux différents temps

d'infection (Figure 25A et B). Ces résultats indiquent donc que la présence d'ATG5 dans les cellules ne suffit pas pour améliorer l'infectivité des virus, si l'infection de départ est faite avec un virus HCMV « atg5ko ». Nous avons choisi de comparer la courbe de production du HCMV (wt) produit dans les cellules CRISPR ATG5 (ici la courbe rouge, correspondant à la courbe orange de la Figure 23A) et nous pouvons observer que les cinétiques sont similaires (Figure 25A). Ce résultat nous indique que l'infection des cellules CRISPR ATG5 par HCMV « atg5ko » est similaire à celle de l'infection de ces cellules KO par le HCMV (wt). Nous avons également déterminé l'infectivité relative du HCMV « atg5ko » produit dans les différentes lignées (Figure 25C). Les valeurs sont standardisées sur celles obtenues pour la lignée HFF CRISPR ATG5 infectée par le virus HCMV (wt) (histogrammes rouges). Ces résultats sont comparables et similaires entre les différentes lignées, ce qui suggère que l'infectivité des virus produits dans les cellules infectées par HCMV « atg5ko » est la même en présence ou non d'ATG5 dans les cellules.

L'ensemble de ce travail suggère que l'infection des cellules contrôles par le virus HCMV « atg5ko », ne permet pas au virus de récupérer un phénotype proche du virus sauvage. Ce travail indique également que le défaut d'infectivité est lié au virus lui-même. L'une des hypothèses que nous avons choisi d'émettre, est que le déroulement du cycle d'HCMV « atg5ko » est anormal. Nous avons précédemment montré que le prAC était organisé lors des étapes précoces de l'infection virale et notre laboratoire et d'autres, ont montré que l'autophagie était induite dès l'entrée du virus par les composants de la particule virale (Chaumorcel et al., 2012; McFarlane et al., 2011). L'hypothèse faite après ce travail est que la protéine ATG5, ou son activité (comme la lipodation des LC3), permet la stimulation de l'autophagie dès l'entrée du virus, ce qui est nécessaire au bon déroulement du cycle viral.

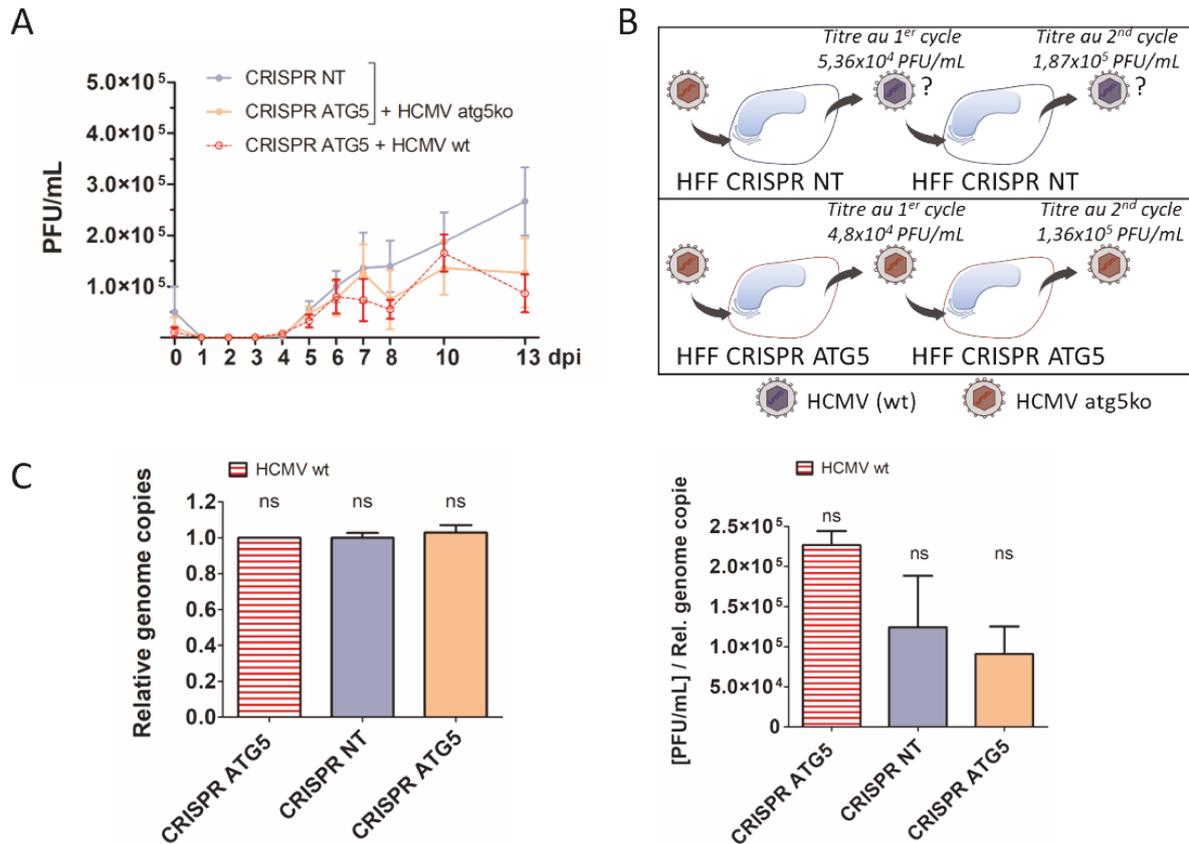


Figure 25 : L'infektivité des virus produits dans les cellules infectées par HCMV « atg5ko » est la même en présence ou non d'ATG5 dans les cellules.

Les cellules sont infectées avec HCMV « atg5ko » à MOI 0,5. (A) Titrage d'HCMV « atg5ko » à différents temps post infection. Une portion du surnageant est prélevée et le titre viral est déterminé (comme précédemment) aux temps indiqués. Représentation des moyennes et SEM de 3 à 6 expériences indépendantes. Les deux cinétiques sont comparées à celle des cellules CRISPR ATG5 infectées par HCMV (wt) (ici en rouge) de la Figure 23A. (B) Tableau schématisant la production des virus après deux cycles de multiplication du HCMV atg5ko. (C) Quantité relative de génome viral produit dans le surnageant après infection par HCMV « atg5ko » 10 jpi. Le standard de valeur 1 correspond à la condition HFF CRISPR ATG5 infectées par HCMV (wt) (Figure 23). ns = non significatif, test « one way » ANOVA, n = 3. (D) Ratio entre la quantité relative de génome et le titre viral dans le surnageant à 10 jpi. test « one way » ANOVA.

MATERIELS ET METHODES des Figures 23 à 25

SOUCHES VIRALES

Pour constituer le stock viral (HCMV atg5ko), les HFF WT sont infectées avec l'AD169 (HCMV wt) pendant 7 jours puis le surnageant est utilisé pour infecter des HFF CRISPR ATG5. Le virus produit est le virus (HCMV atg5ko) et est titré par la technique habituelle en cellules MRC5.

COURBES DE PRODUCTION VIRALE :

Des cellules en monocouche sont infectées à MOI 0,5 avec (HCMV wt) ou (HCMV atg5ko) dans du milieu non supplémenté en sérum. Après 2h d'adsorption, le milieu est renouvelé par du milieu supplémenté en sérum. Une portion du surnageant est ensuite prélevée et stockée à -80°C après 6 hpi

(0 jpi), 1 jpi, 2 jpi, 3 jpi, 4 jpi, 5 jpi, 6 jpi, 7 jpi, 8 jpi, 10 jpi, et 13 jpi. Après chaque prélèvement, du milieu DMEM supplémenté à 10% de sérum est ajouté sur les cellules pour obtenir le même volume final. Le titre viral dans le surnageant est ensuite déterminé.

STABILITE DES VIRUS

La même quantité de virus HCMV wt et HCMV atg5ko est divisé dans le même volume dans des microtubes puis placés à 4°C, 20°C et 37°C. Les titres viraux sont déterminés au bout de 24h et 48h sur des cellules MRC5.

Création de lignées stables exprimant la protéine ZsGreen-LC3B.

L'une de nos hypothèses serait que la présence d'ATG5 (de façon directe ou indirecte) associée aux particules virales extracellulaires favorise l'induction de l'autophagie dès l'entrée des virus dans les cellules. Une seconde hypothèse serait que l'autophagie induite par HCMV dès son entrée, favoriserait la mise en place du prAC puis du vAC. Pour répondre à ces hypothèses, nous avons créé une lignée stable exprimant la protéine LC3B couplée au fluorochrome ZsGreen (HFF ZsGreen-LC3B). Ce fluorochrome possède un spectre d'émission superposable à celui de la GFP. La protéine ZsGreen est obtenue à partir de l'organisme *Zoanthus sp* alors que la protéine GFP est obtenue à partir de l'organisme *Aequorea victoria*. La création de cette lignée permettra de réaliser de la vidéo microscopie à fluorescence afin de regarder la mise en place du prAC dans ces cellules infectées par HCMV (wt) et HCMV « atg5ko ». Tout d'abord, nous avons vérifié que la protéine exogène ZsGreen-LC3B se comporte de la même façon que la protéine LC3B endogène en condition infectieuse. Dans un premier temps, nous avons mesuré le titre des virus produits dans le surnageant ou associés aux cellules HFF WT et HFF ZsGreen-LC3B (Figure 26A). Nous avons observé que l'étiquette ZsGreen n'entraîne ni diminution de la production virale, ni rétention des virus associés aux cellules. Nous avons également regardé si l'expression de ZsGreen-LC3B était similaire à celle de LC3B endogène au cours de l'infection (Figure 26B). Lorsque les cellules sont infectées, on peut observer que les protéines IE1 et IE2 augmentent jusqu'à 6 jpi, tout comme la protéine LC3B-II. Pour la protéine ZsGreen-LC3B, il est difficile de distinguer les bandes correspondantes à ZsGreen-LC3B-I (44 kDa) et ZsGreen-LC3B-II (42 kDa). Cependant, elle semble augmenter au cours de l'infection et diminuer à 6 jpi sûrement dû à un problème de stabilité de la protéine de fusion. De plus, nous avons vérifié par immunofluorescence que ZsGreen-LC3B se comporte comme LC3 endogène dans les cellules infectées par HCMV 5 jpi (Figure 26C). Nous pouvons observer que ZsGreen-LC3B se localise dans la partie la plus externe du vAC marqué par la protéine virale gB (Figure

26C). Cette lignée cellulaire est donc un bon modèle pour observer la mise en place du prAC suite à l'infection du HCMV par vidéo microscopie à des temps précoces de l'infection. Afin de détecter les cellules infectées, nous allons utiliser une souche de HCMV exprimant la protéine pp65 fusionnée au fluorochrome mCherry, confectionnée par nos collaborateurs en Allemagne (équipe de Jens von Einem). L'objectif serait de produire un stock de HCMV « atg5ko » exprimant la protéine pp65mCherry. Pour cela, nous infecterons les cellules CRISPR ATG5 avec le virus HCMV pp65mCherry, et nous réaliserons un stock des virus produits à partir de ces cellules. Nous pourrions ainsi observer la formation du prAC dans les cellules ZsGreen-LC3B infectées par HCMV (wt) ou HCMV « atg5ko » exprimant la protéine pp65mCherry.

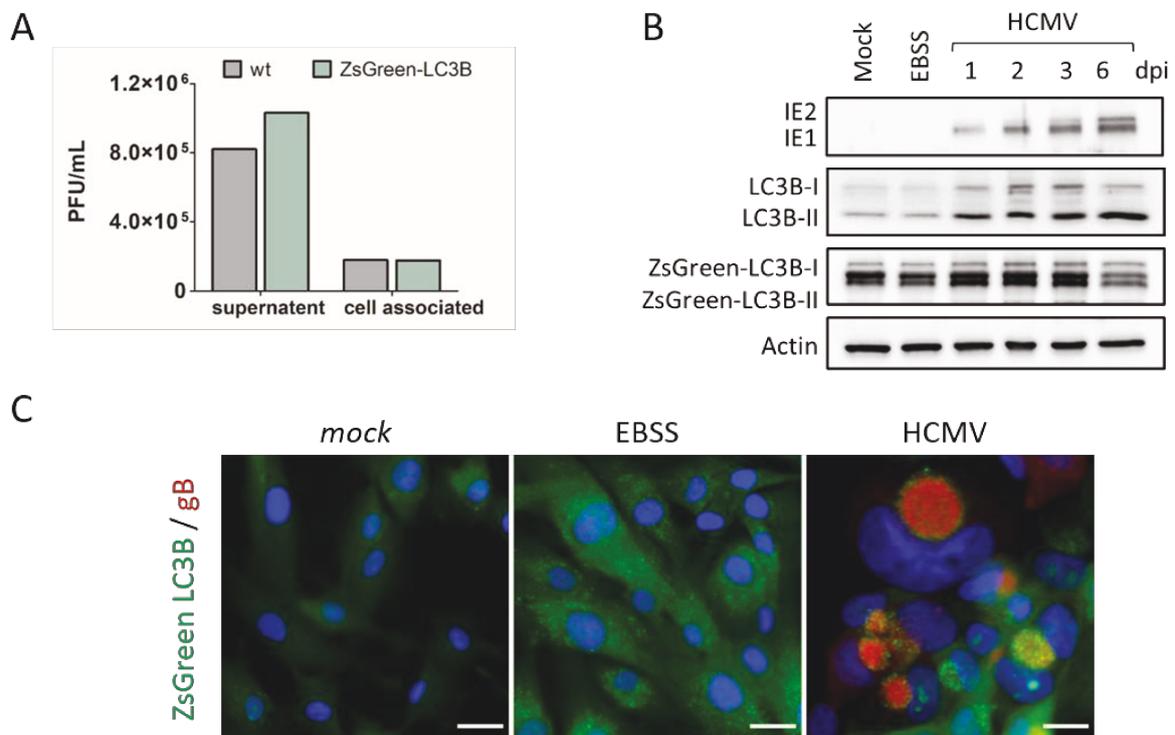


Figure 26 : Caractérisation de l'infection par HCMV de la lignée HFF ZsGreen-LC3B.

(A) Comparaison des titres viraux obtenus après l'infection des cellules WT et de la lignée ZsGreen-LC3B par HCMV à MOI 0,5 après 5 jours. (B) Analyse en western blot de la cinétique d'expression des protéines virales IE1 et IE2, de LC3B endogène et de ZsGreen-LC3B (EBSS pour *Earle's Balanced Salt Solution*). (C) Images représentatives de la lignée ZsGreen-LC3B *mock*, traitée à l'EBSS ou infectée par HCMV à MOI 0,5 pendant 5 jours. Le vAC est marqué par la protéine virale gB. Les noyaux sont marqués au DAPI. La barre d'échelle = 20µm.

MATERIELS ET METHODES de la Figure 26

ETABLISSEMENT DE LA LIGNEE CELLULAIRE

Une monocouche de cellules HFF a été transduite à l'aide d'un vecteur lentiviral fabriqué à partir du plasmide pLVX-ZsGreen1 fusionné à la séquence protéique LC3B fourni par le laboratoire de Clarisse

Berlioz-Torrent [Institut Cochin, Paris, France] (non publié) (HFF zsgreen-LC3B). Les cellules sont ensuite sélectionnées par ajout de 5µg/mL de puromycine puis amplifiées. La lignée a été sous-clonée pour obtenir une population cellulaire homogène. Les cellules sont diluées pour obtenir environ 30 à 50 cellules/mL soit 3 à 5 cellules dans un puits de plaque 96 puits. Le milieu est régulièrement renouvelé et les cellules sont ensuite amplifiées sous pression de sélection.

L'induction de l'autophagie par la carence nutritive se fait en ajoutant de l'EBSS pendant 4h sur les cellules.

Conclusions et perspectives

L'autophagie, une source de membranes pour l'enveloppe du HCMV.

Au cours de ce travail, nous avons cherché à définir le rôle de l'autophagie sur la multiplication du HCMV. Pour cela, nous avons mis au point différentes lignées stables déficientes pour des protéines autophagiques telles que LC3B, ATG5, BECN1 et ULK1, une lignée stable exprimant le dominant négatif de la protéase ATG4B ainsi qu'une lignée stable KO pour la protéine autophagique ATG5. L'infection de ces lignées cellulaires par HCMV entraîne une diminution significative mais n'abolit pas complètement la multiplication virale. Ces résultats confirment le rôle bénéfique de l'autophagie sur la multiplication du virus, et suggèrent qu'elle n'est pas indispensable mais optimise la production du HCMV. C'est pourquoi nous avons ensuite regardé l'impact de la déficience en autophagie sur les différentes étapes clés du cycle de HCMV. L'infection des six lignées stables n'impacte ni l'entrée de HCMV, ni l'expression des protéines virales, ni la réplication du génome, ni la sortie du virus dans le milieu extracellulaire. La morphologie du compartiment d'assemblage viral (vAC) n'est pas impactée dans ces différentes lignées. Afin d'aller plus loin, nous avons étudié la localisation des protéines autophagiques dans le cytoplasme des cellules HFF WT. Nous avons mis en évidence que les membres de la famille LC3 : LC3B, GABARAPL1, GABARAPL2/GATE-16 ainsi que les protéines ATG5, BECN1 et p62 s'accumulent au vAC. Les membres de la famille LC3 sont lipidés et associés à des membranes suggérant que des autophagosomes s'accumulent au niveau du vAC dans le cytoplasme des cellules infectées par HCMV. De plus, l'ensemble de ces protéines sont associées aux particules virales extracellulaires purifiées. Ce travail montre que la machinerie autophagique est utilisée lors de l'enveloppement du HCMV. Il est décrit que dans des cellules déficientes pour les protéines ATG impliquées dans le système de conjugaison, les autophagosomes sont toujours formés (S. Arakawa et al., 2017; Tsuboyama et al., 2016). Dans ces cellules, les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes mais la dégradation de la membrane interne est retardée due à l'absence de LC3-II (Tsuboyama et al., 2016). De manière similaire, dans les cellules HFF CRISPR ATG5 que nous avons générées, nous observons par MET des petits autophagosomes dans le cytoplasme des cellules infectées, ce qui pourrait expliquer pourquoi le cycle viral reste complet. Cependant, il est possible que la structure ou la composition de ces autophagosomes soit différente. D'après la littérature, l'origine de l'enveloppe du HCMV pourrait être très diverse, elle pourrait provenir de l'appareil de Golgi, des sites de contact de RE ou du RE lui-même, du TGN ou encore du système endosomal, tout comme l'origine des membranes autophagiques.

Dans ce manuscrit, je me suis focalisée sur le détournement des membranes autophagiques par les virus et sur le fait que le phagophore, l'autophagosome et l'autolysosome sont créés à partir de fusion de vésicules et d'extrusion des membranes d'organites cellulaires. En effet le terme « membranes autophagiques » regroupe l'ensemble des membranes cellulaires ayant comme marqueurs des protéines autophagiques. Lors de l'infection, par le HCMV, la cellule subit d'importants changements morphologiques (impactant les organites, le noyau et la forme de la cellule), mais aussi énergétiques et métaboliques (Munger et al., 2006). L'identité des organites provient de leur composition moléculaire (en protéines, en lipides, etc.), de leur structure, de leur localisation dans la cellule mais aussi de leur(s) fonction(s) biologique(s). Il est proposé par différents auteurs que l'infection par HCMV induit un changement d'identité des organites (Subhendu Das & Pellett, 2011; Jean Beltran et al., 2016). Effectivement, le virus affecte leur localisation, leur structure (comme leur forme ou leur taille), leur composition ou encore leur quantité mais pas leur fonction principale. Par exemple, la distribution des marqueurs de la machinerie sécrétoire et endosomale entre les cellules non infectées et infectées par le HCMV est très différente (Subhendu Das & Pellett, 2011). Des études mettent en évidence la présence des marqueurs du TGN, de l'appareil de Golgi ainsi que des marqueurs endosomaux dans les particules virales (Cepeda et al., 2010; Homman-Loudiyi et al., 2003). Il est intéressant de noter que dans les résultats complémentaires d'une étude de protéomique faite sur les cellules infectées par HCMV, une protéine de CMA, ainsi que les protéines ATG9, p62/SQSTM1, GABARAPL1 et LC3B sont modulées lors de l'infection (Jean Beltran et al., 2016). Les auteurs de cette étude ont choisi de se focaliser sur les marqueurs des organites, tels que les mitochondries, le RE, l'appareil de Golgi, les lysosomes, les peroxysomes, le noyau ou encore la membrane plasmique mais pas sur les marqueurs autophagiques. Ils expliquent que les différentes étapes de centrifugation n'ont pas permis de distinguer de façon optimale l'ensemble des protéines cytosoliques. Comme ces résultats concernant les protéines autophagiques sont en adéquation avec ceux que nous avons obtenus dans notre propre étude, il serait intéressant d'approfondir cette analyse sur les marqueurs autophagiques.

Quelle est la proportion de HCMV associés à des protéines autophagiques ?

Les virus sont des organismes parasites, c'est-à-dire, qu'ils utilisent les protéines, complexes ou organites déjà présents dans la cellule à leur profit. Bien souvent, la définition d'un agent pathogène adapté à son hôte, est un microorganisme capable de se multiplier de

façon rapide avec un bon rendement sans causer la mort de son hôte pour pouvoir être transmis. L'hypothèse que nous faisons au laboratoire, est que le HCMV utilise les membranes autophagiques pour s'envelopper mais que toutes les particules virales n'ont pas la même composition en protéines autophagiques. Cette hypothèse est basée sur le fait que dans les cellules déficientes en gènes ou en protéines de l'autophagie, les autophagosomes sont toujours présents et des virus infectieux sont toujours produits. Une étude en MET par immuno-marquage a été réalisée pour le VZV, qui décrit que sur 142 particules virales, 80% sont marquées pour la glycoprotéine d'enveloppe gE, 50% pour la protéine cellulaire RAB11, et 30% pour la protéine LC3B (Buckingham et al., 2016). Cette étude suggère que les protéines RAB11 et LC3B optimisent la formation de particules virales, et que d'autres protéines peuvent être utilisées pour l'enveloppement du VZV. Pour répondre à notre hypothèse de départ, nous sommes actuellement en train de mettre au point deux techniques de microscopie à super résolution : une technique de MET en immuno-marquage dans des cellules infectées, et une technique de microscopie immunofluorescence basée sur la reconstruction optique stochastique direct (dSTORM) sur des particules virales purifiées. Ces deux techniques permettraient d'estimer la proportion de virus associés ou non à des protéines autophagiques dans la particule virale. En complément, cette technique nous permettra de préciser leur localisation au sein des particules, notamment si ces protéines sont présentes dans la membrane ou dans le tégument par exemple.

Les protéines autophagiques associées aux particules du HCMV jouent un rôle dans les étapes précoces du cycle viral, lors de la réinfection des cellules

L'étude de la composition des particules purifiées de HCMV produites dans le surnageant des cellules HFF WT a montré que la protéine ATG5 s'accumulait lors de l'infection des cellules et cette protéine est présente dans les particules virales après purification. C'est pourquoi, nous avons spécifiquement étudié le rôle de la protéine ATG5 sur la multiplication de HCMV. Nous avons mis en évidence que les protéines LC3B-II et GABARAPL1-II étaient également associées aux particules virales. C'est pourquoi, nous avons trouvé judicieux de cibler, dans un premier temps, l'extinction de la protéine ATG5 et donc son activité dans la lipidation des LC3. Au cours de ce travail, nous avons montré que les virus produits dans des cellules HFF CRISPR ATG5 (HCMV « atg5ko ») n'étaient pas significativement moins stables que des virus produits dans des fibroblastes WT (HCMV (wt)). Cependant, les virus HCMV « atg5ko » sont 3 fois moins infectieux que les HCMV wt.

Notre hypothèse est que l'expression et l'activité de la protéine ATG5 dans les cellules infectées participent à la transmission des virus d'une cellule à l'autre.

Lors de l'étude de la cinétique de HCMV (wt) et HCMV « atg5ko » dans les cellules contrôles et HFF CRISPR ATG5 nous avons mis en évidence que le défaut d'infectivité du virus n'est pas restauré lors d'une réinfection des cellules WT (Figure 23A et 25AB). Nous avons montré qu'après infection des cellules HFF CRISPR ATG5 par le HCMV (wt), les titres viraux obtenus sont plus faibles que ceux des cellules contrôles. Ce premier résultat confirme que l'absence de la protéine ATG5 entraîne un défaut dans la production de virus. Dans un second temps, l'infection des cellules WT ou des cellules HFF CRISPR ATG5 par le virus HCMV « atg5ko » produit la même quantité de virus infectieux (Figure 25B). Ce qui veut dire que lorsque la protéine ATG5 est présente dans les cellules, elle n'est pas suffisante pour restaurer le cycle viral qui reste perturbé. Plusieurs hypothèses sont possibles 1) le HCMV contient un composant qui active un mécanisme important (pas forcément l'autophagie) pour le bon déroulement du cycle viral peu de temps après son entrée dans la cellule. Ce composant n'est pas incorporé dans la particule virale lorsque l'infection se fait dans des cellules HFF CRISPR ATG5 ; 2) Le HCMV « atg5ko » entre moins bien dans les cellules. La technique utilisée pour déterminer les titres viraux prend déjà en compte le fait que les virus produits sont moins infectieux. En effet, les virus produits dans le surnageant des cellules infectées sont utilisés pour infecter des cellules WT pendant 2 jours et le titre est déterminé par immunohistochimie. Pour autant, nous pourrions étudier l'entrée du HCMV « atg5ko » dans les cellules en quantifiant le nombre de cellules exprimant pp65, comme nous l'avons précédemment fait pour les lignées exprimant un shARN contre les protéines autophagiques.

Afin de répondre aux différentes hypothèses, il est fondamental de purifier le HCMV « atg5ko » pour étudier la composition de la particule virale, notamment la présence des protéines autophagiques ainsi que sa morphologie. De plus, les protéines LC3B-II et GABARAPL1-II étant retrouvées associées aux particules virales, il serait donc très intéressant de réaliser les mêmes expériences avec des virus produits dans les cellules shLC3B ou exprimant le dominant négatif ATG4B C74A. De cette façon, nous pourrions déterminer si le défaut d'infectivité est lié à la protéine ATG5 ou plus généralement à la lipodation des LC3.

Au cours de ce travail, nous avons aussi mis en évidence la formation précoce d'un pré-compartiment d'assemblage viral (prAC), caractérisé par l'accumulation de LC3 dans une région proche du noyau, ainsi qu'un changement morphologique de l'appareil de Golgi

(visualisé par la protéine GM130) dès 10 hpi. A ce jour, les résultats ont montré qu'un (ou plusieurs) composant(s) des particules virales permettrai(en)t d'induire l'autophagie dès l'entrée du HCMV. En effet, l'exposition des cellules au HCMV inactivé par un traitement UV, déclenche une stimulation importante de l'autophagie et une accumulation de LC3B-II dans les fibroblastes (Mouna et al., 2016). Une étude réalisée par le laboratoire et non publiée, avait suggéré que la liaison du HCMV aux récepteurs TLR2 stimulait l'autophagie. L'activation de la voie TLR2 est en effet connue pour stimuler l'autophagie (Delgado et al., 2008). Cette étude n'ayant pas été poursuivie au laboratoire, une autre hypothèse serait qu'ATG5 et/ou les LC3-II fassent partie de ces composants inducteurs de l'autophagie. Pour répondre à cette hypothèse, nous envisageons d'étudier par vidéo microscopie la mise en place du prAC dans les lignées cellulaires stable HFF ZsGreen-LC3B, infectées soit par des virus sauvages soit par des virus produits dans les cellules déficientes en autophagie. Si notre hypothèse est exacte, les virus produits dans ces cellules déficientes ne seraient plus capables de stimuler précocement l'autophagie ni de former le prAC, contrairement au virus sauvage.

L'expression de la protéine ATG5 pourrait réguler un métabolisme inconnu lors de l'infection par HCMV

Nous avons étudié l'ultrastructure des cellules CRISPR ATG5 infectées par HCMV en analysant en parallèle les cellules par immunofluorescence et en lumière blanche, mais pour le moment nous n'avons pas réussi à identifier de façon exacte l'ensemble des structures atypiques observées dans ces cellules.

Dans le noyau des cellules CRISPR ATG5, nous observons des structures délimitées par des membranes, comprenant des repliements membranaires ainsi que des particules virales matures, que nous n'observons pas dans les cellules HFF WT. Des structures de ce type dans des cellules infectées par HCMV sont pourtant décrites dans un article de 2015 (Villinger et al., 2015). Cet article montre en effet que les particules virales s'accumulent dans des structures tubulaires dans le noyau de fibroblastes humains. Ces structures seraient des repliements de la membrane nucléaire interne, dans lesquelles les virus s'enveloppent une première fois pour traverser les membranes nucléaires et atteindre le cytoplasme. La seule différence entre ces deux études, est qu'ils n'utilisent pas un virus sauvage mais un virus issu du clone viral TB40-BAC4, obtenu par génétique à partir d'un BACmide (chromosome artificiel bactérien) (Christian Sinzger et al., 2008). Cette souche virale possède des délétions

de certains gènes dans son génome lié à sa fabrication qui pourraient accentuer son accumulation dans l'espace périnucléaire.

En lumière blanche, des vésicules réfringentes sont observées dans le cytoplasme des cellules HFF WT et HFF CRISPR ATG5 correspondant pour certaines à des vésicules délimitées par la protéine virale pp28. De telles vésicules dans les cellules infectées par HCMV ont déjà été décrites dans la littérature (Seo & Britt, 2006, 2007, 2008). Il a été montré que la protéine virale vMIA (pUL37x1) exprimée au cours de l'infection par HCMV entraîne un efflux de calcium du RE vers le cytosol, entraînant l'ancrage de la protéine kinase $\text{C}\alpha$ (PKC α) à la membrane plasmique et son activation (Sharon-Friling et al., 2006). La PKC α participe à la réorganisation du cytosquelette et son activité induit la formation de vésicules allant de 0,5 à 5 μm dans les fibroblastes infectés (Sharon-Friling & Shenk, 2014). D'après cette étude, la formation de ces vésicules est corrélée à l'activation de la synthèse des acides gras saturés ou encore du phosphatidylinositol-3-phosphate. Au cours de ce travail, nous avons confirmé la présence ainsi que l'échelle de taille de ces vésicules dans les HFF WT. Nous avons étudié ces vésicules dans les cellules CRISPR ATG5 qui sont 2 fois plus grandes dans ces cellules.

Une étude a mis en évidence que l'autophagie régule le stockage des lipides dans les hépatocytes et que la quantité de triglycérides augmentait dans des fibroblastes ATG5^{-/-} (Singh et al., 2009). Nous avons donc regardé le marquage des gouttelettes lipidiques (LD pour *Lipid droplet*) en utilisant la sonde BODIPY dans les cellules CRISPR ATG5 infectées par le HCMV. La sonde BODIPY que nous utilisons reconnaît spécifiquement les lipides neutres ou les lipides non polaires présents dans les LD (comme les triglycérides). Dans les cellules HFF, le marquage BODIPY montre un très fort recrutement des lipides au niveau du vAC ainsi qu'une colocalisation partielle avec pp28. De façon surprenante, le marquage ne se présente pas sous forme de dots (correspondant aux LD) comme habituellement observé avec cette sonde. Ce résultat suggère que des triglycérides s'accumulent au niveau des vésicules marquées par pp28, mais pas sous forme de LD et dont le contenu reste encore à élucider. Une autre étude, n'ayant pas de lien direct, montre que lorsque les fibroblastes infectés par HCMV sont traités avec la molécule dynasore, on observe des vésicules cytoplasmiques, entourées de clathrine contenant parfois la protéine virale pp150 (Archer et al., 2017). La taille des vésicules observées n'est pas indiquée sur les clichés d'immunofluorescence de cette étude, mais ces structures semblent similaires aux vésicules décrites précédemment. La molécule dynasore est décrite dans cet article comme un inhibiteur de la dynamine, capable de bloquer

l'endocytose médiée par la clathrine. Cependant, un autre article explique que le dynasore réduit aussi le cholestérol au sein de la membrane plasmique et perturbe les radeaux lipidiques indépendamment de la dynamine (Preta et al., 2015).

Afin d'étudier de façon plus approfondie les structures présentes dans ces cellules CRISPR ATG5 et de s'affranchir de la technique de préparation des échantillons en résine, nous avons établi une collaboration avec le laboratoire allemand du Dr. Jens von Einem. Ce laboratoire utilise une technique de microscopie électronique à balayage à faisceau d'ions focalisé (FIB/SEM), après fixation par congélation à haute pression. Ils étudieront par FIB/SEM la morphologie des cellules CRISPR ATG5 infectées par HCMV.

L'ensemble de ces données suggèrent que le métabolisme lipidique ait un lien dans la formation de ces vésicules cytoplasmiques dans les cellules infectées par HCMV. Il serait intéressant de regarder la composition lipidique des particules virales et des membranes autophagiques pour expliquer s'il y a un lien favorisant l'infectiosité des virus.

Rôle de l'autophagie dans la physiopathologie du HCMV.

Le HCMV est un virus adapté à son hôte car il a développé de nombreuses stratégies pour contrecarrer les défenses immunitaires. Sa prévalence est d'environ 70% dans la population mondiale, suivant la localisation géographique et du statut économique. En général, l'infection est asymptomatique sauf chez les patients immunodéprimés ou pour les fœtus de mères infectées. En effet, dans ce manuscrit j'ai beaucoup parlé du détournement des défenses cellulaires par le HCMV ou par les virus en général, mais le système immunitaire étant très efficace, les virus moins adaptés sont très souvent éliminés. Certains virus comme les virus à ARN, subissent des mutations très régulières permettant la sélection de descendants plus résistants capables de surmonter les défenses de l'organisme hôte. D'autres, comme les Herpesvirus, peuvent entrer en latence et persister à vie dans l'organisme jusqu'à ce que l'environnement soit propice à la réactivation et donc à leur multiplication c'est-à-dire, lorsque le système immunitaire est affaibli.

Au cours de ma thèse, nous avons collaboré sur un projet en parallèle pour étudier le rôle de l'autophagie sur la physiopathologie du HCMV (annexe). Le HCMV étant responsable d'infections graves lors des transplantations rénales, nous avons choisi d'utiliser comme modèle cellulaire les cellules tubulaires rénales HK-2. Les cellules HK2 ont été infectées en utilisant la souche virale TB40/E et l'impact de l'infection sur l'autophagie a été étudié. L'autophagie induite par le flux urinaire étant nécessaire pour réguler le volume des cellules

rénales, l'hypothèse de ce travail était que le changement morphologique des cellules infectées par HCMV (cytomégalie) soit corrélé avec le processus autophagique (Orhon et al., 2016). Dans cette étude, nous avons d'abord évalué si les cellules HK-2 était un bon modèle pour étudier la physiopathologie du HCMV ainsi que la modulation de l'autophagie par la souche TB40/E. L'autophagie est légèrement modulée dans les cellules HK-2, certainement dû au cycle incomplet du virus dans ce modèle cellulaire. L'hypothèse serait que le virus n'exprime pas les protéines ayant un rôle dans la modulation de l'autophagie, comme IRS1 ou TRS1. En revanche, nous continuons d'observer l'augmentation du volume des cellules après l'infection par HCMV. Ce travail est une étude préliminaire et relève l'importance et la complexité de l'étude physiologique des cellules infectées par le HCMV. De plus, il serait intéressant de savoir si les phénotypes observés en culture sont relevant en condition physiologique.

Annexe



Human Cytomegalovirus Inhibits Autophagy of Renal Tubular Epithelial Cells and Promotes Cellular Enlargement

Ana C. López Giuliani^{1,2}, Eva Hernández³, María J. Tohmé^{1,4}, Clémence Taisne³, Julieta S. Roldán⁵, Clara García Samartino⁶, Marion Lussignol³, Patrice Codogno^{7,8}, María I. Colombo^{1,6}, Audrey Esclatine^{3*} and Laura R. Delgui^{1,2*}

¹ Facultad de Ciencias Médicas, IHEM, Universidad Nacional de Cuyo, CONICET, Mendoza, Argentina, ² Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina, ³ Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Gif-sur-Yvette, France, ⁴ Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Juan Agustín Maza, Mendoza, Argentina, ⁵ Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIBIO), Universidad de San Martín, Buenos Aires, Argentina, ⁶ Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina, ⁷ Institut Necker-Enfants Malades (INEM), INSERM U1151-CNRS UMR 8253, Paris, France, ⁸ The Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Michael Nevels,
University of St Andrews,
United Kingdom

Reviewed by:

Eleonore Ostermann,
Leibniz-Institut für Experimentelle
Virologie, Germany
Zhilong Yang,
Kansas State University, United States

*Correspondence:

Laura R. Delgui
ldelgui@mendoza-conicet.gob.ar
Audrey Esclatine
audrey.esclatine@u-psud.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Virus and Host,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and Infection
Microbiology

Received: 19 January 2020

Accepted: 31 July 2020

Published: 15 September 2020

Citation:

López Giuliani AC, Hernández E, Tohmé MJ, Taisne C, Roldán JS, García Samartino C, Lussignol M, Codogno P, Colombo MI, Esclatine A and Delgui LR (2020) Human Cytomegalovirus Inhibits Autophagy of Renal Tubular Epithelial Cells and Promotes Cellular Enlargement. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:474. doi: 10.3389/fcimb.2020.00474

Human Cytomegalovirus (HCMV) is a frequent opportunistic pathogen in immunosuppressed patients, which can be involved in kidney allograft dysfunction and rejection. In order to study the pathophysiology of HCMV renal diseases, we concentrated on the impact of HCMV infection on human renal tubular epithelial HK-2 cells. Our aim was to develop a model of infection of HK-2 cells by using the viral strain TB40/E, that contains the extended cell tropism of clinical isolates and the efficient viral multiplication in cell culture of laboratory-adapted strains. We observed that HK-2 cells can be infected by HCMV and expressed viral antigens, but they do not produce extracellular viral particles. We then studied the interplay of HCMV with ciliogenesis and autophagy. Primary cilium (PC) is a stress sensor important to maintain renal tissue homeostasis that projects from the apical side into the lumen of tubule cells. PC formation and length were not modified by HCMV infection. Autophagy, another stress response process critically required for normal kidney functions, was inhibited by HCMV in HK-2 cells with a reduction in the autophagic flux. HCMV classically induces an enlargement of infected cells *in vivo* and *in vitro*, and we observed that HCMV infection led to an enlargement of the HK-2 cell volume. Our results constitute therefore an excellent starting point to further explore the role of these mechanisms in renal cells dysfunction.

Keywords: human cytomegalovirus, renal cells, autophagy, primary cilium, cellular size, cytomegaly, cytopathic effect, polarization

INTRODUCTION

HCMV is a ubiquitous double-stranded DNA virus belonging to the *Herpesviridae* family. Its name is derived from the observed enlargement of the infected cell (cytomegaly) (Mocarski et al., 2001). Like other viruses of this family, after primary infection it establishes a latent infection within the host, with a possibility of reactivation. Its prevalence is high in the human population

(almost 100% of the adults in developing countries have antibodies against HCMV). In healthful individuals, primary infection is oftentimes asymptomatic and then a persistent infection developed, managed by the host immune system (Boeckh, 2011). Even though, HCMV is a major cause of morbidity and mortality in individuals with impaired immune systems. Transplant patients receiving immunosuppressive chemotherapy are at an increased risk of active HCMV infection and disease. As a result, despite antiviral preventive strategies, HCMV infection is an important complication in individuals receiving solid organ transplants, including kidney recipients (Carney, 2013). Kidney transplant is the most common organ transplant surgeries performed nowadays and HCMV infection is a regular complication, which usually appears during the first year after renal transplantation, notably when a seronegative allograft recipient receives a kidney from a HCMV seropositive donor (Morgantetti et al., 2019). The effect of HCMV on the destiny of solid organ transplantation is significant, not only causing grave and potentially lethal illness, but also promoting allograft rejection, additional opportunistic infections, post-transplant lymphoproliferative disorders, vascular disease, and the entire patient and allograft survival (Razonable and Humar, 2013).

HCMV infection has direct and indirect effects on the patient and the graft (López-Oliva et al., 2017). The direct effects of HCMV are associated with viral replication and HCMV infection/disease. HCMV is well-known to cause tubulointerstitial nephritis with cytopathic changes in the tubular epithelial cells and endothelial cells of peritubular capillaries (Rane et al., 2012). HCMV glomerulopathy and associated kidney dysfunction may occur despite prophylactic therapy. The indirect effects have been associated with increased morbidity (opportunistic infections such as *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and invasive aspergillosis), graft loss and long-term mortality.

We have been working for several years on the characterization of the interplay between HCMV and autophagy (Chaumorcel et al., 2008, 2012; Mouna et al., 2016; Taisne et al., 2019). Autophagy is a conserved cellular pathway involved in cellular homeostasis maintenance and in cell survival in response to stress. It constitutes a catabolic process through the lysosomal pathway, leading to the degradation of long-lived proteins and damaged organelles. In this article, we focused on macroautophagy (hereafter referred as autophagy) during which, a phagophore forms and sequesters cytoplasmic constituents, including organelles. Then, the edges of the phagophore fuse to form the autophagosome, a double membrane vesicle. The autophagosome undergoes fusion with a lysosome to form an autolysosome, where degradation occurs. This whole process is tightly regulated (Esclatine et al., 2009). Briefly, under starvation, a classical inducer of autophagy, a protein complex localized at the forming phagophore is responsible for the production of phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P), necessary for vesicle growth. This complex is mainly formed by ATG14, BECLIN 1 and VPS34 proteins. The phagophore then elongates to fuse from both extremities forming the autophagosome, which matures along the endocytic pathway, finally fusing with a lysosome to

generate a degradative autolysosome. The cytoprotective role of autophagy has been well-documented in different non-infectious nephropathies, although the precise mechanism of autophagy on kidney fibrosis remains elusive (Huber et al., 2012; Kaushal and Shah, 2016). Various harmful stimuli such as renal ischemia-reperfusion (I/R), sepsis, or exposure to nephrotoxins lead to nutrient depletion and oxidative stress-dependent activation of autophagy (Sureshbabu et al., 2015). Accumulating evidence in various rodent models, such as I/R-induced, sepsis/endotoxemia-induced, and nephrotoxin-induced acute kidney injury, strongly suggest that autophagy generally protects the kidney from injury, though contrasting findings have also been reported (Choi, 2019). Interestingly, it has been demonstrated that autophagy can be induced in epithelial cells by primary cilium (PC) activation triggered by fluid flow (Orhon et al., 2016b; Zemirli et al., 2019). This activating pathway notably regulates epithelial cell size. We and others have previously shown that HCMV infection of human fibroblasts modulates autophagy and we recently demonstrated that HCMV can block autophagosome maturation in order to subvert the autophagic machinery to its own profit (Mouna et al., 2016; Taisne et al., 2019). However, it has been reported that modulation of autophagy by viruses can be cell-type dependent.

We thus explored whether HCMV can modulate autophagy in renal epithelial cells and whether this regulation could contribute to renal physiopathology in the context of HCMV infection during kidney transplantation. We have specifically chosen to work with HK-2 cells, an immortalized human cell line, because HCMV only infects human cells and HK-2 cells retain functional characteristics of proximal tubular epithelium (Ryan et al., 1994). We observed that HK-2 cells are permissive to HCMV, although they do not produce extracellular viral particles. In this report, we have approached the impact of HCMV on ciliogenesis, autophagy, and cell volume of HK-2 cells.

MATERIALS AND METHODS

Cells and Viruses

MRC-5 primary human embryonic lung fibroblasts were purchased from Biomérieux and employed between passages 23 and 28 post-isolation. MRC-5 cells were grown in minimum essential medium (MEM) (Gibco, 21090-055) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco, 10270-106), penicillin G (100 U/ml), streptomycin sulfate (100 µg/ml), l-glutamine (1%), and non-essential amino acids (1%). Immortalized human epithelial kidney HK-2 cells, provided by Fabiola Terzi (INEM, Paris), were maintained in DMEM supplemented with 10% FCS, penicillin G (100 U/ml), streptomycin sulfate (100 µg/ml), EGF (Sigma, E9644), hydrocortisone (Sigma, H0135), T3 (Sigma, T5516) and ITS (Sigma, I3146). Human epithelial cervix cancer (HeLa, ATCC CCL-2) cell line was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (ThermoFisher Scientific, 12-800058) containing 10% FCS (Gibco, 10270-106). The culture media was supplemented with penicillin/streptomycin (10,000 U/ml; ThermoFisher Scientific, 15140122). The three cell lines were grown at 37°C and under a 5% CO₂ atmosphere. HCMV AD169 strain was purchased from ATCC and propagated in MRC-5

cells as described (Esclatine et al., 2001). HCMV TB40/E strain was gently provided by Christian Sinzger (Institute for Virology, Ulm University Medical Center) and was propagated in HUVEC cells and then amplified in MRC-5 cells (Sinzger et al., 1999). Experiments were performed in the context of Biosafety Level 2 laboratory.

Autophagy Modulation

All autophagic parameters and treatments were performed as described (Mouna et al., 2016). Briefly, starvation-induced autophagy was carried out by culturing the cells in Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) (Gibco, 24010-045) for 4 h before fixation or lysis. Where indicated, cells were treated with Spautin-1 (20 μ M, Sigma-Aldrich, M9281). To inhibit autophagic flux, cells were treated for the indicated times with chloroquine (CQ) (50 μ M, Sigma-Aldrich, C6628).

Antibodies

To identify HCMV-infected cells, we used mouse monoclonal antibodies against the viral proteins IE1 and IE2 (clone E13; Biomérieux, 11-003). Additional primary antibodies used included anti-ZO-1 (Zonula Occludens) (provided by Isabelle Beau, Inserm UMR-S 1185, Le Kremlin Bicêtre, France), anti- γ -tubulin (Santa Cruz Biotechnology, sc-10732), anti-acetylated tubulin (Sigma-Aldrich, T7451), anti-LC3 (MBL-PM036), anti-LC3B (Sigma L7543, used for immunoblot analysis), anti- β -actin (Merck Millipore MAB1501 clone C4) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen, D1306). Secondary antibodies included Alexa Fluor 555 goat anti-mouse and anti-rabbit (Life technology, A21424 – A21428), Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit and anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, 111-545-003 and 115-545-003), Alexa Fluor 647 donkey anti-mouse (life technology, A32787). Horseradish peroxidase (HRP)-labeled goat anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (115-035-003, 111-035-003).

HCMV Infection and Titration

HCMV suspended in serum-free medium, or serum-free medium alone (mock-infected) was adsorbed onto cells for 1 h at 37°C at a multiplicity of infection (MOI) of 1. After removing the inoculum, the cells were cultured in medium containing 10% FCS and processed for the different assays at the indicated times post-infection (p.i.). For viral production analysis, viruses were adsorbed onto cells for 1 h at 37°C. After removal of the inoculum, infection was synchronized using citrate buffer (40 mM citric acid, 10 mM KCl, 135 mM NaCl, pH = 3) to inactivate non-internalized viruses. At the indicated times, viruses were collected from cell-free supernatants and quantified as previously described (Mouna et al., 2016).

Immunoblot Analysis

HK-2 and MRC-5 cells were lysed in 65 mM Tris, pH 6.8, 4% SDS, 1.5% β -mercaptoethanol, and incubated at 100°C for 5 min. Proteins extracts were resolved on SDS-PAGE gels (12.5%) and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Perkin Elmer). Membranes were blocked and probed with

primary antibodies overnight. HRP-labeled antibodies were used as a secondary antibody, revealed using the ECL detection system following the manufacturer's instructions (Immobilon, Millipore) and anti-actin was used to verify equal loadings. Quantification of protein levels was performed using Photoshop CS5 software (Adobe systems).

Immunofluorescence Analysis

Cell monolayers were washed with phosphate buffered saline (PBS), fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized using 0.05% Saponin in PBS, incubated for 1 h in PBS supplemented with 5% of goat serum for blocking, and then with the appropriate primary antibodies. The cells were washed 3 times in PBS Tween 20 0.1%, and then incubated with appropriate secondary antibodies. Coverslips were mounted in Glycergel (Dako, C0563) and examined using a Zeiss Axiovert 200 M epifluorescence microscope (Zeiss instruments) or a Zeiss ApoTome 2 microscope piloted with Zen software 2012 or with a confocal Leica TCS SP5 (LAS AF version 2.6.0; laser wavelengths 488 nm, 561 nm and 633 nm) (SFR Necker, Cell Imaging Platform). Images were resized, organized, and labeled using Photoshop software.

Quantification and Statistical Analysis

The number of endogenous LC3-positive dots per cell was established using ImageJ software. Images were converted into 8-bit and brightness/contrast adjusted to increase the accuracy of the count. A thresholding of images was performed to detect only LC3 vesicles. Finally, the "analyse particles" plug-in was used to quantify the number of LC3-positive dots per cell. For each condition, at least 25 cells were analyzed in three independent experiments.

The mean cell volume was calculated employing Imaris software 1.47n (NIH). We used over-saturated LC3 stained images to observe the complete cell and a Zeiss ApoTome 2 microscope to acquire the z-stack images of the cells in different visual fields of the μ -slide. Data came out from three independent experiments with 25 counted cells in 5 different visual fields for each experiment. 3D reconstruction images were modeled using Imaris Software and number of ciliated cells and the length of cilia were quantified using the same software. For PC lengths distribution analysis, we established two intervals of lengths (0–1.15 and 1.16–12 μ m), and quantified the number of PCs, out of 150 total structures, in each interval.

Data are expressed as means \pm standard error (SE) and were analyzed with Infostat program by using Student's *t*-test or two-tailed analysis of variance (ANOVA) with Tukey's test contrast. *P* < 0.05 were considered statistically significant. Experiments were performed a minimum of three times.

Flow Cytometry Analysis

HeLa cells were treated with CQ 50 μ M, or left in control condition, for 4 h before direct analysis of the cells. These assays were performed by using the FACSARIA-III (BD Biosciences) equipped with 488 nm and 633 nm lasers from the Flow Cytometry Facility of the "Facultad de Ciencias Médicas,

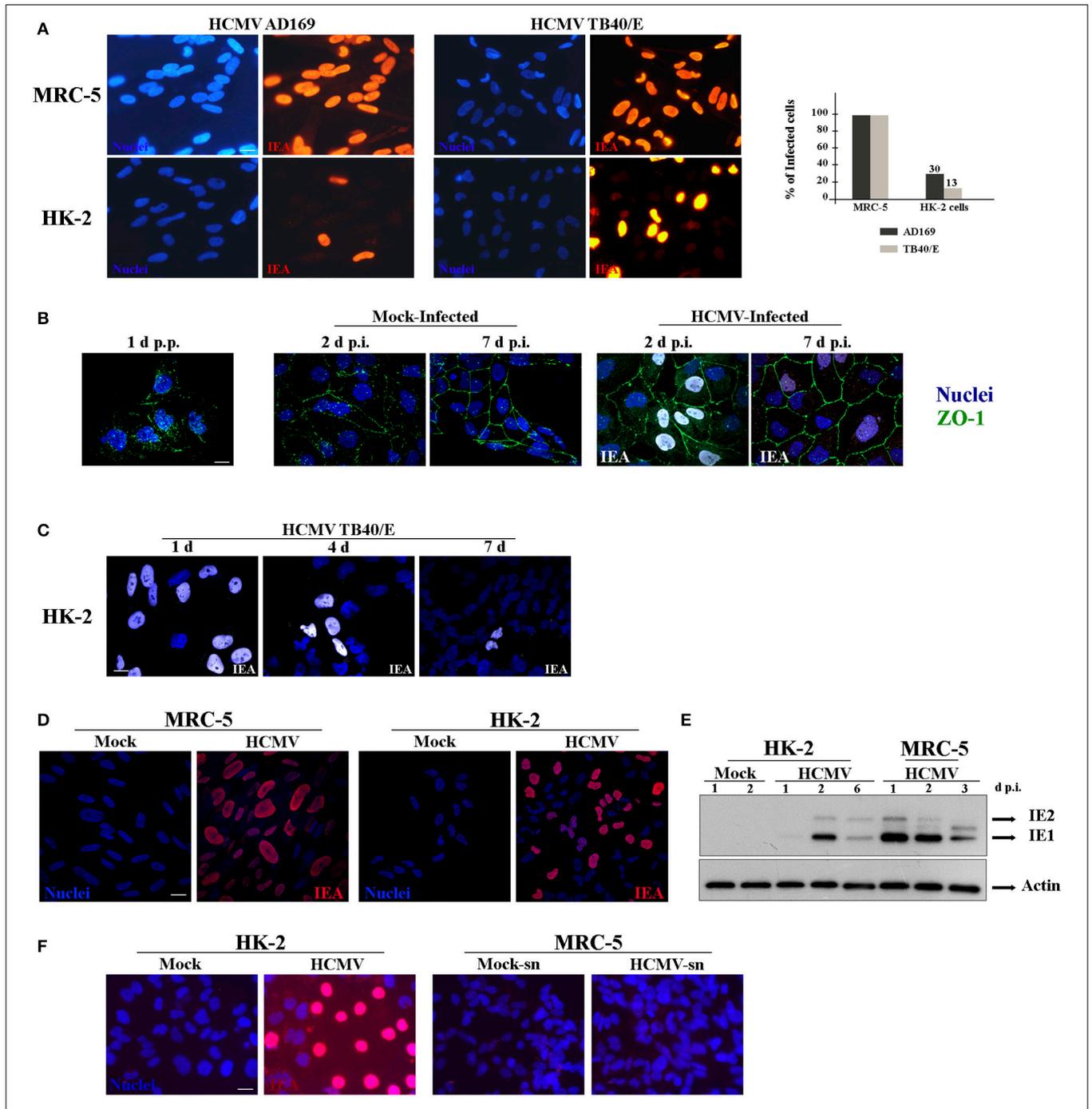


FIGURE 1 | Characterization of infection of HK-2 cells by HCMV. **(A)** Representative images of MRC-5 and HK-2 cells infected with HCMV at MOI 1 during 48 h and immunostained for IEA (immediate-early viral antigens, in red). Two different strains, AD169 and TB40/E, were tested. Nuclei were subsequently stained with DAPI. **(B)** Representative images of HK-2 cells infected with HCMV or mock-infected for 2 or 7 days, and immunostained for IEA (in white) and ZO-1 (in green) to visualize cell polarization. Lack of polarization of HK-2 cells 24 h post plating (p.p.) is depicted (left panel). **(C)** Representative images of HK-2 cells infected with HCMV at MOI 1 at different times p.p. (1 to 7 days) and immunostained for IEA (white) and the nucleus. **(D)** Confocal images of MRC-5 and HK-2 cells infected with HCMV for 24 h and immunostained for IEA (red) and the nucleus. **(E)** Immunoblot analysis of IE1 and IE2 after HCMV infection at MOI 1 of MRC-5 or HK-2 cell lines at 1, 2, 3, or 6 days post infection (d p.i.). Actin was used as a loading control. **(F)** Representative images of HK-2 cells infected with HCMV for 7 days and immunostained for IEA (left panels). The non-diluted supernatants from infected (HCMV-sn) or from mock-infected HK-2 cells were tested on MRC5 cells in order to detect viral production by IEA expression (right panels). Scale bars = 10 μ m. Three independent experiments were performed and statistical analysis was achieved as explained in the materials and methods section.

Universidad Nacional de Cuyo" (Argentina). Data was analyzed using FlowJo 7.6 software.

RESULTS

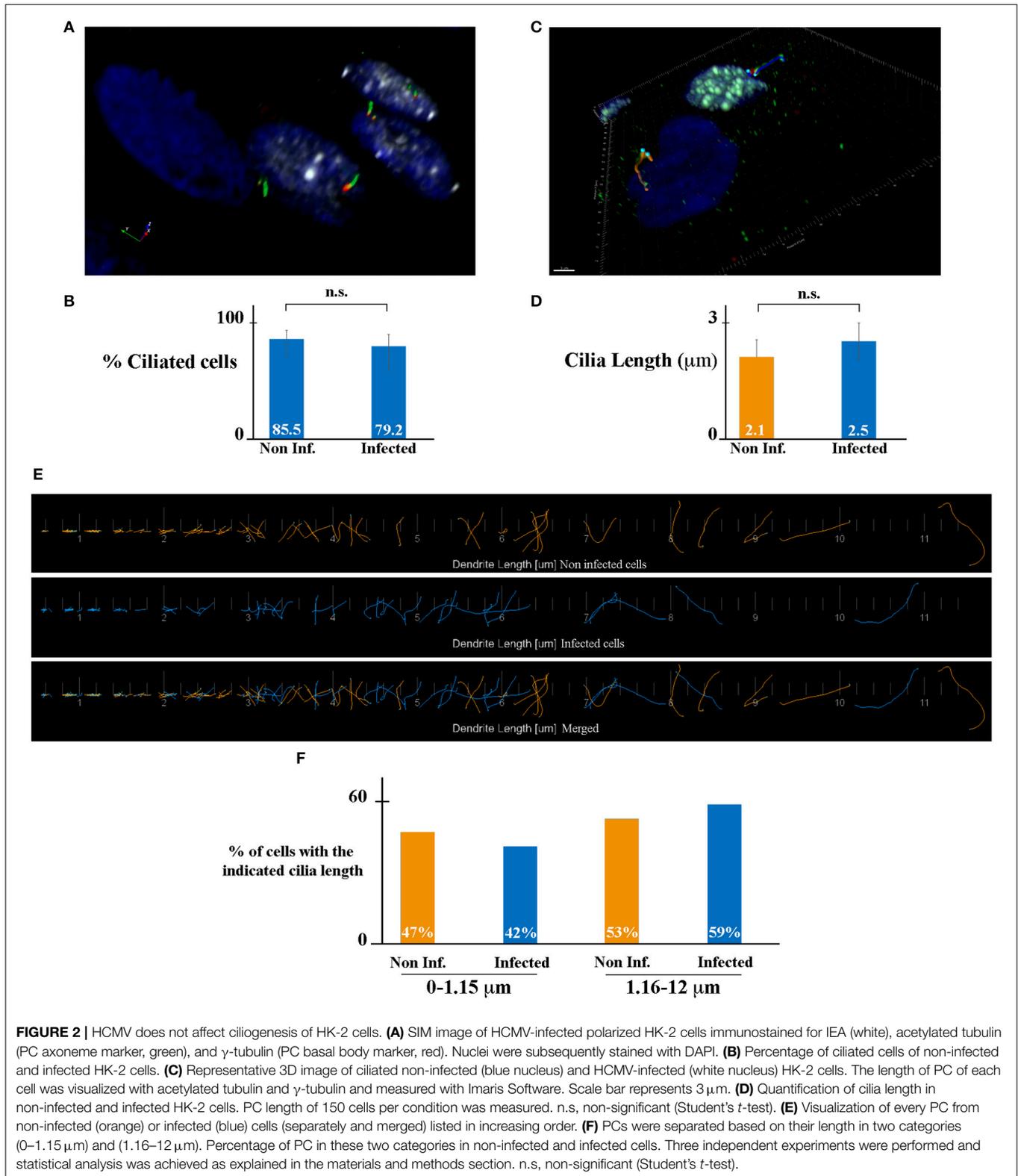
HCMV Strain TB40/E Infects HK-2 Renal Tubular Epithelial Cells

Since our studies were focused in elucidating HCMV-induced renal pathophysiology, we used the established HK-2 cell line of human immortalized renal tubular epithelial cells (Ryan et al., 1994). To the best of our knowledge, only one study has previously employed HK-2 cells to explore HCMV renal pathogenic mechanisms (Shimamura et al., 2010). Using HCMV TR strain, they demonstrated that infection of HK-2 cells induced TGF- β 1 production, a fibrogenic cytokine, which might contribute to the renal fibrosis observed in the context of infection of transplanted kidney. Nevertheless, the mechanisms involved in renal HCMV disease remain largely undefined. However, in this study, they observed that TR virions were not released in the supernatant and remained cell-associated, and the maximum titer obtained was much less than in human fibroblasts (Shimamura et al., 2010). Then, we decided to use an alternative HCMV clinical strain, which exhibits a broad cell tropism and is widely used for infection of endothelial and monocyte-derived cells, named TB40/E (Sinzger et al., 1999, 2008). We thus first investigated the permissivity of HK-2 cells to the highly passaged fibroblast-adapted laboratory strain AD169 and the strain TB40/E. Primary human embryonic lung fibroblasts (MRC-5 cells), a well-established cellular system for HCMV studies, and HK-2 cells were infected in parallel with HCMV at a multiplicity of infection (MOI) of 1. Cells were fixed 48 h post-infection (h p.i.), immunostained for immediate-early viral antigens (IEA) in order to visualize infected cells, and analyzed by epifluorescence microscopy. A large proportion of the MRC-5 cells were positive for IEA with both viral strains (**Figure 1A**, upper panels). In HK-2 cells, 13 and 30% of the cells were positive for IEA when infected with AD169 or TB40/E strain, respectively (**Figure 1A**, lower panels), showing that TB40/E viruses were more efficient to enter HK-2 cells. We thus decided to use TB40/E strain for the following experiments. The urinary tract (kidney, urinary bladder) is formed by a single layer of polarized epithelial cells. HK-2 cells start polarizing as soon as they reach confluency over the substratum, thus mimicking the morphology of the urinary track epithelia. We decided to investigate both the impact of HCMV infection on polarization and the impact of polarization on the permissiveness of HK-2 cells to HCMV. In order to visualize HK-2 polarization, we employed antibodies against zonula occludens protein-1 (ZO-1), a tight junction protein (Shin et al., 2006). We observed that HK-2 cells were completely polarized after 7 days but the polarization process was not affected by HCMV-infection (**Figure 1B**). Thus, to explore whether the virus was able to enter the cells once polarized, HK-2 cells were seeded in sub confluency and infected with HCMV at an MOI of 1 on day 1, 4, and 7 p.p. and we left the infection to proceed for 48 h. Afterwards, the cells were fixed and immunostained for IEA.

As shown in **Figure 1C**, a greater rate of infection was obtained when infection was performed on non-polarized cells (1 day p.p.), while a decreased infectivity was observed when the infection was performed on a polarized monolayer of cells at 7 days p.p. Then, from now on, the infections were always done 1 day p.p. Next, to analyze the intracellular distribution phenotype of IEA expression in detail, we used laser scanning confocal microscopy (LSCM). MRC-5 and HK-2 cells were infected in parallel with HCMV and fixed at 24 h p.i., and immunostained for IEA. As shown, a similar nuclear distribution was observed for both cell types (**Figure 1D**). We also comparatively analyzed the kinetics of IEA expression level in MRC-5 and HK-2 cells. The cells were mock- or HCMV-infected in parallel and at 1, 2, 3, and up to 6 days p.i., the cells were lysed and the intracellular levels of IEA were analyzed by Western blot. In MRC-5 cells, we observed expression of IEA (IE1 & IE2) from 1 day p.i. with a decreased accumulation at 3 days p.i., probably due to protein degradation (**Figure 1E**). At 6 days p.i., cells were totally lysed by HCMV. In HK-2 cells, we observed accumulation of both IE1 and IE2 at 2 days p.i. and a decreased expression at 6 days p.i., which can be interpreted as a delay in the infectious cycle in HK-2 cells (**Figure 1E**). However, we could not detect expression of pp28, a late tegument viral protein, classically expressed after viral replication, suggesting that either pp28 is expressed at a low level or the viral cycle is incomplete (data not shown). Finally, in order to decipher whether HCMV infection of these cells was productive (i.e., generation of viral particles), we analyzed a 1-week long infection of HK-2 cells. Supernatants from HK-2-infected cells were titrated using MRC-5 cells. Whereas, HK-2 cells were infected, as shown with IEA staining (**Figure 1F**, left panels), we did not observe any MRC-5 cells positive for IEA, suggesting that there was no HCMV production in HK-2 cells after one-week (**Figure 1F**, right panels). Taken together, our data demonstrated that HCMV strain TB40/E was able to enter HK-2 cells and to express IEAs, although in a delayed kinetics compared to MRC-5 cells, but it is incapable of propagating in these cells.

HCMV Infection Does Not Affect Ciliogenesis of Renal Tubular Epithelial Cells

The primary cilium (PC), which is formed by a basal body and an axoneme, is a microtubule-based organelle at the surface of various cell types and is critical in maintaining tissue homeostasis (Malicki and Johnson, 2017). In the kidney, PC plays an important role in the maintenance of renal function and structure. All kidney tubular epithelial cells have a PC (one per cell). The PC protrudes from the apical surface of cells into the lumen of tubules, detects the fluid flow and composition, and maintains the architecture of tubule cells (Praetorius, 2015). It has been shown that the length of the PC is dynamically changed in cells as a result of various kidney diseases including acute kidney injury and chronic kidney disease (Park, 2018). We hypothesized that HCMV-infection may affect PC length in kidney epithelial cells, leading to an impact of its function and to viral-induced renal physiopathology. To address this question,



we analyzed the presence and the length of PC in HCMV-infected HK-2 cells. We immunostained PC using antibodies against acetylated tubulin (axoneme marker, green) and γ -tubulin (basal

body marker, red), and infected cells using antibodies against IEA (white) (**Figure 2**). We decided to let the infection proceed for 7 days in order to assure a confluent, polarized monolayer with

maximum ciliogenesis. The samples were analyzed by structured illumination microscopy (SIM). As shown in **Figure 2A**, HCMV-infected cells presented analogous PCs to neighboring non-infected cells. We quantified the number of cells presenting a PC, and we observed a similar percentage of ciliated cells in non-infected (blue nucleus) and HCMV-infected cells (white nucleus). Indeed, in non-infected and in HCMV-infected cells 85.5 and 79.2% of cells presented a PC, respectively (**Figure 2B**). Next, to evaluate the impact of infection on the PC length, IF images were used to highlight the PC structures in non- and HCMV-infected cells (**Figure 2C**). The mean PC length of non-infected cells, which was 2.1 μm , was not significantly different of the PC length of HCMV-infected cells (2.5 μm) (**Figures 2D,E**). In addition, the length distribution in both conditions was analyzed. Since the range of PC length was extremely extended (0.1–12 μm), it might be possible that a total mean value could miss significant differences between infected cells and non-infected cells. To go further, we decided to arbitrarily divide our data between “large PCs” (1.16–12 μm) and “small PCs” (0–1.15 μm). As observed in **Figure 2F**, a slight difference in the distribution was observed, although statistically non-significant. All these data taken together indicate that ciliogenesis of renal tubular epithelial cells was not affected by HCMV infection.

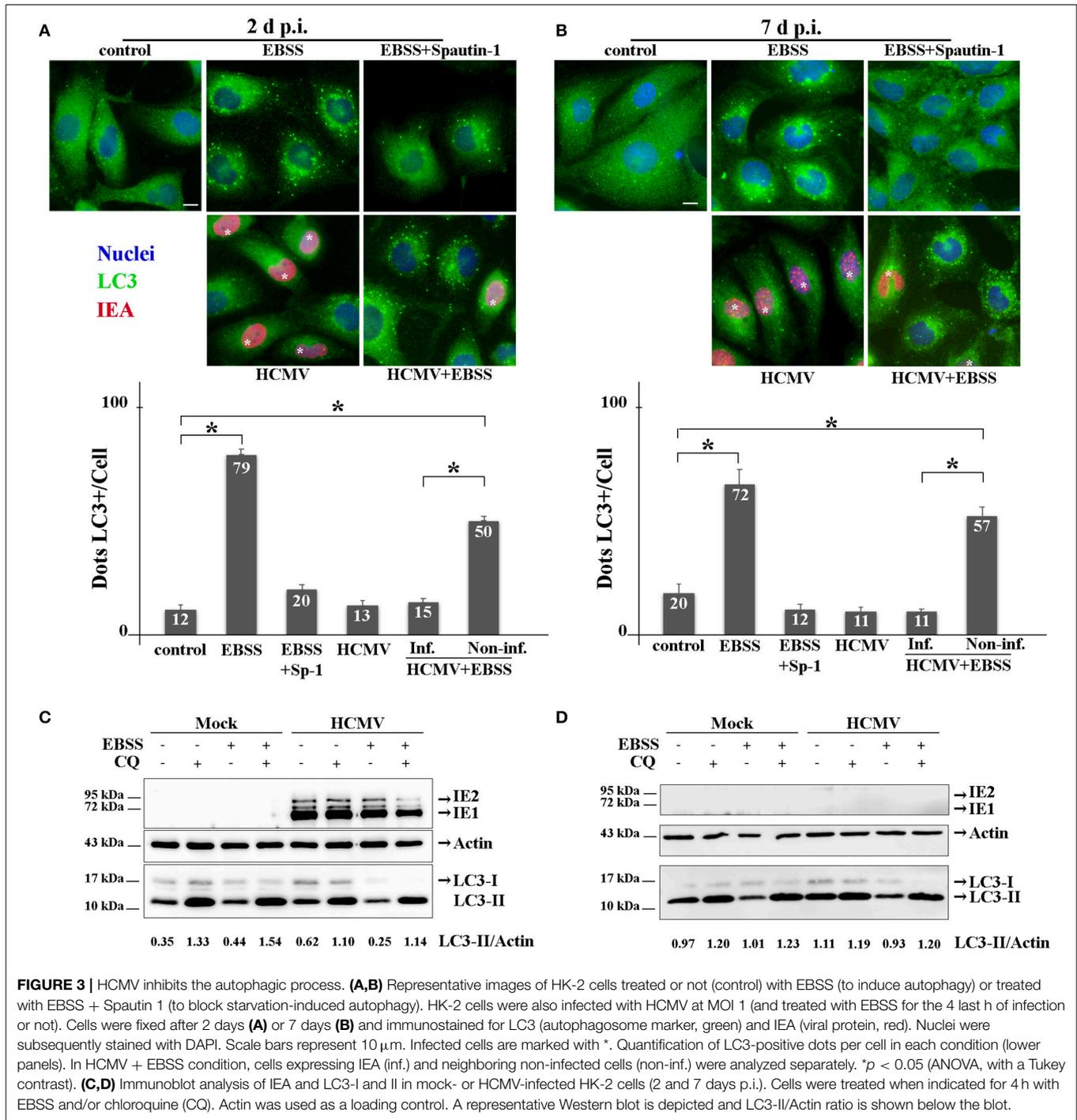
HCMV Inhibits the Autophagy Pathway of Renal Cells

The interplay between HCMV and the autophagy pathway has been extensively studied by our group and others' [reviewed in Lussignol and Esclatine (2017)]. In fibroblasts, HCMV first stimulates autophagy quickly after its entry and subsequently blocks autophagosome maturation in order to form its final envelope (Mouna et al., 2016; Taisne et al., 2019). Because viruses modulate autophagy differently depending of the cell type, the impact of HCMV on autophagy was analyzed in HK-2 cells (**Figure 3**). Firstly, HK-2 cells were grown on coverslips and mock- or HCMV-infected for 48 h (non-polarized cells) or 7 days (polarized cells). Then, the cells were fixed and immunostained employing antibodies to LC3, a well-established autophagosome marker (Klionsky et al., 2016) (green) and to IEA (red) to visualize the autophagic structures and the infected cells, respectively. As controls, mock-infected cells were grown in EBSS, to induce autophagy by starvation, and treated or not with Spautin-1, used to counteract starvation-induced autophagy. Indeed, Spautin-1 constitutes a potent and specific inhibitor of autophagosomes biogenesis (Liu et al., 2011). The samples were analyzed by SIM and autophagic structures (LC3 positive dots) were quantified as described in the materials and methods section. We observed numerous LC3-positive dots when HK-2 cells were starved using EBSS, both in non-polarized and polarized cells, and Spautin-1 was able to block starvation-induced autophagosome formation. Then, HK-2 cells were HCMV-infected for 48 h (non-polarized cells) or 7 days (polarized cells). Although HCMV infection had almost no impact on basal autophagy, it was able to block starvation-induced autophagy in cells expressing IEA in non-polarized and polarized HK-2 cells

(**Figures 3A,B**, respectively). Interestingly, in these experiments, we noticed that autophagy was not modulated in the neighboring uninfected cells, confirming a direct effect of the virus on HK2 cells. We then performed immunoblotting to detect LC3 in HCMV-infected HK-2 cells. During autophagy, the cytosolic LC3 form (LC3-I) undergoes a modifying process to a phosphatidylethanolamine-conjugated form (LC3-II), which can bind to the autophagosomal membranes (Klionsky et al., 2016). LC3-I and LC3-II are easily separated by SDS-PAGE because of their difference in electrophoretic mobility, and the expression of LC3-II correlates with the level of autophagy. To assess the autophagic flux, we used chloroquine (CQ), which neutralized the lysosomal pH and by inhibiting endogenous protein breakdown caused the accumulation of LC3-II in both autophagosomes and autolysosomes (Klionsky et al., 2016). HK-2 cells were mock- or HCMV-infected for 2 and 7 days and when indicated, treated with CQ and/or EBSS for the last 4 h of infection. In mock-infected cells, we observed an increase of LC3-II expression in EBSS-treated cells (**Figure 3**). Moreover, the addition of CQ led to an accumulation of LC3-II, reflecting the autophagic flux. In HCMV-infected cells treated with EBSS, a decrease in LC3-II expression was observed after 2 days of infection compared with the mock-infected EBSS-induced samples (**Figure 3C**). Interestingly, in HCMV-infected cells grown in complete medium, we observed a gradual slowdown in the autophagic flux, since the ratio between with and without CQ conditions is lower (1.8 and 1.1 for 2 and 7 d, respectively) compared to the one observed in the mock counterparts (3.8 and 1.2 for 2 and 7 d, respectively). At 7 d p.i. we failed to detect IEA by immunoblot, which we attributed to the fact that the percentage of infected-cells was too low to detect viral protein expression by Western blot. Nevertheless, we confirmed the infection by detection of IEA by immunofluorescence assay (data not shown). Taken together, these data indicate that HCMV inhibits the autophagy pathway of renal HK-2 cells.

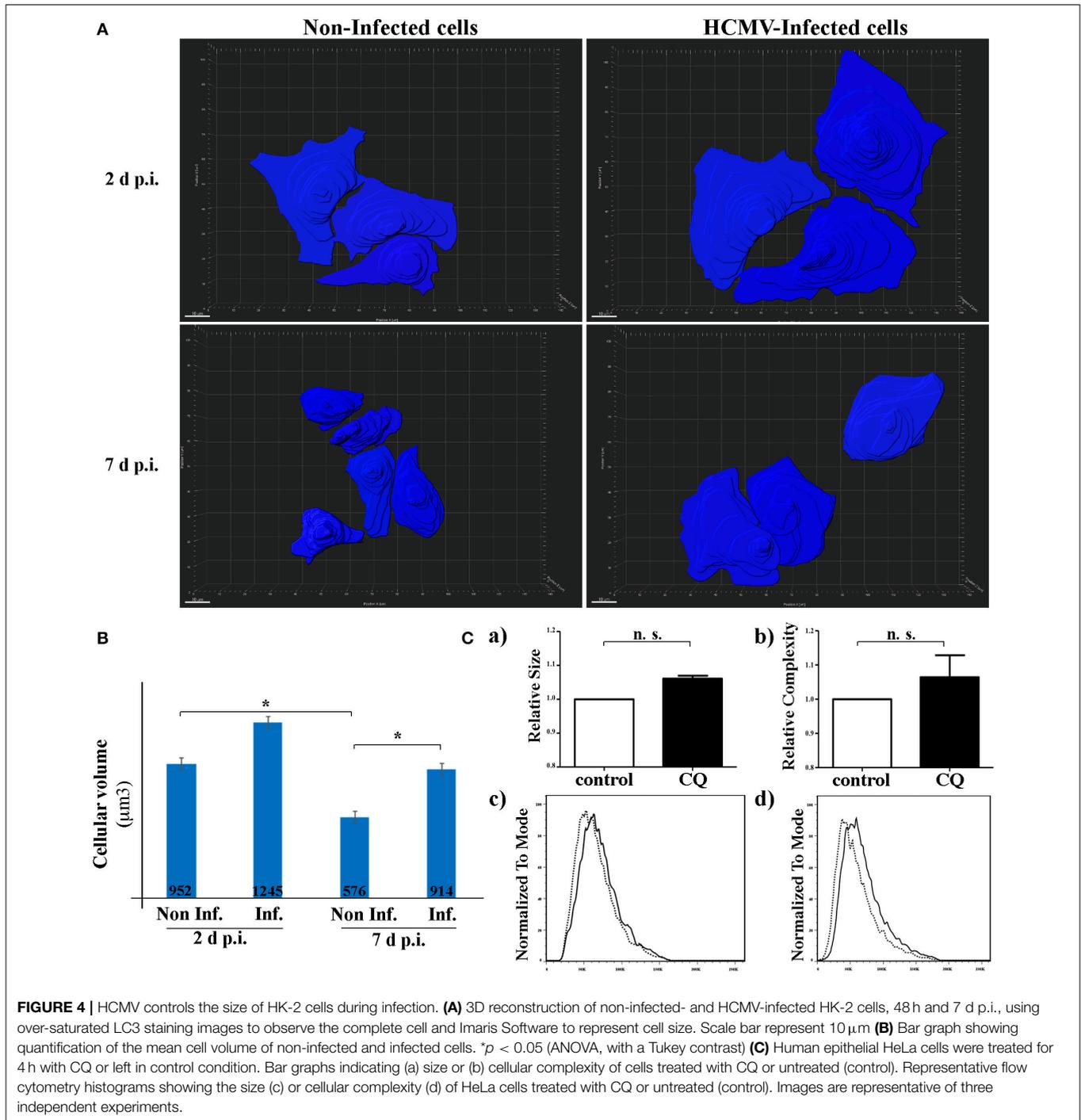
HCMV Induces the Enlargement of Renal Tubular Epithelial Cells

It has been recently indicated *in vitro* and *in vivo* that autophagy is a major regulator in the cell-volume regulation in kidney epithelial cells under fluid flow (Orhon et al., 2016b). They demonstrated that inhibition of autophagy leads to an enlargement of renal epithelial cell size. Since HCMV infection causes enlargement of the cell (cytomegaly), we hypothesized that inhibition of autophagy by HCMV could lead to an increase of the size of renal tubular epithelial cells. To address this point, we used SIM to acquire the z-stack images of the cells in different visual fields of the μ -slide (**Figure 4**). Then, the 3D reconstruction images to compare the mean cell volume of non-infected and infected HK-2 cells, 2 and 7 days p.i. (**Figures 4A,B**). We observed an enlargement of infected cells at both 2 and 7 days p.i. However, the difference in the cellular volume was statistically significant only at 7 d p.i. Of note, a significant decrease in the cell size was observed in non-infected cells 7 days p.i. regarding 2 days p.i., that could be explained by the polarization process which



produces a greater cellular density on the plastic substratum, with a smaller individual cell volume as a consequence. Orhon and collaborators demonstrated that CQ administration to mice, which blocks the autophagic flux, resulted in increased epithelial cell size in kidney (Orhon et al., 2016b). Thus, we used FACS, a cellular population analysis technique, to study epithelial cell size in response to inhibition of autophagy by CQ. For this

purpose, we decided to use human epithelial HeLa cells since (i) they are suitable for FACS and (ii) they are more widely used than the renal cell line to study cellular processes. As observed in Figure 4C, we detected an enlargement of the cell size after CQ-treatment of epithelial cells, confirming the notion that enlargement of the cells could be related to inhibition of the autophagic flux.



DISCUSSION

Kidney transplant (KT) is the best treatment option for patients with a end-stage chronic kidney disease increasing the duration and quality of life for patients (Wolfe et al., 1999). Worldwide, the number of transplants performed in the world is increasing every year and renal allograft is the most common one. However,

post-transplant immunosuppressive drugs is inevitably associated with opportunistic viral infections, mainly by persistent viruses such as the members of the *Herpesviridae* family. Especially, HCMV, Epstein-Barr virus (EBV) and human herpesvirus type 6 (HHV-6) are of interest, since they can cause severe post-transplant complications (Moal et al., 2013). Antiviral

agents are recommended to prevent the viral multiplication and the appearance of clinical diseases, but they are unable to eradicate these viruses. In this context, HCMV infection is the most frequent complication in KT because HCMV replicates to high rates, causing both direct effects, with viral replication in the peripheral blood and organ damage and indirect effects, characterized by a most frequent kidney dysfunction and a risk of organ rejection. (De Keyzer et al., 2011; Requião-Moura et al., 2015; López-Oliva et al., 2017).

In this work, we used the established HK-2 cell line of human immortalized renal tubular epithelial cells (Ryan et al., 1994) to study host-cell interaction aspects which could contribute to elucidating HCMV-induced renal pathophysiology. HK-2 cells, like MDCK (canis renal-derived cell line) cells, start polarizing as soon as they reach confluency over the substratum, thus mimicking the morphology of the urinary tract epithelia. Although the species of the two cell lines are different, both renal tubule cell lines have been used in invaluable systems for *in vitro* analyses of various tubule segment-specific physiological and biochemical functions (Ng et al., 2003; Liu et al., 2008). We observed a significant level of infection by HCMV of HK-2 cells. But, as shown here, the percentage of HCMV-infected cells was lower when the infection was performed on a polarized monolayer of HK-2 cells. This result is in agreement with previous observations made in human intestinal epithelial Caco-2 cells which mimics enterocyte (Esclatine et al., 2000, 2001). Caco-2 cells, upon reaching confluency, spontaneously become polarized and differentiate to display typical morphological and functional features of small intestine enterocytes (Pinto et al., 1983). In these studies, the authors demonstrated that HCMV infection of polarized Caco-2 cells is poorly efficient because it proceeds preferentially through the basolateral membrane (Esclatine et al., 2000, 2001). This phenomenon is associated with a redistribution of viral receptors to this side of the cell during polarization. In this context, we hypothesize that, when HK-2 cells are non-polarized, the receptors are equally distributed all along the cellular membrane promoting HCMV entry while they redistribute to the basolateral membrane in polarized cells, becoming inaccessible to the virus in normal culture conditions.

We observed here that infection of HK-2 cells by HCMV leads to an increase in the cell size and that HCMV infection inhibits the autophagy pathway. This can be correlated to a recent study demonstrating a role of autophagy in the regulation of the cell size (Orhon et al., 2016a). In this study, the authors showed that the sensing of fluid flow by PC induces autophagy which decreases cell volume of epithelial renal cells. In the kidney, PC plays an important role in the maintenance of renal function and structure and it has been demonstrated that the length of the PC is dynamically changed in cells as a result of various kidney diseases (Park, 2018). Thus, we studied both ciliogenesis and PC structure in infected cells but we observed that neither of them was affected by the presence of the virus. Therefore, the inhibition of autophagy and the cell

enlargement observed in HCMV-infected HK2 cells seem to be PC-independent.

Nevertheless, we hypothesize a link between cell enlargement and inhibition of autophagy during HCMV infection. Indeed, using a chemical treatment approach in human epithelial cells, we observed that blocking autophagy with CQ led to an increased cellular volume of the treated cells.

The autophagy involvement in the regulation of cell size in response to amino acid concentration fluctuation and osmosensing has been observed by pioneering studies in the liver (Meijer et al., 1993; Vom Dahl et al., 2003). Moreover, several more-recent studies reported that genetic defect of autophagy genes can lead to an increase in cell size in various cells and tissues such as mouse embryo fibroblasts (Jin et al., 2015), the kidney proximal tubule (Kimura et al., 2011; Orhon et al., 2016b), the liver (Komatsu et al., 2005; Jin et al., 2015) and the *Drosophila* intestine cell size (Chang et al., 2013) strongly suggesting that the function of autophagy in cell volume control is evolutionarily conserved. An increase of cell volume is a frequent characteristic observed during renal failure. Thus, mechanisms allowing the regulation of these morphology changes could have a crucial role in the physiopathology of renal failure and need to be explored.

In conclusion, our main contribution is based on the establishment of a renal tubular epithelial model to study HCMV-host interaction to understand the viral-induced physiopathological effects underlying the post-kidney allograft failure. We did a great effort to demonstrate HCMV TB40/E viral replication/propagation but systematically failed to observe this, so it is highly probable that HK-2 cells infection with TB40/E is abortive. Nevertheless, the observed HCMV-dependent autophagy inhibition and increased cell volume triggered by the presence of the virus in the cells constitute an excellent starting point to further explore the role of both mechanisms, in renal cells dysfunction. Indeed, for autophagy, there is considerable, but still unrealized, potential for translating preclinical findings on autophagy modulation into a therapeutic benefit for different patient populations (Rubinsztein et al., 2012).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/supplementary material.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AL, EH, MT, CT, JR, CG, ML, and LD performed the experiments. AE and LD prepared the manuscript. PC and MC were mentors of the work and contributed to manuscript edition. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

LD performed part of the experiments at AE laboratory thanks to a Short Term Fellowship from EMBO. Additionally, this work was partially supported by funds from the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación) PICT 2016-0528 to LD, SIIP-Type I 2019-2020 M071 (Universidad Nacional de Cuyo), and by institutional funding from CNRS and Univ. Paris-Saclay and grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE14-0022) to AE.

REFERENCES

- Boeckh, M. (2011). Complications, diagnosis, management, and prevention of CMV infections: current and future. *Hematology* 2011, 305–309. doi: 10.1182/asheducation-2011.1.305
- Carney, E. F. (2013). The impact of donor CMV infection on kidney graft outcome. *Nat. Rev. Nephrol.* 9, 434–434. doi: 10.1038/nrneph.2013.123
- Chang, T. K., Shrivage, B. V., Hayes, S. D., Powers, C. M., Simin, R. T., Wade Harper, J., et al. (2013). Uba1 functions in Atg7- and Atg3-independent autophagy. *Nat. Cell Biol.* 15, 1067–1078. doi: 10.1038/ncb2804
- Chaumorcet, M., Lussignol, M., Mouna, L., Cavignac, Y., Fahie, K., Cotte-Laffitte, J., et al. (2012). The human cytomegalovirus protein TRS1 inhibits autophagy via its interaction with beclin 1. *J. Virol.* 86, 2571–2584. doi: 10.1128/JVI.05746-11
- Chaumorcet, M., Souquère, S., Pierron, G., Codogno, P., and Esclatine, A. (2008). Human cytomegalovirus controls a new autophagy-dependent cellular antiviral defense mechanism. *Autophagy* 4, 46–53. doi: 10.4161/auto.5184
- Choi, M. E. (2019). Autophagy in kidney disease. *Annu. Rev. Physiol.* 82, 297–322. doi: 10.1146/annurev-physiol-021119-034658
- De Keyser, K., Van Laecke, S., Peeters, P., and Vanholder, R. (2011). Human cytomegalovirus and kidney transplantation: a clinician's update. *Am. J. Kidney Dis.* 58, 118–126. doi: 10.1053/j.ajkd.2011.04.010
- Esclatine, A., Bellon, A., Michelson, S., Servin, A. L., Quéro, A. M., and Géniteau-Legendre, M. (2001). Differentiation-dependent redistribution of heparan sulfate in epithelial intestinal caco-2 cells leads to basolateral entry of cytomegalovirus. *Virology* 289, 23–33. doi: 10.1006/viro.2001.1122
- Esclatine, A., Chaumorcet, M., and Codogno, P. (2009). Macroautophagy signaling and regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 335, 33–70. doi: 10.1007/978-3-642-00302-8_2
- Esclatine, A., Lemullois, M., Servin, A. L., Quero, A.-M., and Geniteau-Legendre, M. (2000). Human cytomegalovirus infects caco-2 intestinal epithelial cells basolaterally regardless of the differentiation state. *J. Virol.* 74, 513–517. doi: 10.1128/JVI.74.1.513-517.2000
- Huber, T. B., Hartleben, B., Edelstein, C. L., Ravichandran, K., Inoki, K., Yoshida, S., et al. (2012). Emerging role of autophagy in kidney function, diseases and aging. *Autophagy* 8, 1009–1031. doi: 10.4161/auto.19821
- Jin, G., Lee, S. W., Zhang, X., Cai, Z., Gao, Y., Chou, P. C., et al. (2015). Skp2-mediated RagA ubiquitination elicits a negative feedback to prevent amino-acid-dependent mTORC1 hyperactivation by recruiting GATOR1. *Mol. Cell* 58, 989–1000. doi: 10.1016/j.molcel.2015.05.010
- Kaushal, G. P., and Shah, S. V. (2016). Autophagy in acute kidney injury. *Kidney Int.* 89, 779–791. doi: 10.1016/j.kint.2015.11.021
- Kimura, T., Takabatake, Y., Takahashi, A., Kaimori, J.-Y., Matsui, I., Namba, T., et al. (2011). Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 902–913. doi: 10.1681/ASN.2010070705
- Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12, 1–222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356
- Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., et al. (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell Biol.* 169, 425–434. doi: 10.1083/jcb.200412022

ACKNOWLEDGMENTS

We sincerely appreciate Isabelle Beau from Inserm U1185 Université Paris-Sud for generously providing the antibodies against the zonula occludens protein-1, and Fabiola Terzi from the Institut Necker Enfants-Malades, for proving HK-2 cells. We are grateful to Nicolas Goudin from Le Plateforme d'Imagerie Cellulaire, Institut Necker Enfants-Malades, for extreme valuable help regarding the use of ApoTome 2 microscope and Imaris software.

- Liu, B.-C., Li, M.-X., Zhang, J.-D., Liu, X.-C., Zhang, X.-L., and Phillips, A. O. (2008). Inhibition of integrin-linked kinase via a siRNA expression plasmid attenuates connective tissue growth factor-induced human proximal tubular epithelial cells to mesenchymal transition. *Am. J. Nephrol.* 28, 143–151. doi: 10.1159/000110019
- Liu, J., Xia, H., Kim, M., Xu, L., Li, Y., Zhang, L., et al. (2011). Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell* 147, 223–234. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.037
- López-Oliva, M. O., Flores, J., Madero, R., Escuin, F., Santana, M. J., Bellón, T., et al. (2017). La infección por citomegalovirus postrasplante renal y pérdida del injerto a largo plazo. *Nefrología* 37, 515–525. doi: 10.1016/j.nefro.2016.11.018
- Lussignol, M., and Esclatine, A. (2017). Herpesvirus and autophagy: “all right, everybody be cool, this is a robbery!”. *Viruses* 9:372. doi: 10.3390/v9120372
- Malicki, J. J., and Johnson, C. A. (2017). The cilium: cellular antenna and central processing unit. *Trends Cell Biol.* 27, 126–140. doi: 10.1016/j.tcb.2016.08.002
- Meijer, A. J., Gustafson, L. A., Luiken, J. J. F. P., Blommaert, P. J. E., Caro, L. H. P., Van Woerkom, G. M., et al. (1993). Cell Swelling and the sensitivity of autophagic proteolysis to inhibition by amino acids in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 215, 449–454. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18053.x
- Moal, V., Zandotti, C., and Colson, P. (2013). Emerging viral diseases in kidney transplant recipients. *Rev. Med. Virol.* 23, 50–69. doi: 10.1002/rmv.1732
- Mocarski, E. S., Shenk, T., and Pass, R. F. (2001). *Cytomegalovirus. Fields Virology, 4th Edn.* Philadelphia, PA: Lippincott Williams Wilkins, 2675–2706.
- Morgantetti, G. F., Balancin, M. L., Medeiros, G. A., de, Dantas, M., and Silva, G. E. B. (2019). Cytomegalovirus infection in kidney allografts: a review of literature. *Transl. Androl. Urol.* 8:S192. doi: 10.21037/tau.2018.10.14
- Mouna, L., Hernandez, E., Bonte, D., Brost, R., Amazit, L., Delgui, L. R., et al. (2016). Analysis of the role of autophagy inhibition by two complementary human cytomegalovirus BECN1/Beclin 1-binding proteins. *Autophagy* 12, 327–342. doi: 10.1080/15548627.2015.1125071
- Ng, K. H., Lim, B. G., and Wong, K. P. (2003). Sulfate conjugating and transport functions of MDCK distal tubular cells. *Kidney Int.* 63, 976–986. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00818.x
- Orhon, I., Dupont, N., and Codogno, P. (2016a). Primary cilium and autophagy: the avengers of cell-size regulation. *Autophagy* 12, 2258–2259. doi: 10.1080/15548627.2016.1212790
- Orhon, I., Dupont, N., Zaidan, M., Boitez, V., Burtin, M., Schmitt, A., et al. (2016b). Primary-cilium-dependent autophagy controls epithelial cell volume in response to fluid flow. *Nat. Cell Biol.* 18, 657–667. doi: 10.1038/ncb3360
- Park, K. M. (2018). Can tissue cilia lengths and urine cilia proteins be markers of kidney diseases? *Chonnam Med. J.* 54:83–89. doi: 10.4068/cmj.2018.54.2.83
- Pinto, M., Robineleon, S., Appay, M. D., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., et al. (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human-colon carcinoma cell-line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* 47, 323–330.
- Praetorius, H. A. (2015). The primary cilium as sensor of fluid flow: new building blocks to the model. A review in the theme: cell signaling: proteins, pathways and mechanisms. *Am. J. Physiol. Physiol.* 308, C198–C208. doi: 10.1152/ajpcell.00336.2014
- Rane, S., Nada, R., Minz, M., Sakhuja, V., and Joshi, K. (2012). Spectrum of cytomegalovirus-induced renal pathology in renal allograft recipients. *Transplant. Proc.* 44, 713–716. doi: 10.1016/j.transproceed.2011.11.052
- Razonable, R. R., and Humar, A. (2013). Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Am. J. Transplant.* 13, 93–106. doi: 10.1111/ajt.12103

- Requião-Moura, L. R., deMatos, A. C., ristin, C., and Pacheco-Silva, A. (2015). Cytomegalovirus infection in renal transplantation: clinical aspects, management and the perspectives. *Einstein* 13, 142–148. doi: 10.1590/S1679-45082015RW3175
- Rubinsztein, D. C., Codogno, P., and Levine, B. (2012). Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 709–730. doi: 10.1038/nrd3802
- Ryan, M. J., Johnson, G., Kirk, J., Fuerstenberg, S. M., Zager, R. A., and Torok-Storb, B. (1994). HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int.* 45, 48–57. doi: 10.1038/ki.1994.6
- Shimamura, M., Murphy-Ullrich, J. E., and Britt, W. J. (2010). Human cytomegalovirus induces TGF- β 1 activation in renal tubular epithelial cells after epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS Pathog.* 6:e1001170. doi: 10.1371/journal.ppat.1001170
- Shin, K., Fogg, V. C., and Margolis, B. (2006). Tight junctions and cell polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 207–235. doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104219
- Sinzger, C., Hahn, G., Digel, M., Katona, R., Sampaio, K. L., Messerle, M., et al. (2008). Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E. *J. Gen. Virol.* 89, 359–368. doi: 10.1099/vir.0.83286-0
- Sinzger, C., Schmidt, K., Knapp, J., Kahl, M., Beck, R., Waldman, J., et al. (1999). Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome. *J. Gen. Virol.* 80, 2867–2877. doi: 10.1099/0022-1317-80-11-2867
- Sureshbabu, A., Ryter, S. W., and Choi, M. E. (2015). Oxidative stress and autophagy: crucial modulators of kidney injury. *Redox Biol.* 4, 208–214. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.001
- Taisne, C., Lussignol, M., Hernandez, E., Moris, A., Mouna, L., and Esclatine, A. (2019). Human cytomegalovirus hijacks the autophagic machinery and LC3 homologs in order to optimize cytoplasmic envelopment of mature infectious particles. *Sci. Rep.* 9:4560. doi: 10.1038/s41598-019-41029-z
- Vom Dahl, S., Schliess, F., Reissmann, R., Gö, B., Weiergrä, O., Kocalkova, M., et al. (2003). Involvement of integrins in osmosensing and signaling toward autophagic proteolysis in rat liver* downloaded from. *J. Biol. Chem.* 278, 27088–27095. doi: 10.1074/jbc.M210699200
- Wolfe, R. A., Ashby, V. B., Milford, E. L., Ojo, A. O., Ettenger, R. E., Agodoa, L. Y. C., et al. (1999). Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N. Engl. J. Med.* 341, 1725–1730. doi: 10.1056/NEJM199912023412303
- Zemirli, N., Boukhalfa, A., Dupont, N., Botti, J., Codogno, P., and Morel, E. (2019). The primary cilium protein folliculin is part of the autophagy signaling pathway to regulate epithelial cell size in response to fluid flow. *Cell Stress* 3, 100–109. doi: 10.15698/cst2019.03.180

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 López Giuliani, Hernández, Tohmé, Taisne, Roldán, García Samartino, Lussignol, Codogno, Colombo, Esclatine and Delgui. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Références

- Agrotis, A., Pengo, N., Burden, J. J., & Ketteler, R. (2019). Redundancy of human ATG4 protease isoforms in autophagy and LC3/GABARAP processing revealed in cells. *Autophagy*, *15*(6), 976-997. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1569925>
- Alemu, E. A., Lamark, T., Torgersen, K. M., Birgisdottir, A. B., Larsen, K. B., Jain, A., Olsvik, H., Øvervatn, A., Kirkin, V., & Johansen, T. (2012). ATG8 family proteins act as scaffolds for assembly of the ULK complex : Sequence requirements for LC3-interacting region (LIR) motifs. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(47), 39275-39290. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.378109>
- Alwine, J. C. (2012). The Human Cytomegalovirus Assembly Compartment : A Masterpiece of Viral Manipulation of Cellular Processes That Facilitates Assembly and Egress. *PLOS Pathogens*, *8*(9), e1002878. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002878>
- Arakawa, M., & Morita, E. (2019). Flavivirus Replication Organelle Biogenesis in the Endoplasmic Reticulum : Comparison with Other Single-Stranded Positive-Sense RNA Viruses. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(9). <https://doi.org/10.3390/ijms20092336>
- Arakawa, S., Honda, S., Yamaguchi, H., & Shimizu, S. (2017). Molecular mechanisms and physiological roles of Atg5/Atg7-independent alternative autophagy. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, *93*(6), 378-385. <https://doi.org/10.2183/pjab.93.023>
- Archer, M. A., Brechtel, T. M., Davis, L. E., Parmar, R. C., Hasan, M. H., & Tandon, R. (2017). Inhibition of endocytic pathways impacts cytomegalovirus maturation. *Scientific Reports*, *7*, 46069. <https://doi.org/10.1038/srep46069>
- AuCoin, D. P., Smith, G. B., Meiering, C. D., & Mocarski, E. S. (2006). Betaherpesvirus-conserved cytomegalovirus tegument protein ppUL32 (pp150) controls cytoplasmic events during virion maturation. *Journal of Virology*, *80*(16), 8199-8210. <https://doi.org/10.1128/JVI.00457-06>
- Avitabile, E., Gaeta, S. D., Torrisi, M. R., Ward, P. L., Roizman, B., & Campadelli-Fiume, G. (1995). Redistribution of microtubules and Golgi apparatus in herpes simplex virus-infected cells and their role in viral exocytosis. *Journal of Virology*, *69*(12), 7472-7482.
- Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., Griffiths, G., & Ktistakis, N. T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*, *182*(4), 685-701. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803137>
- Barth, S., Glick, D., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy : Assays and artifacts. *The Journal of Pathology*, *221*(2), 117-124. <https://doi.org/10.1002/path.2694>
- Beale, R., Wise, H., Stuart, A., Ravenhill, B. J., Digard, P., & 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*(2), 239-247. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.006>
- Beau, I., Esclatine, A., & Codogno, P. (2008). Lost to translation : When autophagy targets mature ribosomes. *Trends in Cell Biology*, *18*(7), 311-314. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.05.001>
- Bechtel, J. T., & Shenk, T. (2002). Human Cytomegalovirus UL47 Tegument Protein Functions after Entry and before Immediate-Early Gene Expression. *Journal of Virology*, *76*(3), 1043-1050. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.3.1043-1050.2002>
- Behrends, C., Sowa, M. E., Gygi, S. P., & Harper, J. W. (2010). Network organization of the human autophagy system. *Nature*, *466*(7302), 68-76. <https://doi.org/10.1038/nature09204>
- Bejarano, E., & Cuervo, A. M. (2010). Chaperone-mediated autophagy. *Proceedings of the American Thoracic Society*, *7*(1), 29-39. <https://doi.org/10.1513/pats.200909-102JS>
- Belzile, J.-P., Sabalza, M., Craig, M., Clark, E., Morello, C. S., & Spector, D. H. (2016). Trehalose, an mTOR-Independent Inducer of Autophagy, Inhibits Human Cytomegalovirus Infection in Multiple Cell Types. *Journal of Virology*, *90*(3), 1259-1277. <https://doi.org/10.1128/JVI.02651-15>

- Biazik, J., Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., & Eskelinen, E.-L. (2015). Ultrastructural relationship of the phagophore with surrounding organelles. *Autophagy*, *11*(3), 439-451. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1017178>
- Bird, S. W., Maynard, N. D., Covert, M. W., & Kirkegaard, K. (2014). Nonlytic viral spread enhanced by autophagy components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(36), 13081-13086. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401437111>
- Bonifacino, J. S., & Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, *116*(2), 153-166. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)01079-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01079-1)
- Boyle, K. B., & Randow, F. (2013). The role of « eat-me » signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. *Current Opinion in Microbiology*, *16*(3), 339-348. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.03.010>
- Bozic, M., van den Bekerom, L., Milne, B. A., Goodman, N., Roberston, L., Prescott, A. R., Macartney, T. J., Dawe, N., & McEwan, D. G. (2020). A conserved ATG2-GABARAP family interaction is critical for phagophore formation. *EMBO Reports*, *21*(3), e48412. <https://doi.org/10.15252/embr.201948412>
- Bresnahan, W. A., & Shenk, T. E. (2000). UL82 virion protein activates expression of immediate early viral genes in human cytomegalovirus-infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(26), 14506-14511. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14506>
- Britt, W. (2008). Manifestations of Human Cytomegalovirus Infection: Proposed Mechanisms of Acute and Chronic Disease. In T. Shenk & M. F. Stinski (Éds.), *Human Cytomegalovirus* (Vol. 325, p. 417-470). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Britt, W. J., & Prichard, M. N. (2018). New therapies for human cytomegalovirus infections. *Antiviral Research*, *159*, 153-174. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.09.003>
- Brock, I., Krüger, M., Mertens, T., & von Einem, J. (2013). Nuclear Targeting of Human Cytomegalovirus Large Tegument Protein pUL48 Is Essential for Viral Growth. *Journal of Virology*, *87*(10), 6005-6019. <https://doi.org/10.1128/JVI.03558-12>
- Brooks, P., Fuertes, G., Murray, R. Z., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M. C., Hendil, K. B., Tanaka, K., Dyson, J., & Rivett, J. (2000). Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *The Biochemical Journal*, *346 Pt 1*, 155-161.
- Buchkovich, N. J., Maguire, T. G., Paton, A. W., Paton, J. C., & Alwine, J. C. (2009). The endoplasmic reticulum chaperone BiP/GRP78 is important in the structure and function of the human cytomegalovirus assembly compartment. *Journal of Virology*, *83*(22), 11421-11428. <https://doi.org/10.1128/JVI.00762-09>
- Buckingham, E. M., Jarosinski, K. W., Jackson, W., Carpenter, J. E., & Grose, C. (2016). Exocytosis of Varicella-Zoster Virus Virions Involves a Convergence of Endosomal and Autophagy Pathways. *Journal of Virology*, *90*(19), 8673-8685. <https://doi.org/10.1128/JVI.00915-16>
- Butcher, S. J., Aitken, J., Mitchell, J., Gowen, B., & Dargan, D. J. (1998). Structure of the Human Cytomegalovirus B Capsid by Electron Cryomicroscopy and Image Reconstruction. *Journal of Structural Biology*, *124*, 70-76. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.4055>
- Castillo, J. P., & Kowalik, T. F. (2002). Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene*, *290*(1-2), 19-34. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00566-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00566-8)
- Cepeda, V., Esteban, M., & Fraile-Ramos, A. (2010). Human cytomegalovirus final envelopment on membranes containing both trans-Golgi network and endosomal markers. *Cellular Microbiology*, *12*(3), 386-404. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01405.x>
- Chaumorcel, M., Lussignol, M., Mouna, L., Cavignac, Y., Fahie, K., Cotte-Laffitte, J., Geballe, A., Brune, W., Beau, I., Codogno, P., & Esclatine, A. (2012). The human cytomegalovirus protein TRS1 inhibits autophagy via its interaction with Beclin 1. *Journal of Virology*, *86*(5), 2571-2584. <https://doi.org/10.1128/JVI.05746-11>

- Chaumorcel, M., Souquère, S., Pierron, G., Codogno, P., & Esclatine, A. (2008). Human cytomegalovirus controls a new autophagy-dependent cellular antiviral defense mechanism. *Autophagy*, 4(1), 46-53. <https://doi.org/10.4161/auto.5184>
- Chen, D. H., Jiang, H., Lee, M., Liu, F., & Zhou, Z. H. (1999). Three-Dimensional Visualization of Tegument/Capsid Interactions in the Intact Human Cytomegalovirus. *Virology*, 260, 10-16. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9791>
- Child, S. J., Hakki, M., De Niro, K. L., & Geballe, A. P. (2004). Evasion of cellular antiviral responses by human cytomegalovirus TRS1 and IRS1. *Journal of Virology*, 78(1), 197-205. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.1.197-205.2004>
- Christiaansen, A., Varga, S. M., & Spencer, J. V. (2015). Viral manipulation of the host immune response. *Current Opinion in Immunology*, 36, 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.06.012>
- Coers, J. (2017). Sweet host revenge : Galectins and GBPs join forces at broken membranes. *Cellular Microbiology*, 19(12). <https://doi.org/10.1111/cmi.12793>
- Collins-McMillen, D., Buehler, J., Peppenelli, M., & Goodrum, F. (2018). Molecular Determinants and the Regulation of Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation. *Viruses*, 10(8), 444. <https://doi.org/10.3390/v10080444>
- Cristea, I. M., Moorman, N. J., Terhune, S. S., Cuevas, C. D., O'Keefe, E. S., Rout, M. P., Chait, B. T., & Shenk, T. (2010). Human cytomegalovirus pUL83 stimulates activity of the viral immediate-early promoter through its interaction with the cellular IFI16 protein. *Journal of Virology*, 84(15), 7803-7814. <https://doi.org/10.1128/JVI.00139-10>
- Crow, M. S., Lum, K. K., Sheng, X., Song, B., & Cristea, I. M. (2016). Diverse mechanisms evolved by DNA viruses to inhibit early host defenses. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 51(6), 452-481. <https://doi.org/10.1080/10409238.2016.1226250>
- Cuervo, A. M., & Dice, J. F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5274), 501-503. <https://doi.org/10.1126/science.273.5274.501>
- Dai, X., Yu, X., Gong, H., Jiang, X., Abenes, G., Liu, H., Shivakoti, S., Britt, W. J., Zhu, H., Liu, F., & Zhou, Z. H. (2013). The Smallest Capsid Protein Mediates Binding of the Essential Tegument Protein pp150 to Stabilize DNA-Containing Capsids in Human Cytomegalovirus. *PLOS Pathogens*, 9(8), e1003525. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003525>
- Das, S., Vasanthi, A., & Pellett, P. E. (2007). Three-Dimensional Structure of the Human Cytomegalovirus Cytoplasmic Virion Assembly Complex Includes a Reoriented Secretory Apparatus. *Journal of Virology*, 81(21), 11861-11869. <https://doi.org/10.1128/JVI.01077-07>
- Das, Subhendu, Ortiz, D. A., Gurczynski, S. J., Khan, F., & Pellett, P. E. (2014). Identification of Human Cytomegalovirus Genes Important for Biogenesis of the Cytoplasmic Virion Assembly Complex. *Journal of Virology*, 88(16), 9086-9099. <https://doi.org/10.1128/JVI.01141-14>
- Das, Subhendu, & Pellett, P. E. (2011). Spatial relationships between markers for secretory and endosomal machinery in human cytomegalovirus-infected cells versus those in uninfected cells. *Journal of Virology*, 85(12), 5864-5879. <https://doi.org/10.1128/JVI.00155-11>
- Das, Subhendu, Vasanthi, A., & Pellett, P. E. (2007). Three-dimensional structure of the human cytomegalovirus cytoplasmic virion assembly complex includes a reoriented secretory apparatus. *Journal of Virology*, 81(21), 11861-11869. <https://doi.org/10.1128/JVI.01077-07>
- De Duve, C., & Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annual Review of Physiology*, 28, 435-492. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.28.030166.002251>
- De Tito, S., Hervás, J. H., van Vliet, A. R., & Tooze, S. A. (2020). The Golgi as an Assembly Line to the Autophagosome. *Trends in Biochemical Sciences*, 45(6), 484-496. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.03.010>

- de Waal, E. J., Vreeling-Sindelárová, H., Schellens, J. P., Houtkooper, J. M., & James, J. (1986). Quantitative changes in the lysosomal vacuolar system of rat hepatocytes during short-term starvation. A morphometric analysis with special reference to macro- and microautophagy. *Cell and Tissue Research*, 243(3), 641-648. <https://doi.org/10.1007/BF00218073>
- Delgado, M. A., Elmaoued, R. A., Davis, A. S., Kyei, G., & Deretic, V. (2008). Toll-like receptors control autophagy. *The EMBO Journal*, 27(7), 1110-1121. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.31>
- Deretic, V., & Levine, B. (2018). Autophagy balances inflammation in innate immunity. *Autophagy*, 14(2), 243-251. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1402992>
- Diao, J., Liu, R., Rong, Y., Zhao, M., Zhang, J., Lai, Y., Zhou, Q., Wilz, L. M., Li, J., Vivona, S., Pfuetzner, R. A., Brunger, A. T., & Zhong, Q. (2015). ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature*, 520(7548), 563-566. <https://doi.org/10.1038/nature14147>
- Dice, J. F. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 15(8), 305-309. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90019-8](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90019-8)
- Ding, B., Zhang, G., Yang, X., Zhang, S., Chen, L., Yan, Q., Xu, M., Banerjee, A. K., & Chen, M. (2014). Phosphoprotein of human parainfluenza virus type 3 blocks autophagosome-lysosome fusion to increase virus production. *Cell Host & Microbe*, 15(5), 564-577. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.004>
- Dolan, A., Cunningham, C., Hector, R. D., Hassan-Walker, A. F., Lee, L., Addison, C., Dargan, D. J., McGeoch, D. J., Gatherer, D., Emery, V. C., Griffiths, P. D., Sinzger, C., McSharry, B. P., Wilkinson, G. W. G., & Davison, A. J. (2004). Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *The Journal of General Virology*, 85(Pt 5), 1301-1312. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79888-0>
- Döring, T., Zeyen, L., Bartusch, C., & Prange, R. (2018). Hepatitis B Virus Subverts the Autophagy Elongation Complex Atg5-12/16L1 and Does Not Require Atg8/LC3 Lipidation for Viral Maturation. *Journal of Virology*, 92(7). <https://doi.org/10.1128/JVI.01513-17>
- Duke, E. M. H., Razi, M., Weston, A., Guttmann, P., Werner, S., Henzler, K., Schneider, G., Tooze, S. A., & Collinson, L. M. (2014). Imaging endosomes and autophagosomes in whole mammalian cells using correlative cryo-fluorescence and cryo-soft X-ray microscopy (cryo-CLXM). *Ultramicroscopy*, 143, 77-87. <https://doi.org/10.1016/j.ultramicro.2013.10.006>
- Elek, S. D., & Stern, H. (1974). Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. *Lancet (London, England)*, 1(7845), 1-5. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(74\)92997-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(74)92997-3)
- Esclatine, A., Bellon, A., Michelson, S., Servin, A. L., Quéro, A. M., & Géniteau-Legendre, M. (2001). Differentiation-dependent redistribution of heparan sulfate in epithelial intestinal Caco-2 cells leads to basolateral entry of cytomegalovirus. *Virology*, 289(1), 23-33. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1122>
- Eskelinen, E.-L. (2008). To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells. *Autophagy*, 4(2), 257-260. <https://doi.org/10.4161/auto.5179>
- Fader, C. M., & Colombo, M. I. (2009). Autophagy and multivesicular bodies: Two closely related partners. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 70-78. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.168>
- Fahmy, A. M., Khabir, M., Blanchet, M., & Labonté, P. (2018). LC3B is not recruited along with the autophagy elongation complex (ATG5-12/16L1) at HCV replication site and is dispensable for viral replication. *PloS One*, 13(10), e0205189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205189>
- Faure, M., & Lafont, F. (2013). Pathogen-induced autophagy signaling in innate immunity. *Journal of Innate Immunity*, 5(5), 456-470. <https://doi.org/10.1159/000350918>

- Fimia, G. M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., Gruss, P., Piacentini, M., Chowdhury, K., & Cecconi, F. (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*, *447*(7148), 1121-1125. <https://doi.org/10.1038/nature05925>
- Fogliarini, M., Marcandalli, J., & Perez, L. (2019). HCMV Envelope Glycoprotein Diversity Demystified. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01005>
- Fraile-Ramos, A., Pelchen-Matthews, A., Kledal, T. N., Browne, H., Schwartz, T. W., & Marsh, M. (2002). Localization of HCMV UL33 and US27 in endocytic compartments and viral membranes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *3*(3), 218-232. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.030307.x>
- Fraile-Ramos, A., Pelchen-Matthews, A., Risco, C., Rejas, M. T., Emery, V. C., Hassan-Walker, A. F., Esteban, M., & Marsh, M. (2007). The ESCRT machinery is not required for human cytomegalovirus envelopment. *Cellular Microbiology*, *9*(12), 2955-2967. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01024.x>
- Frascaroli, G., & Sinzger, C. (2014). Distinct properties of human cytomegalovirus strains and the appropriate choice of strains for particular studies. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1119*, 29-46. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-788-4_3
- Ganley, I. G., Lam, D. H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., & Jiang, X. (2009). ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(18), 12297-12305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900573200>
- Gannagé, M., Dormann, D., Albrecht, R., Dengjel, J., Torossi, T., Rämer, P. C., Lee, M., Strowig, T., Arrey, F., Conenello, G., Pypaert, M., Andersen, J., García-Sastre, A., & Münz, C. (2009). Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host & Microbe*, *6*(4), 367-380. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.09.005>
- Ge, L., Melville, D., Zhang, M., & Schekman, R. (2013). The ER-Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *ELife*, *2*, e00947. <https://doi.org/10.7554/eLife.00947>
- Gelbmann, C. B., & Kalejta, R. F. (2019). The Golgi sorting motifs of human cytomegalovirus UL138 are not required for latency maintenance. *Virus Research*, *270*, 197646. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197646>
- Geng, J., Nair, U., Yasumura-Yorimitsu, K., & Klionsky, D. J. (2010). Post-Golgi Sec proteins are required for autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, *21*(13), 2257-2269. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-11-0969>
- Gerna, G., Kabanova, A., & Lilleri, D. (2019). Human Cytomegalovirus Cell Tropism and Host Cell Receptors. *Vaccines*, *7*(3), 70. <https://doi.org/10.3390/vaccines7030070>
- Gibson, W. (2008). Structure and Formation of the Cytomegalovirus Virion. In T. Shenk & M. F. Stinski (Éds.), *Human Cytomegalovirus* (Vol. 325, p. 187-204). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Gilbert, G. L., Hayes, K., Hudson, I. L., & James, J. (1989). Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infection in infants by blood filtration to remove leucocytes. Neonatal Cytomegalovirus Infection Study Group. *Lancet (London, England)*, *1*(8649), 1228-1231. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)92330-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)92330-1)
- Girsch, J. H., Jackson, W., Carpenter, J. E., Moninger, T. O., Jarosinski, K. W., & Grose, C. (2020). Exocytosis of Progeny Infectious Varicella-Zoster Virus Particles via a Mannose-6-Phosphate Receptor Pathway without Xenophagy following Secondary Envelopment. *Journal of Virology*, *94*(16). <https://doi.org/10.1128/JVI.00800-20>
- Girsch, J. H., Walters, K., Jackson, W., & Grose, C. (2019). Progeny Varicella-Zoster Virus Capsids Exit the Nucleus but Never Undergo Secondary Envelopment during Autophagic Flux Inhibition by Bafilomycin A1. *Journal of Virology*, *93*(17). <https://doi.org/10.1128/JVI.00505-19>

- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy : Cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*, 221(1), 3-12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>
- Goodrum, F., Caviness, K., & Zagallo, P. (2012). Human cytomegalovirus persistence. *Cellular Microbiology*, 14(5), 644-655. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01774.x>
- Granato, M., Santarelli, R., Farina, A., Gonnella, R., Lotti, L. V., Faggioni, A., & Cirone, M. (2014). Epstein-barr virus blocks the autophagic flux and appropriates the autophagic machinery to enhance viral replication. *Journal of Virology*, 88(21), 12715-12726. <https://doi.org/10.1128/JVI.02199-14>
- Granzow, H., Klupp, B. G., Fuchs, W., Veits, J., Osterrieder, N., & Mettenleiter, T. C. (2001). Egress of Alphaherpesviruses : Comparative Ultrastructural Study. *Journal of Virology*, 75(8), 3675-3684. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.8.3675-3684.2001>
- Greaves, R. F., & Mocarski, E. S. (1998). Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus iel1 mutant. *Journal of Virology*, 72(1), 366-379.
- Gudleski-O'Regan, N., Greco, T. M., Cristea, I. M., & Shenk, T. (2012). Increased Expression of LDL Receptor-Related Protein 1 during Human Cytomegalovirus Infection Reduces Virion Cholesterol and Infectivity. *Cell Host & Microbe*, 12(1), 86-96. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.05.012>
- Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K., & Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, 141(4), 656-667. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.009>
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Amano, A., & Yoshimori, T. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 495(7441), 389-393. <https://doi.org/10.1038/nature11910>
- Hansen, M. D., Johnsen, I. B., Stiberg, K. A., Sherstova, T., Wakita, T., Richard, G. M., Kandasamy, R. K., Meurs, E. F., & Anthonsen, M. W. (2017). Hepatitis C virus triggers Golgi fragmentation and autophagy through the immunity-related GTPase M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(17), E3462-E3471. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616683114>
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., & Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nature Cell Biology*, 11(12), 1433-1437. <https://doi.org/10.1038/ncb1991>
- Heaton, N. S., & Randall, G. (2010). Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host & Microbe*, 8(5), 422-432. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.10.006>
- Heckmann, B. L., & Green, D. R. (2019). LC3-associated phagocytosis at a glance. *Journal of Cell Science*, 132(5). <https://doi.org/10.1242/jcs.222984>
- Homman-Loudiyi, M., Hultenby, K., Britt, W., & Söderberg-Nauclér, C. (2003). Envelopment of human cytomegalovirus occurs by budding into Golgi-derived vacuole compartments positive for gB, Rab 3, trans-golgi network 46, and mannosidase II. *Journal of Virology*, 77(5), 3191-3203. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.5.3191-3203.2003>
- Irmiere, A., & Gibson, W. (1983). Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology*, 130(1), 118-133. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90122-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90122-8)
- Isaacson, M. K., Juckem, L. K., & Compton, T. (2008). Virus Entry and Innate Immune Activation. In T. Shenk & M. F. Stinski (Éds.), *Human Cytomegalovirus* (Vol. 325, p. 85-100). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_5
- Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., & Mizushima, N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular Biology of the Cell*, 19(12), 5360-5372. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-01-0080>

- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., & Mizushima, N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*, *151*(6), 1256-1269. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.001>
- Itakura, E., & Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy*, *6*(6), 764-776. <https://doi.org/10.4161/auto.6.6.12709>
- Itoh, T., Fujita, N., Kanno, E., Yamamoto, A., Yoshimori, T., & Fukuda, M. (2008). Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(7), 2916-2925. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-12-1231>
- Jackson, W. T., Giddings, T. H., Taylor, M. P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R. R., & Kirkegaard, K. (2005). Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biology*, *3*(5), e156. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030156>
- Jahn, R., & Scheller, R. H. (2006). SNAREs—Engines for membrane fusion. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *7*(9), 631-643. <https://doi.org/10.1038/nrm2002>
- Jean Beltran, P. M., Mathias, R. A., & Cristea, I. M. (2016). A Portrait of the Human Organelle Proteome In Space and Time during Cytomegalovirus Infection. *Cell Systems*, *3*(4), 361-373.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.08.012>
- Jean, S., & Kiger, A. A. (2012). Coordination between RAB GTPase and phosphoinositide regulation and functions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *13*(7), 463-470. <https://doi.org/10.1038/nrm3379>
- Joachim, J., Jefferies, H. B. J., Razi, M., Frith, D., Snijders, A. P., Chakravarty, P., Judith, D., & Tooze, S. A. (2015). Activation of ULK Kinase and Autophagy by GABARAP Trafficking from the Centrosome Is Regulated by WAC and GM130. *Molecular Cell*, *60*(6), 899-913. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.11.018>
- Johansen, T., & Lamark, T. (2020). Selective Autophagy : ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. *Journal of Molecular Biology*, *432*(1), 80-103. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.07.016>
- Johnson, D. C., & Baines, J. D. (2011). Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(5), 382-394. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2559>
- Joo, J. H., Wang, B., Frankel, E., Ge, L., Xu, L., Iyengar, R., Li-Harms, X., Wright, C., Shaw, T. I., Lindsten, T., Green, D. R., Peng, J., Hendershot, L. M., Kilic, F., Sze, J. Y., Audhya, A., & Kundu, M. (2016). The Noncanonical Role of ULK/ATG1 in ER-to-Golgi Trafficking Is Essential for Cellular Homeostasis. *Molecular Cell*, *62*(4), 491-506. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.020>
- Kabanova, A., Marcandalli, J., Zhou, T., Bianchi, S., Baxa, U., Tsybovsky, Y., Lilleri, D., Silacci-Fregni, C., Foglierini, M., Fernandez-Rodriguez, B. M., Druz, A., Zhang, B., Geiger, R., Pagani, M., Sallusto, F., Kwong, P. D., Corti, D., Lanzavecchia, A., & Perez, L. (2016). Platelet-derived growth factor- α receptor is the cellular receptor for human cytomegalovirus gHgLgO trimer. *Nature Microbiology*, *1*(8), 1-8. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.82>
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of Cell Science*, *117*(Pt 13), 2805-2812. <https://doi.org/10.1242/jcs.01131>
- Kalejta, R. F. (2008). Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *72*(2), 249-265. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-07>
- Kalejta, R. F., & Albright, E. R. (2020). Expanding the Known Functional Repertoire of the Human Cytomegalovirus pp71 Protein. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 95. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00095>

- Kalvari, I., Tsompanis, S., Mulakkal, N. C., Osgood, R., Johansen, T., Nezis, I. P., & Promponas, V. J. (2014). iLIR : A web resource for prediction of Atg8-family interacting proteins. *Autophagy*, *10*(5), 913-925. <https://doi.org/10.4161/auto.28260>
- Khaminets, A., Behl, C., & Dikic, I. (2016). Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends in Cell Biology*, *26*(1), 6-16. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.010>
- Kim, S.-J., Syed, G. H., & Siddiqui, A. (2013). Hepatitis C virus induces the mitochondrial translocation of Parkin and subsequent mitophagy. *PLoS Pathogens*, *9*(3), e1003285. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003285>
- 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., Adihetty, P. J., Adler, S. G., Agam, G., Agarwal, R., Aghi, M. K., Agnello, M., Agostinis, P., Aguilar, P. V., Aguirre-Ghiso, J., ... Zughaier, S. M. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, *12*(1), 1-222. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>
- 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., & Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell*, *5*(4), 539-545. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00296-x](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00296-x)
- Klionsky, D. J., & Eskelinen, E.-L. (2014). The vacuole versus the lysosome : When size matters. *Autophagy*, *10*(2), 185-187. <https://doi.org/10.4161/auto.27367>
- Knorr, R. L., Lipowsky, R., & Dimova, R. (2015). Autophagosome closure requires membrane scission. *Autophagy*, *11*(11), 2134-2137. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1091552>
- Koepke, L., Gack, M. U., & Sparrer, K. M. (2020). The antiviral activities of TRIM proteins. *Current Opinion in Microbiology*, *59*, 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.07.005>
- Koyuncu, E., Purdy, J. G., Rabinowitz, J. D., & Shenk, T. (2013). Saturated very long chain fatty acids are required for the production of infectious human cytomegalovirus progeny. *PLoS Pathogens*, *9*(5), e1003333. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003333>
- Krakauer, T. (2019). Inflammasomes, Autophagy, and Cell Death : The Trinity of Innate Host Defense against Intracellular Bacteria. *Mediators of Inflammation*, *2019*, 2471215. <https://doi.org/10.1155/2019/2471215>
- Lai, S.-C., & Devenish, R. J. (2012). LC3-Associated Phagocytosis (LAP) : Connections with Host Autophagy. *Cells*, *1*(3), 396-408. <https://doi.org/10.3390/cells1030396>
- Laine, R. F., Albecka, A., van de Linde, S., Rees, E. J., Crump, C. M., & Kaminski, C. F. (2015). Structural analysis of herpes simplex virus by optical super-resolution imaging. *Nature Communications*, *6*(1), 5980. <https://doi.org/10.1038/ncomms6980>
- Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., & Lembo, D. (2003). The human cytomegalovirus. *Pharmacology & Therapeutics*, *98*(3), 269-297. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(03\)00034-2](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(03)00034-2)
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). MTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, *149*(2), 274-293. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- Leervers, S. J., Vanhaesebroeck, B., & Waterfield, M. D. (1999). Signalling through phosphoinositide 3-kinases : The lipids take centre stage. *Current Opinion in Cell Biology*, *11*(2), 219-225. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(99\)80029-5](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(99)80029-5)
- Lei, Y., & Klionsky, D. J. (2020). Scission, a critical step in autophagosome formation. *Autophagy*, *16*(8), 1363-1365. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1779468>
- Leruez-Ville, M., Ouachée, M., Delarue, R., Sauget, A.-S., Blanche, S., Buzyn, A., & Rouzioux, C. (2003). Monitoring cytomegalovirus infection in adult and pediatric bone marrow transplant recipients by a real-time PCR assay performed with blood plasma. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(5), 2040-2046. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.5.2040-2046.2003>

- Levine, B., Liu, R., Dong, X., & Zhong, Q. (2015). Beclin orthologs: Integrative hubs of cell signaling, membrane trafficking, and physiology. *Trends in Cell Biology*, 25(9), 533-544. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.05.004>
- Levine, B., & Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: An innocent convict? *The Journal of Clinical Investigation*, 115(10), 2679-2688. <https://doi.org/10.1172/JCI26390>
- Li, J., Liu, Y., Wang, Z., Liu, K., Wang, Y., Liu, J., Ding, H., & Yuan, Z. (2011). Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment. *Journal of Virology*, 85(13), 6319-6333. <https://doi.org/10.1128/JVI.02627-10>
- Liu, S. T. H., Sharon-Friling, R., Ivanova, P., Milne, S. B., Myers, D. S., Rabinowitz, J. D., Brown, H. A., & Shenk, T. (2011). Synaptic vesicle-like lipidome of human cytomegalovirus virions reveals a role for SNARE machinery in virion egress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31), 12869-12874. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109796108>
- Loret, S., Guay, G., & Lippé, R. (2008). Comprehensive Characterization of Extracellular Herpes Simplex Virus Type 1 Virions. *Journal of Virology*, 82(17), 8605-8618. <https://doi.org/10.1128/JVI.00904-08>
- Lőrincz, P., & Juhász, G. (2020). Autophagosome-Lysosome Fusion. *Journal of Molecular Biology*, 432(8), 2462-2482. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.10.028>
- Lu, M., & Shenk, T. (1999). Human Cytomegalovirus UL69 Protein Induces Cells To Accumulate in G1 Phase of the Cell Cycle. *Journal of Virology*, 73(1), 676-683.
- Madjo, U., Leymarie, O., Frémont, S., Kuster, A., Nehlich, M., Gallois-Montbrun, S., Janvier, K., & Berlioz-Torrent, C. (2016). LC3C Contributes to Vpu-Mediated Antagonism of BST2/Tetherin Restriction on HIV-1 Release through a Non-canonical Autophagy Pathway. *Cell Reports*, 17(9), 2221-2233. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.045>
- Malsam, J., Kreye, S., & Söllner, T. H. (2008). Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 65(18), 2814-2832. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8352-3>
- Mandell, M. A., Jain, A., Arko-Mensah, J., Chauhan, S., Kimura, T., Dinkins, C., Silvestri, G., Münch, J., Kirchhoff, F., Simonsen, A., Wei, Y., Levine, B., Johansen, T., & Deretic, V. (2014). TRIM proteins regulate autophagy and can target autophagic substrates by direct recognition. *Developmental Cell*, 30(4), 394-409. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.06.013>
- Martens, S., & Fracchiolla, D. (2020). Activation and targeting of ATG8 protein lipidation. *Cell Discovery*, 6, 23. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0155-1>
- Martinez-Martin, N., Marcandalli, J., Huang, C. S., Arthur, C. P., Perotti, M., Foglierini, M., Ho, H., Dosey, A. M., Shriver, S., Payandeh, J., Leitner, A., Lanzavecchia, A., Perez, L., & Ciferri, C. (2018). An Unbiased Screen for Human Cytomegalovirus Identifies Neuropilin-2 as a Central Viral Receptor. *Cell*, 174(5), 1158-1171.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.028>
- Mauthe, M., Langereis, M., Jung, J., Zhou, X., Jones, A., Omta, W., Tooze, S. A., Stork, B., Paludan, S. R., Ahola, T., Egan, D., Behrends, C., Mokry, M., de Haan, C., van Kuppeveld, F., & Reggiori, F. (2016). An siRNA screen for ATG protein depletion reveals the extent of the unconventional functions of the autophagy proteome in virus replication. *The Journal of Cell Biology*, 214(5), 619-635. <https://doi.org/10.1083/jcb.201602046>
- McCrossan, M., Windsor, M., Ponnambalam, S., Armstrong, J., & Wileman, T. (2001). The trans Golgi network is lost from cells infected with African swine fever virus. *Journal of Virology*, 75(23), 11755-11765. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.23.11755-11765.2001>
- McFarlane, S., Aitken, J., Sutherland, J. S., Nicholl, M. J., Preston, V. G., & Preston, C. M. (2011). Early induction of autophagy in human fibroblasts after infection with human cytomegalovirus or herpes simplex virus 1. *Journal of Virology*, 85(9), 4212-4221. <https://doi.org/10.1128/JVI.02435-10>

- McGavran, M. H., & Smith, M. G. (1965). Ultrastructural, cytochemical, and microchemical observations on cytomegalovirus (salivary gland virus) infection of human cells in tissue culture. *Experimental and Molecular Pathology*, 4(1), 1-10. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(65\)90019-5](https://doi.org/10.1016/0014-4800(65)90019-5)
- McMahon, H. T., & Gallop, J. L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*, 438(7068), 590-596. <https://doi.org/10.1038/nature04396>
- Melia, T. J., Lystad, A. H., & Simonsen, A. (2020). Autophagosome biogenesis : From membrane growth to closure. *The Journal of Cell Biology*, 219(6). <https://doi.org/10.1083/jcb.202002085>
- Meshesha, M. K., Bentwich, Z., Solomon, S. A., & Avni, Y. S. (2016). In vivo expression of human cytomegalovirus (HCMV) microRNAs during latency. *Gene*, 575(1), 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.040>
- Mijaljica, D., Prescott, M., & Devenish, R. J. (2011). Microautophagy in mammalian cells : Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 7(7), 673-682. <https://doi.org/10.4161/auto.7.7.14733>
- Milbradt, J., Sonntag, E., Wagner, S., Stojan, H., Wangen, C., Lenac Rovis, T., Lisnic, B., Jonjic, S., Sticht, H., Britt, W. J., Schlötzer-Schrehardt, U., & Marschall, M. (2018). Human Cytomegalovirus Nuclear Capsids Associate with the Core Nuclear Egress Complex and the Viral Protein Kinase pUL97. *Viruses*, 10(1), 35. <https://doi.org/10.3390/v10010035>
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395(6700), 395-398. <https://doi.org/10.1038/26506>
- Mizushima, Noboru. (2007). Autophagy : Process and function. *Genes & Development*, 21(22), 2861-2873. <https://doi.org/10.1101/gad.1599207>
- Mizushima, Noboru, Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069-1075. <https://doi.org/10.1038/nature06639>
- Mizushima, Noboru, Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular Biology of the Cell*, 15(3), 1101-1111. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-09-0704>
- Mizushima, Noboru, Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 107-132. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>
- Mocarski Jr., E. S., Shenk, T., & Pass, R. F. (2007). Cytomegaloviruses. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Éds.), *Fields Virology: Vol. Volume two* (Fifth edition, p. 2701-2772). Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins.
- Mohammad, A.-A., Costa, H., Landázuri, N., Lui, W.-O., Hultenby, K., Rahbar, A., Yaiw, K.-C., & Söderberg-Nauclér, C. (2017). Human cytomegalovirus microRNAs are carried by virions and dense bodies and are delivered to target cells. *The Journal of General Virology*, 98(5), 1058-1072. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000736>
- Mohamud, Y., & Luo, H. (2019). The Intertwined Life Cycles of Enterovirus and Autophagy. *Virulence*, 10(1), 470-480. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1551010>
- Molino, D., Zemirli, N., Codogno, P., & Morel, E. (2017). The Journey of the Autophagosome through Mammalian Cell Organelles and Membranes. *Journal of Molecular Biology*, 429(4), 497-514. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.12.013>
- Montespan, C., Marvin, S. A., Austin, S., Burrage, A. M., Roger, B., Rayne, F., Faure, M., Campell, E. M., Schneider, C., Reimer, R., Grünwald, K., Wiethoff, C. M., & Wodrich, H. (2017). Multi-layered control of Galectin-8 mediated autophagy during adenovirus cell entry through a conserved PPxY motif in the viral capsid. *PLoS Pathogens*, 13(2), e1006217. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006217>

- Montespan, C., Wiethoff, C. M., & Wodrich, H. (2017). A Small Viral PPxY Peptide Motif To Control Antiviral Autophagy. *Journal of Virology*, *91*(18). <https://doi.org/10.1128/JVI.00581-17>
- Moorman, N. J., Sharon-Friling, R., Shenk, T., & Cristea, I. M. (2010). A Targeted Spatial-Temporal Proteomics Approach Implicates Multiple Cellular Trafficking Pathways in Human Cytomegalovirus Virion Maturation. *Molecular & Cellular Proteomics*, *9*(5), 851-860. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900485-MCP200>
- Mouna, L., Hernandez, E., Bonte, D., Brost, R., Amazit, L., Delgui, L. R., Brune, W., Geballe, A. P., Beau, I., & Esclatine, A. (2016). Analysis of the role of autophagy inhibition by two complementary human cytomegalovirus BECN1/Beclin 1-binding proteins. *Autophagy*, *12*(2), 327-342. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1125071>
- Mourez, T., Burrell, S., Boutolleau, D., & Pillet, S. (2019). *Traité de Virologie Médicale* (SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE, Vol. 1-3ème édition).
- Mousnier, A., Swieboda, D., Pinto, A., Guedán, A., Rogers, A. V., Walton, R., Johnston, S. L., & Solari, R. (2014). Human rhinovirus 16 causes Golgi apparatus fragmentation without blocking protein secretion. *Journal of Virology*, *88*(20), 11671-11685. <https://doi.org/10.1128/JVI.01170-14>
- Munger, J., Bajad, S. U., Collier, H. A., Shenk, T., & Rabinowitz, J. D. (2006). Dynamics of the Cellular Metabolome during Human Cytomegalovirus Infection. *PLOS Pathogens*, *2*(12), e132. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020132>
- Münz, C. (2012). Antigen Processing for MHC Class II Presentation via Autophagy. *Frontiers in Immunology*, *3*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00009>
- Muranyi, W., Haas, J., Wagner, M., Krohne, G., & Koszinowski, U. H. (2002). Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science (New York, N.Y.)*, *297*(5582), 854-857. <https://doi.org/10.1126/science.1071506>
- Murphy, E. A., & Shenk, T. E. (2008). Human Cytomegalovirus Genome. In T. Shenk & M. F. Stinski (Éds.), *Human Cytomegalovirus* (Vol. 325, p. 1-19). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Mutsafi, Y., & Altan-Bonnet, N. (2018). Enterovirus Transmission by Secretory Autophagy. *Viruses*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/v10030139>
- Nabi, I. R., Shankar, J., & Dennis, J. W. (2015). The galectin lattice at a glance. *Journal of Cell Science*, *128*(13), 2213-2219. <https://doi.org/10.1242/jcs.151159>
- Nakamura, T., Furuhashi, M., Li, P., Cao, H., Tuncman, G., Sonenberg, N., Gorgun, C. Z., & Hotamisligil, G. S. (2010). Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell*, *140*(3), 338-348. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.001>
- Nakatogawa, H. (2020). Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *21*(8), 439-458. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0241-0>
- Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., & Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *Journal of Biosciences*, *31*(1), 137-155. <https://doi.org/10.1007/BF02705243>
- Nguyen, N., Shteyn, V., & Melia, T. J. (2017). Sensing Membrane Curvature in Macroautophagy. *Journal of Molecular Biology*, *429*(4), 457-472. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.01.006>
- Nowag, H., Guhl, B., Thriene, K., Romao, S., Ziegler, U., Dengjel, J., & Münz, C. (2014). Macroautophagy Proteins Assist Epstein Barr Virus Production and Get Incorporated Into the Virus Particles. *EBioMedicine*, *1*(2-3), 116-125. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2014.11.007>
- Ogawa-Goto, K., Tanaka, K., Gibson, W., Moriishi, E., Miura, Y., Kurata, T., Irie, S., & Sata, T. (2003). Microtubule Network Facilitates Nuclear Targeting of Human Cytomegalovirus Capsid. *Journal of Virology*, *77*(15), 8541-8547. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.15.8541-8547.2003>
- Orhon, I., Dupont, N., Zaidan, M., Boitez, V., Burtin, M., Schmitt, A., Capiod, T., Viau, A., Beau, I., Kuehn, E. W., Friedlander, G., Terzi, F., & Codogno, P. (2016). Primary-cilium-dependent

- autophagy controls epithelial cell volume in response to fluid flow. *Nature Cell Biology*, 18(6), 657-667. <https://doi.org/10.1038/ncb3360>
- Orsi, A., Razi, M., Dooley, H. C., Robinson, D., Weston, A. E., Collinson, L. M., & Tooze, S. A. (2012). Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 23(10), 1860-1873. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-09-0746>
- Orvedahl, A., Alexander, D., Tallóczy, Z., Sun, Q., Wei, Y., Zhang, W., Burns, D., Leib, D. A., & Levine, B. (2007). HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host & Microbe*, 1(1), 23-35. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2006.12.001>
- Orvedahl, A., MacPherson, S., Sumpter, R., Tallóczy, Z., Zou, Z., & Levine, B. (2010). Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host & Microbe*, 7(2), 115-127. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.01.007>
- Orvedahl, A., Sumpter, R., Xiao, G., Ng, A., Zou, Z., Tang, Y., Narimatsu, M., Gilpin, C., Sun, Q., Roth, M., Forst, C. V., Wrana, J. L., Zhang, Y. E., Luby-Phelps, K., Xavier, R. J., Xie, Y., & Levine, B. (2011). Image-based genome-wide siRNA screen identifies selective autophagy factors. *Nature*, 480(7375), 113-117. <https://doi.org/10.1038/nature10546>
- Ostermann, E., Spohn, M., Indenbirken, D., & Brune, W. (2016). Complete Genome Sequence of a Human Cytomegalovirus Strain AD169 Bacterial Artificial Chromosome Clone. *Genome Announcements*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00091-16>
- Palmer, C. S., Osellame, L. D., Stojanovski, D., & Ryan, M. T. (2011). The regulation of mitochondrial morphology: Intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cellular Signalling*, 23(10), 1534-1545. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.021>
- Patrone, M., Coroadinha, A. S., Teixeira, A. P., & Alves, P. M. (2016). Palmitoylation Strengthens Cholesterol-dependent Multimerization and Fusion Activity of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B (gB). *Journal of Biological Chemistry*, 291(9), 4711-4722. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.682252>
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., & Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6), 927-939. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.002>
- Paul, D., & Bartenschlager, R. (2013). Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World Journal of Virology*, 2(2), 32-48. <https://doi.org/10.5501/wjv.v2.i2.32>
- Paul, P., & Münz, C. (2016). Autophagy and Mammalian Viruses: Roles in Immune Response, Viral Replication, and Beyond. *Advances in Virus Research*, 95, 149-195. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.02.002>
- Paulus, C., & Nevels, M. (2009). The Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Proteins as Antagonists of Intrinsic and Innate Antiviral Host Responses. *Viruses*, 1(3), 760-779. <https://doi.org/10.3390/v1030760>
- Pellet, P. E., & Roizman, B. (2007). The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Éds.), *Fields Virology: Vol. Volume two* (Fifth edition, p. 2479-2499). Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins.
- Pengo, N., Agrotis, A., Prak, K., Jones, J., & Ketteler, R. (2017). A reversible phospho-switch mediated by ULK1 regulates the activity of autophagy protease ATG4B. *Nature Communications*, 8(1), 294. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00303-2>
- Pirooz, S. D., He, S., Zhang, T., Zhang, X., Zhao, Z., Oh, S., O'Connell, D., Khalilzadeh, P., Amini-Bavil-Olyae, S., Farzan, M., & Liang, C. (2014). UVRAG is required for virus entry through combinatorial interaction with the class C-Vps complex and SNAREs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(7), 2716-2721. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320629111>

- Plotkin, S. A., Furukawa, T., Zygraich, N., & Huygelen, C. (1975). Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination. *Infection and Immunity*, *12*(3), 521-527. <https://doi.org/10.1128/IAI.12.3.521-527.1975>
- Polson, H. E. J., de Lartigue, J., Rigden, D. J., Reedijk, M., Urbé, S., Clague, M. J., & Tooze, S. A. (2010). Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy*, *6*(4), 506-522. <https://doi.org/10.4161/auto.6.4.11863>
- Ponpuak, M., Mandell, M. A., Kimura, T., Chauhan, S., Cleyrat, C., & Deretic, V. (2015). Secretory autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, *35*, 106-116. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.04.016>
- Preta, G., Cronin, J. G., & Sheldon, I. M. (2015). Dynasore—Not just a dynamin inhibitor. *Cell Communication and Signaling: CCS*, *13*, 24. <https://doi.org/10.1186/s12964-015-0102-1>
- Procter, D. J., Banerjee, A., Nukui, M., Kruse, K., Gaponenko, V., Murphy, E. A., Komarova, Y., & Walsh, D. (2018). The HCMV Assembly Compartment Is a Dynamic Golgi-Derived MTOC that Controls Nuclear Rotation and Virus Spread. *Developmental Cell*, *45*(1), 83-100.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.03.010>
- Puri, C., Vicinanza, M., Ashkenazi, A., Gratian, M. J., Zhang, Q., Bento, C. F., Renna, M., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2018). The RAB11A-Positive Compartment Is a Primary Platform for Autophagosome Assembly Mediated by WIPI2 Recognition of PI3P-RAB11A. *Developmental Cell*, *45*(1), 114-131.e8. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.03.008>
- Ramanan, P., & Razonable, R. R. (2013). Cytomegalovirus Infections in Solid Organ Transplantation : A Review. *Infection & Chemotherapy*, *45*(3), 260-271. <https://doi.org/10.3947/ic.2013.45.3.260>
- Rane, S., Nada, R., Minz, M., Sakhuja, V., & Joshi, K. (2012). Spectrum of Cytomegalovirus-Induced Renal Pathology in Renal Allograft Recipients. *Transplantation Proceedings*, *44*(3), 713-716. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.11.052>
- Ravenhill, B. J., Boyle, K. B., von Muhlinen, N., Ellison, C. J., Masson, G. R., Otten, E. G., Foeglein, A., Williams, R., & Randow, F. (2019). The Cargo Receptor NDP52 Initiates Selective Autophagy by Recruiting the ULK Complex to Cytosol-Invading Bacteria. *Molecular Cell*, *74*(2), 320-329.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.041>
- Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., & Rubinsztein, D. C. (2010). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nature Cell Biology*, *12*(8), 747-757. <https://doi.org/10.1038/ncb2078>
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J. E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z. W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V. I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D. C. O., Menzies, F. M., Moreau, K., Narayanan, U., Renna, M., Siddiqi, F. H., Underwood, B. R., Winslow, A. R., & Rubinsztein, D. C. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, *90*(4), 1383-1435. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2009>
- Rebmann, G. M., Grabski, R., Sanchez, V., & Britt, W. J. (2016). Phosphorylation of Golgi Peripheral Membrane Protein Grasp65 Is an Integral Step in the Formation of the Human Cytomegalovirus Cytoplasmic Assembly Compartment. *MBio*, *7*(5), e01554-16, [/mbio/7/5/e01554-16.atom](https://doi.org/10.1128/mBio.01554-16). <https://doi.org/10.1128/mBio.01554-16>
- Reeves, M., & Sinclair, J. (2008). Aspects of Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation. In T. Shenk & M. F. Stinski (Éds.), *Human Cytomegalovirus* (Vol. 325, p. 297-313). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8>
- Reeves, Matthew, Woodhall, D., Compton, T., & Sinclair, J. (2010). Human cytomegalovirus IE72 protein interacts with the transcriptional repressor hDaxx to regulate LUNA gene expression during lytic infection. *Journal of Virology*, *84*(14), 7185-7194. <https://doi.org/10.1128/JVI.02231-09>

- Reggiori, F., & Klionsky, D. J. (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryotic Cell*, 1(1), 11-21. <https://doi.org/10.1128/ec.01.1.11-21.2002>
- Reggiori, F., & Klionsky, D. J. (2013). Autophagic processes in yeast: Mechanism, machinery and regulation. *Genetics*, 194(2), 341-361. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.149013>
- Roberts, R., & Ktistakis, N. T. (2013). Omegasomes: PI3P platforms that manufacture autophagosomes. *Essays in Biochemistry*, 55, 17-27. <https://doi.org/10.1042/bse0550017>
- Robinson, S. M., Tsueng, G., Sin, J., Mangale, V., Rahawi, S., McIntyre, L. L., Williams, W., Kha, N., Cruz, C., Hancock, B. M., Nguyen, D. P., Sayen, M. R., Hilton, B. J., Doran, K. S., Segall, A. M., Wolkowicz, R., Cornell, C. T., Whitton, J. L., Gottlieb, R. A., & Feuer, R. (2014). Coxsackievirus B exits the host cell in shed microvesicles displaying autophagosomal markers. *PLoS Pathogens*, 10(4), e1004045. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004045>
- Romanowski, M. J., Garrido-Guerrero, E., & Shenk, T. (1997). PIRS1 and pTRS1 are present in human cytomegalovirus virions. *Journal of Virology*, 71(7), 5703-5705.
- Rowe, W. P., Hartley, J. W., Waterman, S., Turner, H. C., & Huebner, R. J. (1956). Cytopathogenic Agent Resembling Human Salivary Gland Virus Recovered from Tissue Cultures of Human Adenoids. *Experimental Biology and Medicine*, 92(2), 418-424. <https://doi.org/10.3181/00379727-92-22497>
- Ryu, J.-K., Jahn, R., & Yoon, T.-Y. (2016). Review: Progresses in understanding N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) mediated disassembly of SNARE complexes. *Biopolymers*, 105(8), 518-531. <https://doi.org/10.1002/bip.22854>
- Sadeghipour, S., & Mathias, R. A. (2017). Herpesviruses hijack host exosomes for viral pathogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 67, 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.03.005>
- Saffert, R. T., Penkert, R. R., & Kalejta, R. F. (2010). Cellular and viral control over the initial events of human cytomegalovirus experimental latency in CD34+ cells. *Journal of Virology*, 84(11), 5594-5604. <https://doi.org/10.1128/JVI.00348-10>
- Sagiv, Y., Legesse-Miller, A., Porat, A., & Elazar, Z. (2000). GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *The EMBO Journal*, 19(7), 1494-1504. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1494>
- Sakai, M., Araki, N., & Ogawa, K. (1989). Lysosomal movements during heterophagy and autophagy: With special reference to nematolysosome and wrapping lysosome. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 12(2), 101-131. <https://doi.org/10.1002/jemt.1060120206>
- Sanchez, V., Greis, K. D., Sztul, E., & Britt, W. J. (2000). Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: Characterization of a potential site of virus assembly. *Journal of Virology*, 74(2), 975-986. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.2.975-986.2000>
- Sanchez, V., Sztul, E., & Britt, W. J. (2000). Human cytomegalovirus pp28 (UL99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment. *Journal of Virology*, 74(8), 3842-3851. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.8.3842-3851.2000>
- Sanchez-Wandelmer, J., Ktistakis, N. T., & Reggiori, F. (2015). ERES: Sites for autophagosome biogenesis and maturation? *Journal of Cell Science*, 128(2), 185-192. <https://doi.org/10.1242/jcs.158758>
- Sánchez-Wandelmer, J., & Reggiori, F. (2017). Atg4 in autophagosome biogenesis. *Oncotarget*, 8(65), 108290-108291. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22714>
- Santos, C. A. Q. (2016). Cytomegalovirus and Other β -Herpesviruses. *Seminars in Nephrology*, 36(5), 351-361. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2016.05.012>

- Schaaf, M. B. E., Keulers, T. G., Vooijs, M. A., & Rouschop, K. M. A. (2016). LC3/GABARAP family proteins: Autophagy-(un)related functions. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(12), 3961-3978. <https://doi.org/10.1096/fj.201600698R>
- Schauflinger, M., Fischer, D., Schreiber, A., Chevillotte, M., Walther, P., Mertens, T., & von Einem, J. (2011). The tegument protein UL71 of human cytomegalovirus is involved in late envelopment and affects multivesicular bodies. *Journal of Virology*, 85(8), 3821-3832. <https://doi.org/10.1128/JVI.01540-10>
- Schauflinger, M., Villinger, C., Mertens, T., Walther, P., & von Einem, J. (2013). Analysis of human cytomegalovirus secondary envelopment by advanced electron microscopy. *Cellular Microbiology*, 15(2), 305-314. <https://doi.org/10.1111/cmi.12077>
- Schöneberg, J., Lee, I.-H., Iwasa, J. H., & Hurley, J. H. (2017). Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 18(1), 5-17. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.121>
- Seo, J.-Y., & Britt, W. J. (2006). Sequence Requirements for Localization of Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp28 to the Virus Assembly Compartment and for Assembly of Infectious Virus. *Journal of Virology*, 80(11), 5611-5626. <https://doi.org/10.1128/JVI.02630-05>
- Seo, J.-Y., & Britt, W. J. (2007). Cytoplasmic Envelopment of Human Cytomegalovirus Requires the Postlocalization Function of Tegument Protein pp28 within the Assembly Compartment. *Journal of Virology*, 81(12), 6536-6547. <https://doi.org/10.1128/JVI.02852-06>
- Seo, J.-Y., & Britt, W. J. (2008). Multimerization of tegument protein pp28 within the assembly compartment is required for cytoplasmic envelopment of human cytomegalovirus. *Journal of Virology*, 82(13), 6272-6287. <https://doi.org/10.1128/JVI.02345-07>
- Seo, J.-Y., Heo, J. A., & Britt, W. J. (2020). Phosphorylation of tegument protein pp28 contributes to trafficking to the assembly compartment in human cytomegalovirus infection. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 58(7), 624-631. <https://doi.org/10.1007/s12275-020-0263-5>
- Shaid, S., Brandts, C. H., Serve, H., & Dikic, I. (2013). Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 20(1), 21-30. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.72>
- Sharma, M., Kamil, J. P., Coughlin, M., Reim, N. I., & Coen, D. M. (2014). Human Cytomegalovirus UL50 and UL53 Recruit Viral Protein Kinase UL97, Not Protein Kinase C, for Disruption of Nuclear Lamina and Nuclear Egress in Infected Cells. *Journal of Virology*, 88(1), 249-262. <https://doi.org/10.1128/JVI.02358-13>
- Sharon-Friling, R., Goodhouse, J., Colberg-Poley, A. M., & Shenk, T. (2006). Human cytomegalovirus pUL37x1 induces the release of endoplasmic reticulum calcium stores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), 19117-19122. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609353103>
- Sharon-Friling, R., & Shenk, T. (2014). Human cytomegalovirus pUL37x1-induced calcium flux activates PKC α , inducing altered cell shape and accumulation of cytoplasmic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(12), E1140-1148. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402515111>
- Shima, T., Kirisako, H., & Nakatogawa, H. (2019). COPII vesicles contribute to autophagosomal membranes. *The Journal of Cell Biology*, 218(5), 1503-1510. <https://doi.org/10.1083/jcb.201809032>
- Shpilka, T., Weidberg, H., Pietrokovski, S., & Elazar, Z. (2011). Atg8: An autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biology*, 12(7), 226. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-7-226>

- Silva, M. C., Yu, Q.-C., Enquist, L., & Shenk, T. (2003). Human cytomegalovirus UL99-encoded pp28 is required for the cytoplasmic envelopment of tegument-associated capsids. *Journal of Virology*, 77(19), 10594-10605. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.19.10594-10605.2003>
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A. M., & Czaja, M. J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 458(7242), 1131-1135. <https://doi.org/10.1038/nature07976>
- Sinha, S., Colbert, C. L., Becker, N., Wei, Y., & Levine, B. (2008). Molecular basis of the regulation of Beclin 1-dependent autophagy by the gamma-herpesvirus 68 Bcl-2 homolog M11. *Autophagy*, 4(8), 989-997. <https://doi.org/10.4161/auto.6803>
- Sintorn, I.-M., Homman-Loudiyi, M., Söderberg-Nauclér, C., & Borgefors, G. (2004). A refined circular template matching method for classification of human cytomegalovirus capsids in TEM images. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 76, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2004.03.006>
- Sinzger, C., Digel, M., & Jahn, G. (2008). Cytomegalovirus Cell Tropism. In T. E. Shenk & M. F. Stinski (Éds.), *Human Cytomegalovirus* (Vol. 325, p. 63-83). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_4
- Sinzger, C., Schmidt, K., Knapp, J., Kahl, M., Beck, R., Waldman, J., Hebart, H., Einsele, H., & Jahn, G. (1999). Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome. *Journal of General Virology*, 80(11), 2867-2877. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-11-2867>
- Sinzger, Christian, Hahn, G., Digel, M., Katona, R., Sampaio, K. L., Messerle, M., Hengel, H., Koszinowski, U., Brune, W., & Adler, B. (2008). Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E. *The Journal of General Virology*, 89(Pt 2), 359-368. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83286-0>
- Smith, J. D., & De Harven, E. (1978). Herpes simplex virus and human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. III. Cytochemical localization of lysosomal enzymes in infected cells. *Journal of Virology*, 26(1), 102-109.
- Smith, M. G. (1956). Propagation in Tissue Cultures of a Cytopathogenic Virus from Human Salivary Gland Virus (SGV) Disease. *Experimental Biology and Medicine*, 92(2), 424-430. <https://doi.org/10.3181/00379727-92-22498>
- Smith, R. M., Kosuri, S., & Kerry, J. A. (2014). Role of human cytomegalovirus tegument proteins in virion assembly. *Viruses*, 6(2), 582-605. <https://doi.org/10.3390/v6020582>
- Søreng, K., Neufeld, T. P., & Simonsen, A. (2018). Membrane Trafficking in Autophagy. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 336, 1-92. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.07.001>
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(8), 513-525. <https://doi.org/10.1038/nrm2728>
- Subramaniam, A., & Britt, W. J. (2018). Herpesviridae Infection: Prevention, Screening, and Management. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 61(1), 157-176. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000335>
- Sun, A., Wei, J., Childress, C., Shaw, J. H., Peng, K., Shao, G., Yang, W., & Lin, Q. (2017). The E3 ubiquitin ligase NEDD4 is an LC3-interactive protein and regulates autophagy. *Autophagy*, 13(3), 522-537. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1268301>
- Takahashi, Y., He, H., Tang, Z., Hattori, T., Liu, Y., Young, M. M., Serfass, J. M., Chen, L., Gebru, M., Chen, C., Wills, C. A., Atkinson, J. M., Chen, H., Abraham, T., & Wang, H.-G. (2018). An autophagy assay reveals the ESCRT-III component CHMP2A as a regulator of phagophore closure. *Nature Communications*, 9(1), 2855. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05254-w>

- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S. A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., ... Jahn, R. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, *127*(4), 831-846. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.030>
- Takehige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *The Journal of Cell Biology*, *119*(2), 301-311. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.2.301>
- Tandon, R., AuCoin, D. P., & Mocarski, E. S. (2009). Human Cytomegalovirus Exploits ESCRT Machinery in the Process of Virion Maturation. *Journal of Virology*, *83*(20), 10797-10807. <https://doi.org/10.1128/JVI.01093-09>
- Tandon, R., & Mocarski, E. S. (2008). Control of cytoplasmic maturation events by cytomegalovirus tegument protein pp150. *Journal of Virology*, *82*(19), 9433-9444. <https://doi.org/10.1128/JVI.00533-08>
- Tandon, R., & Mocarski, E. S. (2011). Cytomegalovirus pUL96 Is Critical for the Stability of pp150-Associated Nucleocapsids. *Journal of Virology*, *85*(14), 7129-7141. <https://doi.org/10.1128/JVI.02549-10>
- Tanida, I., Sou, Y., Ezaki, J., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., & Kominami, E. (2004). HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(35), 36268-36276. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401461200>
- Tarrant-Elorza, M., Rossetto, C. C., & Pari, G. S. (2014). Maintenance and replication of the human cytomegalovirus genome during latency. *Cell Host & Microbe*, *16*(1), 43-54. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.06.006>
- Tomtishen III, J. P. (2012). Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology Journal*, *9*, 22. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-22>
- Trombetta, E. S., & Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual Review of Immunology*, *23*, 975-1028. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104538>
- Tsuboyama, K., Koyama-Honda, I., Sakamaki, Y., Koike, M., Morishita, H., & Mizushima, N. (2016). The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science (New York, N.Y.)*, *354*(6315), 1036-1041. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6136>
- Turco, E., Fracchiolla, D., & Martens, S. (2020). Recruitment and Activation of the ULK1/Atg1 Kinase Complex in Selective Autophagy. *Journal of Molecular Biology*, *432*(1), 123-134. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.07.027>
- Uemura, T., Yamamoto, M., Kametaka, A., Sou, Y., Yabashi, A., Yamada, A., Annoh, H., Kametaka, S., Komatsu, M., & Waguri, S. (2014). A cluster of thin tubular structures mediates transformation of the endoplasmic reticulum to autophagic isolation membrane. *Molecular and Cellular Biology*, *34*(9), 1695-1706. <https://doi.org/10.1128/MCB.01327-13>
- Valečka, J., Almeida, C. R., Su, B., Pierre, P., & Gatti, E. (2018). Autophagy and MHC-restricted antigen presentation. *Molecular Immunology*, *99*, 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.05.009>
- Valverde, D. P., Yu, S., Boggavarapu, V., Kumar, N., Lees, J. A., Walz, T., Reinisch, K. M., & Melia, T. J. (2019). ATG2 transports lipids to promote autophagosome biogenesis. *The Journal of Cell Biology*, *218*(6), 1787-1798. <https://doi.org/10.1083/jcb.201811139>

- van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 676-705. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005983>
- Varnum, S. M., Streblow, D. N., Monroe, M. E., Smith, P., Auberry, K. J., Pasa-Tolic, L., Wang, D., Camp, D. G., Rodland, K., Wiley, S., Britt, W., Shenk, T., Smith, R. D., & Nelson, J. A. (2004). Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles : The HCMV proteome. *Journal of Virology*, 78(20), 10960-10966. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.10960-10966.2004>
- Vietri, M., Radulovic, M., & Stenmark, H. (2020). The many functions of ESCRTs. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21(1), 25-42. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0177-4>
- Villinger, C., Neusser, G., Kranz, C., Walther, P., & Mertens, T. (2015). 3D Analysis of HCMV Induced-Nuclear Membrane Structures by FIB/SEM Tomography : Insight into an Unprecedented Membrane Morphology. *Viruses*, 7(11), 5686-5704. <https://doi.org/10.3390/v7112900>
- Vilmen, G., Glon, D., Siracusano, G., Lussignol, M., Shao, Z., Hernandez, E., Perdiz, D., Quignon, F., Mouna, L., Pouis, C., Gruffat, H., Maréchal, V., & Esclatine, A. (2020). BHRF1, a BCL2 viral homolog, disturbs mitochondrial dynamics and stimulates mitophagy to dampen type I IFN induction. *Autophagy*, 1-20. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1758416>
- Viret, C., Rozières, A., & Faure, M. (2018). Autophagy during Early Virus-Host Cell Interactions. *Journal of Molecular Biology*, 430(12), 1696-1713. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.04.018>
- Wang, H., Bedford, F. K., Brandon, N. J., Moss, S. J., & Olsen, R. W. (1999). GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature*, 397(6714), 69-72. <https://doi.org/10.1038/16264>
- Wei, Y., Liu, M., Li, X., Liu, J., & Li, H. (2018). Origin of the Autophagosome Membrane in Mammals. *BioMed Research International*, 2018, 1012789. <https://doi.org/10.1155/2018/1012789>
- Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., & Elazar, Z. (2010). LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO Journal*, 29(11), 1792-1802. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.74>
- Weller, T. H., MacAuley, J. C., Craig, J. M., & Wirth, P. (1957). Isolation of Intranuclear Inclusion Producing Agents from Infants with Illnesses Resembling Cytomegalic Inclusion Disease. *Experimental Biology and Medicine*, 94(1), 4-12. <https://doi.org/10.3181/00379727-94-22841>
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., & Bartenschlager, R. (2009). Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host & Microbe*, 5(4), 365-375. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>
- White, E. (2015). The role for autophagy in cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(1), 42-46. <https://doi.org/10.1172/JCI73941>
- White, S., Kawano, H., Harata, N. C., & Roller, R. J. (2020). Herpes Simplex Virus Organizes Cytoplasmic Membranes To Form a Viral Assembly Center in Neuronal Cells. *Journal of Virology*, 94(19). <https://doi.org/10.1128/JVI.00900-20>
- Wiebusch, L., & Hagemeyer, C. (1999). Human Cytomegalovirus 86-Kilodalton IE2 Protein Blocks Cell Cycle Progression in G1. *Journal of Virology*, 73(11), 9274-9283.
- Wild, P., McEwan, D. G., & Dikic, I. (2014). The LC3 interactome at a glance. *Journal of Cell Science*, 127(1), 3-9. <https://doi.org/10.1242/jcs.140426>
- Wilkinson, G. W. G., Davison, A. J., Tomasec, P., Fielding, C. A., Aicheler, R., Murrell, I., Seirafian, S., Wang, E. C. Y., Weekes, M., Lehner, P. J., Wilkie, G. S., & Stanton, R. J. (2015). Human cytomegalovirus : Taking the strain. *Medical Microbiology and Immunology*, 204(3), 273-284. <https://doi.org/10.1007/s00430-015-0411-4>

- Wodrich, H., Henaff, D., Jammart, B., Segura-Morales, C., Seelmeir, S., Coux, O., Ruzsics, Z., Wiethoff, C. M., & Kremer, E. J. (2010). A capsid-encoded PPxY-motif facilitates adenovirus entry. *PLoS Pathogens*, *6*(3), e1000808. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000808>
- Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J., & Hurley, J. H. (2009). Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature*, *458*(7235), 172-177. <https://doi.org/10.1038/nature07836>
- Womack, A., & Shenk, T. (2010). Human cytomegalovirus tegument protein pUL71 is required for efficient virion egress. *MBio*, *1*(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.00282-10>
- Woodman, P. G. (1997). The roles of NSF, SNAPs and SNAREs during membrane fusion. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1357*(2), 155-172. [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(97\)00039-6](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(97)00039-6)
- Wu, Y.-W., Mettling, C., Wu, S.-R., Yu, C.-Y., Perng, G.-C., Lin, Y.-S., & Lin, Y.-L. (2016). Autophagy-associated dengue vesicles promote viral transmission avoiding antibody neutralization. *Scientific Reports*, *6*, 32243. <https://doi.org/10.1038/srep32243>
- Yim, W. W.-Y., & Mizushima, N. (2020). Lysosome biology in autophagy. *Cell Discovery*, *6*, 6. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0141-7>
- Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., & Eskelinen, E.-L. (2009). 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy*, *5*(8), 1180-1185. <https://doi.org/10.4161/auto.5.8.10274>
- Zachari, M., Gudmundsson, S. R., Li, Z., Manifava, M., Shah, R., Smith, M., Stronge, J., Karanasios, E., Piunti, C., Kishi-Itakura, C., Vihinen, H., Jokitalo, E., Guan, J.-L., Buss, F., Smith, A. M., Walker, S. A., Eskelinen, E.-L., & Ktistakis, N. T. (2019). Selective Autophagy of Mitochondria on a Ubiquitin-Endoplasmic-Reticulum Platform. *Developmental Cell*, *50*(5), 627-643.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.06.016>
- Zahoor, M., & Farhan, H. (2018). Crosstalk of Autophagy and the Secretory Pathway and Its Role in Diseases. *International Review of Cell and Molecular Biology*, *337*, 153-184. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.12.004>
- Zhang, H., Read, C., Nguyen, C. C., Siddiquey, M. N. A., Shang, C., Hall, C. M., von Einem, J., & Kamil, J. P. (2019). The Human Cytomegalovirus Nonstructural Glycoprotein UL148 Reorganizes the Endoplasmic Reticulum. *MBio*, *10*(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.02110-19>
- Zhang, J., Lan, Y., Li, M. Y., Lamers, M. M., Fusade-Boyer, M., Klemm, E., Thiele, C., Ashour, J., & Sanyal, S. (2018). Flaviviruses Exploit the Lipid Droplet Protein AUP1 to Trigger Lipophagy and Drive Virus Production. *Cell Host & Microbe*, *23*(6), 819-831.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.005>
- Zhao, J., Li, Z., Wang, M., Zhang, Z., Ma, H., Chang, J., Gao, D., & Wang, S. (2013). Manipulation of autophagy by HCMV infection is involved in mTOR and influences the replication of virus. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, *45*(11), 979-981. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmt102>
- Ziehr, B., Vincent, H. A., & Moorman, N. J. (2016). Human Cytomegalovirus pTRS1 and pIRS1 Antagonize Protein Kinase R To Facilitate Virus Replication. *Journal of Virology*, *90*(8), 3839-3848. <https://doi.org/10.1128/JVI.02714-15>

Titre : Détournement de la machinerie autophagique par le cytomégalovirus humain : conséquences sur sa multiplication

Mots clés : Cytomégalovirus, Autophagie, Vésicules membranaires, Enveloppement viral.

Résumé : Le cytomégalovirus humain (HCMV) appartient à la famille des *Herpesviridae*. Ce virus est responsable d'infections congénitales et d'infections graves chez les personnes immunodéprimées. Nous avons précédemment montré l'interaction entre le HCMV et l'autophagie, un processus cellulaire de dégradation et de recyclage. Ce processus est constitutif et permet le maintien de l'homéostasie cellulaire. L'autophagie est induite en cas de stress et peut être utilisée par la cellule pour se défendre des infections virales ou bactériennes. Nous avons montré que le HCMV induit la formation de structures autophagiques mais que le virus bloque l'étape finale du processus pour empêcher sa propre dégradation. Afin de caractériser le rôle de l'autophagie sur la multiplication virale, nous avons utilisé une approche génétique qui a montré que l'autophagie était bénéfique pour la multiplication du HCMV.

Nous avons donc établi des lignées cellulaires stables, déficientes ou invalidées pour des protéines autophagiques (ULK1, BECN1, ATG5, LC3B et ATG4B). Grâce à ces outils, nous avons ensuite étudié comment l'autophagie module les différentes étapes du cycle du HCMV, à savoir : l'entrée, la synthèse protéique, la réplication du génome, l'assemblage et la sortie des virus. Nos résultats montrent que les protéines de l'autophagie sont présentes et agissent au niveau du compartiment d'assemblage viral dans le cytoplasme. Plusieurs de ces protéines sont conservées au sein des particules virales extracellulaires, notamment LC3 et ATG5.

L'ensemble de nos résultats démontrent que le HCMV détourne les membranes autophagiques pour acquérir son enveloppe ce qui semble favoriser son infectivité et sa propagation.

Title : Subversion of the autophagic machinery by human cytomegalovirus

Keywords : Cytomegalovirus, Autophagy, Membrane vesicles, viral envelopment.

Abstract : The Human cytomegalovirus (HCMV) belongs to the *Herpesviridae* family. This virus is responsible for congenital infections and for severe illnesses in immunocompromised patients. We have previously shown interactions between HCMV and autophagy, a cellular process involved in the degradation and recycling of components. This is a constitutive process responsible for maintaining cellular homeostasis. Autophagy is induced by different stresses and can be used by the cell as a defense mechanism against viral or bacterial infection. We have shown that HCMV infection induces the accumulation of autophagic structures but the virus blocks the final step of autophagy to avoid its own degradation.

To characterize the role of autophagy in viral multiplication, we used genetic approaches to modulate autophagy and we demonstrated its

beneficial role on HCMV multiplication. We therefore established knock-down or knock-out stable cell lines for different autophagic proteins (ULK1, BECN1, ATG5, LC3B and ATG4B). Using these tools, we investigated the role of autophagy on different steps of the HCMV life cycle: entry, protein expression, viral genome replication, assembly and egress. Our results showed that autophagic proteins are present and involved in the assembly compartment organized by HCMV in the cytoplasm. Several of these proteins are consequently found in the extracellular viral particles, as LC3 and ATG5.

Taken together, these results demonstrate that HCMV hijacks autophagic membranes to acquire its envelope and this seems to improve its infectivity and its transmission.