



**HAL**  
open science

# Régulation de l'autophagie et de la dynamique mitochondriale par BHRF1 : impact sur l'immunité innée et la pathogenèse du virus Epstein-Barr

Damien Glon

► **To cite this version:**

Damien Glon. Régulation de l'autophagie et de la dynamique mitochondriale par BHRF1 : impact sur l'immunité innée et la pathogenèse du virus Epstein-Barr. Virologie. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASQ044 . tel-03612037

**HAL Id: tel-03612037**

**<https://theses.hal.science/tel-03612037v1>**

Submitted on 17 Mar 2022

**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.

Régulation de l'autophagie et de la dynamique mitochondriale par BHRF1 : impact sur l'immunité innée et la pathogénèse du virus Epstein-Barr

*Regulation of autophagy and mitochondrial dynamics by BHRF1: impact on innate immunity and Epstein-Barr virus pathogenesis*

**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  
Réfèrent : Faculté de pharmacie

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,  
le 10 décembre 2021, par**

**Damien GLON**

**Composition du Jury**

|   |                            |
|---|----------------------------|
| <b>Renaud LEGOUIS</b><br>Directeur de recherche, I2BC - Université Paris-Saclay | Président                  |
| <b>Nolwenn JOUVENET</b><br>Directrice de recherche, Institut Pasteur            | Rapporteuse & Examinatrice |
| <b>Évelyne MANET</b><br>Directrice de recherche, CIRI - Université de Lyon      | Rapporteuse & Examinatrice |
| <b>Frédéric GROS</b><br>Maître de conférences, IBMC - Université de Strasbourg  | Examineur                  |
| <b>Joëlle WIELS</b><br>Directrice de recherche, IGR - Université Paris-Saclay   | Examinatrice               |

**Direction de la thèse**

|  |                     |
|--|---------------------|
| <b>Audrey ESCLATINE</b><br>Professeure des universités, I2BC - Université Paris-Saclay | Directrice de thèse |
| <b>Marion LUSSIGNOL</b><br>Maîtresse de conférences, I2BC - Université Paris-Saclay    | Invitée             |



# Avant-propos

## Remerciements

Après bientôt quatre années passées au laboratoire, mon aventure de doctorant touche à sa fin. Mais avant d'entrer dans le vif du sujet, je tiens à adresser mes remerciements aux différentes personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Qui dit soutenance de thèse, dit jury d'évaluation. Je remercie donc en premier lieu l'ensemble des membres du jury pour avoir gentiment accepté d'évaluer ce travail. Un très grand merci à Nolwenn JOUVENET et Evelyne MANET qui ont accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit. Je remercie également chaleureusement Joëlle WIELS, Frédéric GROS et Renaud LEGOUIS d'assumer le rôle d'examineurs.

Je souhaite ensuite remercier individuellement l'ensemble des membres de mon équipe « Autophagie et Immunité Antivirale ». Je n'aurais pas pu rêver d'une meilleure équipe pour m'accompagner dans cette aventure. On aura passé de sacrés bons moments dans notre magnifique tour E1, à déguster des pizzas pour des occasions plus ou moins justifiées et à rigoler pour un rien. Il est certain que vous me manquerez !

Pour commencer, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Audrey ESCLATINE, ma directrice de thèse, pour m'avoir accueilli dans son équipe dès mon stage de M2 et pour m'avoir encouragé à me présenter au concours de l'école doctorale. Je te remercie sincèrement pour la confiance et la liberté que tu m'as accordées pour mener ce travail, mais aussi pour ta disponibilité et tes conseils pour la rédaction de ce manuscrit. Tu m'as également offert l'opportunité de découvrir l'enseignement, une mission qui au départ m'effrayait un peu, mais qui au final m'a fait grandir et que je souhaite bien poursuivre à l'avenir.

Un énorme merci à Marion LUSSIGNOL, ma co-encadrante de thèse, et qui est aussi selon moi la force tranquille et la voix de la sagesse de cette équipe. Merci pour ta sympathie, tes conseils avisés et le temps consacré à la relecture de ce manuscrit. Je te remercie également pour ta grande disponibilité lorsque j'avais des questions, autant sur la recherche que l'enseignement. Ce fut d'ailleurs un plaisir de partager autant d'enseignements en binôme avec toi, car il est certain que j'ai énormément appris à tes côtés.

Je tiens ensuite à remercier infiniment Eva HERNANDEZ-DJEBALI. Je te suis extrêmement reconnaissant de m'avoir pris sous ton aile lors de mon arrivée au laboratoire, tu m'auras formé dans les règles de l'art afin que je sois opérationnel au plus vite. J'ai toujours pu compter sur toi et je te remercie de ton implication sans faille lors des manips de *reviewing*. Enfin, merci pour ta joie de vivre, tes blagues (plus

ou moins pourries) qui m'ont bien fait rire, mais aussi pour toutes tes folies. Le labo ne serait vraiment pas le même sans toi !

Je remercie chaleureusement Guillaume BEAUCLAIR pour son enthousiasme permanent et pour le dynamisme qu'il a su apporter au projet, dès son arrivée dans l'équipe. Je suis ravi d'avoir pu travailler en binôme avec toi sur la dernière année de ma thèse. Tu m'as aidé à débloquer certaines difficultés que j'avais, notamment pour la construction de ces maudits *shRNA*. Aussi, je sais que je peux partir tranquille, car avec toi le projet BHRF1 sera entre de bonnes mains !

Que dire des doctorantes avec qui j'ai eu la chance de partager mon bureau ?

Il y a d'abord eu Clémence TAISNE que je remercie d'avoir installé mon bureau auprès du sien à mon arrivée au laboratoire. Même si notre cohabitation s'est faite au prix de nombreuses « chamailleries », qui nous auront valu les surnoms de Tic et Tac, on se sera bien marré dans notre petit bureau, parfois même un peu trop, quitte à déranger les filles d'à côté. Aussi, tu auras toujours répondu présente pour m'aider lorsque j'étais perdu au niveau des démarches administratives (ce qui est encore le cas aujourd'hui), vraiment merci pour tout !

Puis est venu le tour de Gabriela SARANGO de devenir ma nouvelle colocataire de bureau. Ça m'a fait plaisir de te retrouver après les bons moments passés pendant ton M2. Merci pour les nombreuses discussions, plus ou moins essentielles, que l'on a partagé, mais aussi pour les cours de français que tu m'as parfois donnés. En revanche, il y a une chose pour laquelle je ne te remercie pas : mon addiction au café qui est de ton entière responsabilité !

De façon plus générale, je remercie les « Parisiennes/Latinas » qui nous ont rejoints à Châtenay-Malabry sur la fin de ma thèse. Votre arrivée aura permis de remplir nos vastes locaux, à la fois physiquement qu'au niveau de la bonne humeur. Après tant de mois d'attente, on a enfin pu constituer une seule et même équipe ! Merci à chacune de vous : Cécilia RAMIREZ, Lisa BERTRAND, Anita KUMARI et Sylvie GRÉGOIRE. Je n'oublie pas également Arnaud MORIS, notre exilé allemand qui passait une tête au labo de temps en temps.

Je tenais également à remercier tous les stagiaires étant passés par le labo. Je ne vais pas faire de liste exhaustive, car je risquerai d'en oublier, mais je souhaite remercier particulièrement Mathilde LUMY. Tu resteras à mes yeux la stagiaire la plus mémorable, par ta bonne humeur, tes blagues, anecdotes et autres phrases cultissimes. Merci aussi à Morgan MAUGEY, ma seule et unique stagiaire. Même si ton stage est malheureusement tombé en plein confinement, le transformant en rédaction d'un mémoire bibliographique, j'en garderai un souvenir positif pour cette première expérience d'encadrement.

Je réserve une pensée particulière à nos collègues « Microtubules » de la tour D4, Christian POÛS et Daniel PERDIZ. Merci infiniment pour votre disponibilité, votre enthousiasme et vos conseils toujours

très avisés sur nos résultats. Chacune de nos réunions nous aura permis de faire avancer nos projets. Surtout, mille mercis de m'avoir donné tant de matériels. Combien de fois je serais venu voir Daniel pour faire mon marché ? Moi-même, je ne m'en souviens pas ... mais ce qui est certain, c'est que sans vous une partie de ce mémoire n'existerait probablement pas, donc je vous remercie sincèrement.

Je tiens également à remercier l'ensemble des équipes enseignantes que j'ai eu la chance de côtoyer durant ces trois années en tant que moniteur. Tout d'abord, je remercie les membres de la *team Viro* : Audrey, Marion, Guillaume, Dorine BONTE, Jean-Louis PALGEN et Louis REOT. Même si je me plaignais régulièrement de mes étudiants, j'ai vraiment adoré cette expérience et le travail à vos côtés ! Je remercie également les enseignants de la *team Bactério*, avec qui j'ai réalisé tant d'oraux de TP, pour leur bienveillance lorsque je débutais.

Je ne peux pas écrire une thèse sur BHRF1 sans citer Géraldine VILMEN, la précurseur de ce projet. Ton formidable travail de thèse m'aura permis de débiter la mienne sur des bases solides. Je te remercie pour l'enthousiasme que tu nous témoignais à chaque fois que l'on te donnait des nouvelles sur l'avancée du projet et la rédaction des articles.

Je souhaite adresser un merci plus général à l'ensemble des membres du département de Virologie de l'I2BC pour les échanges que nous avons eu au cours des différents séminaires. Plus particulièrement, je souhaite remercier l'équipe « Rhabdo » pour leur accueil et leur gentillesse lorsque je venais faire quelques manip dans leurs locaux.

Pour terminer, j'ai une pensée pour ma famille, qui m'a toujours soutenu dans mes choix d'études, même si elle ne comprenait pas forcément dans quoi je m'embarquais réellement. Vous avez su me faire confiance et m'encourager et je vous en remercie. Enfin, je terminerai en remerciant Alex pour m'avoir supporté au quotidien durant toute cette thèse, et bien avant. Je dirai même que je te félicite, bien que je t'aie le plus souvent épargné les aspects scientifiques de mon travail qui sont trop abstraits à ton goût.

# Table des matières

## Avant-propos

|                               |     |
|-------------------------------|-----|
| Remerciements .....           | I   |
| Table des matières .....      | IV  |
| Abréviations .....            | VII |
| Table des illustrations ..... | IX  |
| Préambule .....               | XII |

## Partie 1 - Données bibliographiques

|          |  |    |
|----------|--|----|
| I        | Le virus Epstein-Barr.....                                 | 1  |
| I. 1     | Généralités virologiques.....                              | 1  |
| I. 1. A  | L'histoire de sa découverte .....                          | 1  |
| I. 1. B  | Taxonomie et classification .....                          | 2  |
| I. 1. C  | Structure de la particule virale .....                     | 3  |
| I. 2     | Cycle biologique de l'EBV .....                            | 5  |
| I. 2. A  | Tropisme cellulaire .....                                  | 5  |
| I. 2. B  | Mode de transmission et pénétration dans l'organisme ..... | 6  |
| I. 2. C  | La réplication virale ou cycle productif de l'EBV .....    | 7  |
| I. 2. D  | La latence de l'EBV .....                                  | 13 |
| I. 3     | Physiopathologie des infections par l'EBV .....            | 23 |
| I. 3. A  | Données épidémiologiques .....                             | 23 |
| I. 3. B  | Les pathologies au cours de la primo-infection .....       | 23 |
| I. 3. C  | Les pathologies cancéreuses au cours de la latence .....   | 24 |
| II       | L'autophagie et l'apoptose.....                            | 29 |
| II. 1    | L'autophagie : dégrader pour mieux survivre .....          | 29 |
| II. 1. A | Généralités sur l'autophagie .....                         | 29 |
| II. 1. B | Déroulement de l'autophagie .....                          | 31 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| II. 1. C  | L'autophagie sélective .....  | 36 |
| II. 1. D  | Quelques fonctions biologiques de l'autophagie .....                      | 38 |
| II. 2     | L'apoptose : la mort cellulaire programmée .....                          | 41 |
| II. 2. A  | Généralités sur l'apoptose .....  | 41 |
| II. 2. B  | Déroulement de l'apoptose .....   | 44 |
| II. 2. C  | Quelques fonctions biologiques de l'apoptose .....                        | 48 |
| II. 3     | Mécanismes d'interaction entre autophagie et apoptose.....                | 50 |
| II. 3. A  | Généralités et modèles d'interaction.....                                 | 50 |
| II. 3. B  | Les différents niveaux d'interaction entre les deux voies.....            | 52 |
| II. 3. C  | Conséquences sur les cancers et leurs traitements .....                   | 55 |
| III       | BHRF1, un homologue viral de BCL2 .....                                   | 57 |
| III. 1    | Les orthologues de BCL-2 chez les <i>Herpesviridae</i> .....              | 57 |
| III. 2    | Structure génomique et protéique de BHRF1 .....                           | 57 |
| III. 3    | Expression de BHRF1 .....   | 59 |
| III. 4    | Fonctions connues et putatives de BHRF1 .....                             | 61 |
| III. 4. A | BHRF1 est une protéine anti-apoptotique .....                             | 61 |
| III. 4. B | Impact de BHRF1 sur l'autophagie/mitophagie .....                         | 62 |
| III. 4. C | BHRF1, survie cellulaire et tumorigenèse .....                            | 62 |
| IV        | Les mitochondries, des organites dynamiques de l'immunité antivirale..... | 64 |
| IV. 1     | Généralités sur les mitochondries.....                                    | 64 |
| IV. 1. A  | Fonctions et structure des mitochondries .....                            | 64 |
| IV. 1. B  | La dynamique mitochondriale.....  | 64 |
| IV. 1. C  | La mitophagie dans le contrôle qualité des mitochondries .....            | 70 |
| IV. 2     | Rôle des mitochondries dans l'immunité innée antivirale.....              | 75 |
| IV. 2. A  | Généralités sur l'immunité innée antivirale .....                         | 75 |
| IV. 2. B  | La mitochondrie : carrefour de l'immunité innée antivirale .....          | 83 |
| IV. 3     | Stratégies d'échappement à l'immunité mitochondriale par les virus .....  | 89 |
| IV. 3. A  | Altération de la morphodynamique mitochondriale .....                     | 89 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| IV. 3. B | La dégradation autophagique et la mitophagie .....       | 91 |
| IV. 3. C | L'échappement à l'immunité innée : exemple de l'EBV..... | 95 |

## Partie 2 - Résultats de thèse

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| V       | Présentation des travaux de recherche .....  | 100 |
| V. 1    | Article n°1 : "BHRF1, a BCL2 viral homolog, disturbs mitochondrial dynamics and stimulates mitophagy to dampen type I IFN induction" .....       | 100 |
| V. 1. A | Introduction.....  | 100 |
| V. 1. B | Résultats .....  | 101 |
| V. 1. C | Conclusions, discussions et perspectives .....   | 127 |
| V. 2    | Article n°2 : "Essential role of hyperacetylated microtubules in the innate immunity escape orchestrated by the EBV-encoded BHRF1 protein" ..... | 136 |
| V. 2. A | Introduction.....  | 136 |
| V. 2. B | Résultats .....  | 137 |
| V. 2. C | Conclusions, discussions et perspectives .....   | 177 |
| V. 3    | Résultats complémentaires : « L'expression de BHRF1 en latence Wp : un facteur favorisant la lymphomagenèse de l'EBV ? ».....                    | 183 |
| V. 3. A | Introduction.....  | 183 |
| V. 3. B | Matériels et méthodes .....  | 184 |
| V. 3. C | Résultats .....  | 188 |
| V. 3. D | Conclusions, discussions et perspectives .....   | 197 |
| VI      | Conclusions générales .....  | 203 |

## Données supplémentaires

|      |                 |     |
|------|-----------------|-----|
| VII  | Annexe.....     | 206 |
| VIII | Références..... | 210 |

## Abréviations

### A

**AMBRA1** : *Activating Molecule in BECN1-Regulated Autophagy protein 1*  
**APAF-1** : *Apoptotic Protease-Activating Factor-1*  
**ATAT1** : *Alpha Tubulin AcetylTransferase 1*  
**ATG** : *AuTophagy*  
**ATP** : Adénosine Tri-Phosphate  
**AR** : *Aspect Ratio*

### B

**BART** : *BamHI fragment A Rightward Transcript*  
**BCL-2** : *B-Cell Lymphoma-2*  
**BCR** : *B-Cell Receptor*  
**BH** : *BCL-2 Homology domain*  
**BHRF1** : *BamHI fragment H Rightward open reading Frame 1*  
**BINDI** : *BHRF1-INhibiting Design acting Intracellularly*

### C

**CARD** : *CAspase Recruitment Domain*  
**CG** : *Carcinome Gastrique*  
**cGAS** : *cGAMP (cyclic GMP-AMP) synthase*  
**CMH** : *Complexe Majeur d'Histocompatibilité*  
**CNP** : *Carcinome du NasoPharynx*  
**CQ** : *ChloroQuine*

### D

**DAMP** : *Damage-Associated Molecular Pattern*  
**DAPI** : *Di Aminido Phenyl Indol*  
**DENV** : *DENgue Virus*  
**DISC** : *Death Inducing Signaling Complex*  
**DNM1L/DRP1** : *Dynamin-Related Protein 1*

### E

**Ea-D** : *Early antigen-D*  
**EBER** : *Epstein-Barr Encoded RNA*  
**EBNA** : *Epstein-Barr Nuclear Antigen*  
**EBSS** : *Earle's Balanced Salt Solution*  
**EBV** : *Epstein-Barr Virus*  
**ETP** : *ÉToPoside*  
**EV** : *Empty Vector*

### F

**FADD** : *FAS-Associated Death Domain*  
**FF** : *Form Factor*

### H

**HBV** : *Hepatitis B Virus*  
**HCMV** : *Human CytoMegalovirus*

**HCV** : *Hepatitis C Virus*  
**HDAC** : *Histone DéACétylase*  
**HHV** : *Human HerpesVirus*  
**HPIV3** : *Human ParaInfluenza Virus type 3*  
**HSV-1 ou -2** : *Herpes Simplex Virus type 1 or 2*

### I

**IAV** : *Influenza A Virus*  
**IC** : *Indice de Compaction*  
**IFN** : *InterFéroN*  
**IgG** : *Immunoglobuline G*  
**IKK** : *IκB Kinase*  
**IL** : *InterLeukine*  
**IRF** : *IFN Regulatory Factor*

### J

**JNK** : *Jun N-terminal Kinase*

### K

**kDa** : *kiloDaltons*  
**kpb** : *kilopaires de base*  
**KSHV** : *Kaposi's Sarcoma-associated HerpesVirus*  
**K40A** : *Lysine-40 mutée en Alanine*

### L

**LB** : *Lymphome de Burkitt*  
**LCL** : *Lignées Cellulaires Lymphoblastoïdes*  
**LC3** : *microtubule associated protein Light Chain 3*  
**LH** : *Lymphome de Hodgkin*  
**LNH** : *Lymphome Non-Hodgkinien*  
**LIR** : *LC3-Interacting Region*  
**LMP** : *Latent Membrane Protein*  
**L-[...]** : *Programme de latence de type [...]*

### M

**MAMs** : *Mitochondria-Associated Membranes*  
**MAPs** : *MT-Associated Proteins*  
**MAVS** : *Mitochondrial AntiViral Signaling*  
**MDA5** : *Melanoma Differentiation-Associated Protein 5*  
**Mdivi-1** : *Mitochondrial division inhibitor-1*  
**MDV** : *Mitochondrial Derived Vesicle*  
**MERC** : *Mitochondria-Endoplasmic Reticulum Contact site*  
**MFN1 ou 2** : *MitoFusine 1 ou 2*  
**miR** : *microARN*  
**MME** : *Membrane Mitochondriale Externe*  
**MMI** : *Membrane Mitochondriale Interne*  
**MNI** : *MonoNucléose Infectieuse*  
**MOMP** : *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*



MPT : Modification Post-Traductionnelle  
 MT : MicroTubule  
 MTOC : *MT Organizing Center*

## N

NF- $\kappa$ B : *Nuclear Factor- $\kappa$ B*  
 NK : *Natural Killer*  
 NT : *Non-Target*  
 NLR : *NOD-Like Receptors*  
 ns : non-significatif  
 NLRP3 : *NLR family Pyrin domain containing 3*

## O

OPA1 : *OPTic Atrophy type 1*  
 ORF : Open Reading Frame  
 ori : origine de réplication

## P

PAMP : *Pathogen-Associated Molecular Pattern*  
 PARP1 : *Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1*  
 PE : PhosphatidylÉthanolamine  
 PINK1 : *PTEN-INDuced putative Kinase 1*  
 PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase  
 PI3P : PhosphatidylInositol-3-Phosphate  
 PRR : *Pattern-Recognition Receptor*  
 PTLD : *Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder*

## R

RE : Réticulum Endoplasmique  
 RIG-I : *Retinoic acid-Inducible Gene I*  
 RLR : RIG-I Like Receptor  
 ROS : *Reactive Oxygen Species*

## S

SCR : *SCRamble*  
 shRNA : *short hairpin RNA*  
 siRNA : *small interfering RNA*  
 SIRT2 : SIRTuine 2  
 SQSTM1 : SéQueSTosoMe 1  
 STAT : *Signal Transducer and Activator of Transcription*  
 STING : *STimulator Interferon Gene*  
 STS : STauroSporine

## T

TBK1 : *TANK-Binding Kinase 1*  
 TLR : *Toll-Like Receptor*  
 TM : *TransMembranaire*  
 TOM : *Translocase of the Outer Membrane*  
 TRADD : *TNFR1-Associated Death Domain*  
 TRAF : *TNF Receptor-Associated Factor*  
 TRIM : *TRIpartite Motif-containing protein*

TUFM : *Tu translation elongation Factor Mitochondrial*

## U

Ub : Ubiquitine  
 ULK : *Unc-51-Like autophagy activating Kinase*  
 UTR : *UnTranslated Region*

## V

vBCL-2 : *viral BCL-2*  
 VDAC : *Voltage-Dependent Anion Channel*  
 VIH : *Virus de l'Immunodéficience Humaine*  
 vMIA : *viral Mitochondrion-localized Inhibitor of Apoptosis*

## W

WIPI2 : *WD-repeat protein Interacting with PI*  
 WT : *Wild Type*

## Ø

3-MA : 3-MéthylAdénine  
 $\Delta\Psi_m$  : potentiel de membrane mitochondrial  
 [...]mt : [...] mitochondrial

## Table des illustrations

### Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| Figure 1   Structure de la particule virale de l'EBV .....   | 3  |
| Figure 2   Organisation linéaire du génome de l'EBV .....  | 4  |
| Figure 3   Modèle du cycle de vie de l'EBV.....  | 6  |
| Figure 4   Schéma du cycle productif complet de l'EBV .....  | 8  |
| Figure 5   Mécanismes d'entrée de l'EBV selon le tropisme cellulaire.....                          | 10 |
| Figure 6   Organisation des gènes de latence sur l'épisome de l'EBV .....                          | 14 |
| Figure 7   Profil d'expression génique de l'EBV au cours des différents programmes de latence..... | 16 |
| Figure 8   Persistance virale dans les lymphocytes B et origine des lymphoproliférations .....     | 17 |
| Figure 9   Expression des gènes de latence lors de la primo-infection des lymphocytes B naïfs..... | 18 |
| Figure 10   Fonctions des miRs dans la tumorigenèse associée à l'EBV .....                         | 22 |
| Figure 11   Corrélation géographique entre la répartition des LB endémiques et du paludisme.....   | 25 |
| Figure 12   Les différentes formes d'autophagie chez les mammifères .....                          | 30 |
| Figure 13   Vue d'ensemble du processus autophagique.....  | 32 |
| Figure 14   Systèmes de conjugaison permettant l'élongation du phagophore .....                    | 33 |
| Figure 15   La scission membranaire assure la fermeture du phagophore.....                         | 35 |
| Figure 16   Les différentes formes d'autophagie sélective chez les mammifères.....                 | 36 |
| Figure 17   Principe de l'autophagie sélective et rôle de l'Ub.....                                | 37 |
| Figure 18   Pathologies humaines reliées à l'autophagie .....                                      | 40 |
| Figure 19   Classification des caspases chez les mammifères .....                                  | 42 |
| Figure 20   Classification des membres de la famille BCL-2 .....                                   | 44 |
| Figure 21   Les différentes voies de l'apoptose .....  | 45 |
| Figure 22   Mode d'action des BCL-2 et de quelques vBCL-2.....                                     | 47 |
| Figure 23   Relations générales entre l'autophagie et l'apoptose.....                              | 51 |
| Figure 24   Intervention de l'autophagie dans la mort cellulaire .....                             | 52 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 25   Organisation génomique de <i>BHRF1</i> et son expression .....  | 58  |
| Figure 26   Localisation mitochondriale de <i>BHRF1</i> .....   | 59  |
| Figure 27   Fixation de <i>BHRF1</i> aux membres pro-apoptotiques de la famille <i>BCL-2</i> .....                  | 62  |
| Figure 28   Balance entre fusion et fission mitochondriale.....   | 65  |
| Figure 29   Mécanismes de fusion et de fission mitochondriale .....   | 66  |
| Figure 30   Les mouvements mitochondriaux dépendent du cytosquelette .....  | 68  |
| Figure 31   Les différentes voies de la mitophagie.....   | 73  |
| Figure 32   Les différentes familles de PRRs.....   | 76  |
| Figure 33   Organisation structurale des différents RLRs .....  | 78  |
| Figure 34   Rôle des IFNs de type I au cours de l'infection virale .....  | 80  |
| Figure 35   Mise en place de l'inflammasome <i>NLRP3</i> .....  | 82  |
| Figure 36   Organisation structurale de <i>MAVS</i> .....   | 84  |
| Figure 37   Voies de signalisation dépendantes de <i>MAVS</i> .....   | 85  |
| Figure 38   Voies de signalisation dépendantes de <i>STING</i> .....  | 87  |
| Figure 39   Stratégies d'échappement à l'immunité innée développées par l'EBV .....                                 | 97  |
| Figure 40   L'inhibition de la dégradation autophagique ne restaure que partiellement l'activité <i>IFN-β</i> ..    | 131 |
| Figure 41   <i>BHRF1</i> est impliquée dans l'induction précoce de l'autophagie après réactivation de l'EBV...      | 133 |
| Figure 42   L'autophagie est requise pour former des mito-agrèsomes après réactivation de l'EBV....                 | 135 |
| Figure 43   Structure des dynéines et hypothèse de liaison des mitochondries aux dynéines par <i>BHRF1</i> ..       | 179 |
| Figure 44   Caractérisation de la lignée cellulaire <i>P3HR-1</i> et validation des lignées déficientes .....       | 189 |
| Figure 45   <i>BHRF1</i> est responsable de la formation de mito-agrèsomes dans les cellules <i>P3HR-1</i> ....     | 190 |
| Figure 46   L'absence d'activité <i>DRP1</i> prévient la formation des mito-agrèsomes des cellules <i>P3HR-1</i> .. | 191 |
| Figure 47   Étude de l'autophagie et de la mitophagie dans les cellules <i>P3HR-1</i> .....                         | 192 |
| Figure 48   L'inhibition pharmacologique de l'autophagie diminue la formation des mito-agrèsomes...                 | 194 |
| Figure 49   L'extinction de gènes autophagiques prévient la formation des mito-agrèsomes.....                       | 195 |
| Figure 50   L'autophagie est cytoprotectrice pour les cellules <i>P3HR-1</i> .....                                  | 196 |
| Figure 51   Les mutations <i>3XA</i> de <i>BHRF1</i> entraînent sa perte de fonctions .....                         | 199 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 52   Modèle des fonctions potentielles de BHRF1 au cours de la L-Wp..... | 201 |
|---|-----|

## Liste des tableaux

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1   Classification des virus de la famille des <i>Herpesviridae</i> .....                  | 2  |
| Tableau 2   Récepteurs impliqués lors des différentes voies d'autophagie sélective.....            | 38 |
| Tableau 3   Exemples d'infections virales détectées par les RLRs.....                              | 78 |
| Tableau 4   Les DAMPs d'origine mitochondriale et leurs impacts sur la réponse inflammatoire ..... | 83 |
| Tableau 5   Exemple d'échappement à l'immunité innée par les virus .....                           | 90 |
| Tableau 6   Échappement à l'immunité innée par l'EBV .....   | 96 |

## Préambule

Selon la définition énoncée par André Lwoff en 1953, les virus correspondent à des parasites intracellulaires obligatoires, c'est-à-dire qu'ils dépendent d'un hôte pour se multiplier. Les cellules humaines disposent quant à elles de moyens rapides pour se défendre et limiter leur invasion par les virus : il s'agit de l'immunité innée. Cette immunité fait intervenir de nombreux mécanismes, agissant à la fois à l'échelle de l'organisme entier ou de la cellule, comme par exemple la réponse interféron ou l'autophagie. En effet, lors d'une infection virale, les cellules produisent des interférons qui sont de puissantes molécules antivirales protégeant les cellules avoisinantes de l'infection et limitant la propagation du virus dans l'organisme. En parallèle, l'autophagie peut intervenir dans la dégradation d'un pathogène intracellulaire en l'internalisant au sein d'une vésicule capable de fusionner avec le lysosome. Face à cet arsenal, les virus ont dû s'adapter à leur hôte et développer des moyens pour contourner ces systèmes de défense. C'est particulièrement le cas des virus de la famille des *Herpesviridae* qui sont capables de détourner l'autophagie à leur profit, mais aussi qui possèdent de nombreuses protéines antagonistes de l'immunité innée.

Au laboratoire, nous nous intéressons au détournement de la machinerie autophagique par certains virus de cette famille tels que le virus herpès simplex de type 1, le cytomégalovirus humain et le virus Epstein-Barr (EBV). Plus précisément, concernant l'EBV, nous nous focalisons sur l'étude de la protéine BHRF1, orthologue de la protéine cellulaire BCL-2, qui se localise essentiellement dans les mitochondries. Avant son étude au laboratoire, BHRF1 était connue pour son activité anti-apoptotique mais son rôle vis-à-vis de l'autophagie n'avait pas été étudié. Notre équipe s'est donc intéressée à cette question et a pu démontrer que BHRF1 stimule l'autophagie. Nous avons également pu mettre en évidence que BHRF1 modifie drastiquement l'architecture du réseau mitochondrial. C'est donc dans ce contexte que s'est inscrit mon projet de thèse qui visait à mieux caractériser l'impact de BHRF1 au niveau des mitochondries et de l'autophagie. De plus, dans la mesure où les mitochondries sont impliquées dans les étapes précoces de la réponse interféron, nous nous sommes intéressés à l'impact de BHRF1 sur l'immunité innée. Enfin, nous avons exploré la relevance qu'aurait l'ensemble de ces nouvelles fonctions sur la pathogenèse de l'EBV.

En effet, bien que sa primo-infection soit le plus souvent asymptomatique, l'EBV est un virus ubiquitaire qui est associé au développement de différents cancers, comme par exemple le lymphome de Burkitt. L'expression de BHRF1 est retrouvée dans certaines formes de ce cancer particulièrement résistantes aux traitements. De premières études ont attribué cette résistance à l'activité anti-apoptotique de BHRF1. Cependant, au laboratoire nous avons émis l'hypothèse qu'il s'agirait d'un

mécanisme plus complexe qui pourrait également impliquer la régulation de l'autophagie et de l'immunité innée par BHRF1.

Ce manuscrit de thèse se compose de deux parties. La première sera consacrée à une synthèse bibliographique qui débutera par une présentation de l'EBV ainsi que des pathologies qui lui sont attribuables. Je décrirai ensuite l'autophagie et l'apoptose en axant mon propos sur les interactions existant entre ces deux voies régulatrices du devenir cellulaire. Je poursuivrai en présentant les données actuellement connues sur la protéine virale BHRF1. Enfin, je terminerai cette partie en expliquant le rôle des mitochondries dans les défenses antivirales de la cellule et en donnant quelques stratégies dont disposent les virus pour échapper à ce système de défense. Dans la deuxième partie, je présenterai mes travaux de recherche sous la forme de deux articles (le premier publié en 2020 dans *Autophagy* et le second actuellement en révision à *Review Commons* et disponible sur *bioRxiv*) accompagnés de résultats complémentaires. Je donnerai ensuite les conclusions générales et les perspectives qu'ouvrent l'ensemble de ces travaux. Enfin, une annexe correspondant à une nouvelle publiée en 2020 dans la revue *Médecine/sciences* est présente à la fin du manuscrit.

## Partie 1 - Données bibliographiques

# I Le virus Epstein-Barr

## I. 1 Généralités virologiques

### I. 1. A L'histoire de sa découverte

Si l'on devait dater le début de l'histoire de la découverte du virus Epstein-Barr (EBV), celle-ci débiterait en 1957. Cette année-là, le chirurgien britannique Denis Parsons Burkitt décrivit en Ouganda de nombreux cas de tumeurs localisées à la mâchoire chez de jeunes enfants (Burkitt, 1958). Initialement, il ne put identifier de facteurs communs permettant d'expliquer l'origine de cette pathologie agressive. Entre 1957 et 1964, des études de prévalence dans différentes régions d'Afrique, ainsi que la recherche de facteurs associés à ces cancers furent entreprises. Ces tumeurs, d'origine lymphoïde, porteront à partir de là le nom de lymphome de Burkitt (LB). Leur prévalence est élevée dans les régions où le paludisme est endémique (Burkitt & O'conor, 1961). Ainsi, au vu des conditions environnementales gouvernant leur distribution, D. Burkitt émit l'hypothèse d'une origine infectieuse à ces lymphomes. Ces découvertes suscitèrent l'intérêt de Michael Anthony Epstein, virologue britannique et spécialiste des virus oncogènes animaux. Travaillant sur le virus du sarcome de Rous, responsable de tumeurs chez le poulet, Epstein était sensible à l'idée que certains cancers humains puissent trouver leur origine dans une infection virale. Ainsi, une collaboration débuta entre les deux hommes. Les premières années de recherche resteront infructueuses car, on l'apprendra plus tard, le virus était en latence dans les biopsies de LB. Mais un jour, l'avion qui transportait ces biopsies fut dérouté en raison des conditions climatiques défavorables. L'augmentation du temps de trajet entraîna la réactivation du virus présent dans les échantillons. C'est ainsi que M. Epstein et son étudiante Yvonne Barr, purent identifier en 1964, par microscopie électronique, des particules virales au sein des cellules prélevées chez des enfants atteints de LB (Epstein et al., 1964). Ce nouveau virus, à la morphologie similaire à un herpèsvirus, fut baptisé du nom de ses découvreurs : virus Epstein-Barr. Il est à noter que l'EBV fut le premier virus identifié à l'origine d'un cancer humain.

Rapidement après sa découverte, Gertrude et Werner Henle mirent au point un test sérologique qui révéla un taux élevé de séropositivité à l'EBV chez des populations aux États-Unis, suggérant une dissémination planétaire de ce virus (Henle & Henle, 1966). D'importantes analyses de corrélation entre de forts titres d'anticorps dirigés contre l'EBV et des maladies d'origine inconnues furent entreprises. Les premiers résultats arrivèrent quatre années plus tard, toujours du laboratoire de Henle (Henle et al., 1968). La technicienne du laboratoire, qui ne possédait pas d'anticorps anti-EBV, donnait régulièrement son sang pour des études sur la transmission de l'EBV, mais ses lymphocytes ne



survivaient pas en culture. Cette technicienne tomba malade en août 1967, d'une supposée rubéole, qui après des tests révéleront qu'il s'agissait en réalité d'une mononucléose infectieuse (MNI). À son retour au travail, il fut surprenant d'observer que désormais ses lymphocytes proliféraient en culture et étaient positifs pour des antigènes de l'EBV. De plus, le sérum de la technicienne présentait des anticorps anti-EBV. C'est donc dans ce contexte que fut établi pour la première fois le lien entre l'infection par l'EBV et la MNI, la manifestation clinique la plus répandue du virus (Henle *et al.*, 1968).

### I. 1. B Taxonomie et classification

Dès sa découverte, ses ressemblances morphologiques avec les herpèsvirus ont conduit à classer l'EBV au sein de la famille des *Herpesviridae*. Cette vaste famille de virus comprend 8 membres infectant l'être humain répartis en 3 sous-familles et 6 genres (Tableau 1). La sous famille des *Alphaherpesvirinae* comprend le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1 ou HHV-1 pour *Human HerpesVirus 1*), le virus herpès simplex de type 2 (HSV-2 ou HHV-2) et le virus de la varicelle et du zona (VZV ou HHV-3). La sous-famille des *Betaherpesvirinae* comprend le cytomégalovirus humain (HCMV ou HHV-5), l'herpèsvirus humain de type 6 associé à la roséole (HHV-6) et l'herpèsvirus humain de type 7 (HHV-7). Enfin, la sous famille des *Gammaherpesvirinae* comprend l'herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi (KSHV ou HHV-8) et l'EBV que les taxonomistes ont également nommé HHV-4.

|                     |                           |       |                       |                          |                     |       |                           |                     |
|---------------------|---------------------------|-------|-----------------------|--------------------------|---------------------|-------|---------------------------|---------------------|
| <b>Ordre</b>        | <i>Herpesvirales</i>      |       |                       |                          |                     |       |                           |                     |
| <b>Famille</b>      | <i>Herpesviridae</i>      |       |                       |                          |                     |       |                           |                     |
| <b>Sous-famille</b> | <i>Alphaherpesvirinae</i> |       |                       | <i>Betaherpesvirinae</i> |                     |       | <i>Gammaherpesvirinae</i> |                     |
| <b>Genre</b>        | <i>Simplexvirus</i>       |       | <i>Varicellovirus</i> | <i>Cytomegalovirus</i>   | <i>Roseolovirus</i> |       | <i>Lymphocryptovirus</i>  | <i>Rhadinovirus</i> |
| <b>Type</b>         | HHV-1                     | HHV-2 | HHV-3                 | HHV-5                    | HHV-6               | HHV-7 | HHV-4                     | HHV-8               |
| <b>Nom</b>          | HSV-1                     | HSV-2 | VZV                   | HCMV                     | -                   | -     | EBV                       | KSHV                |

Tableau 1 | **Classification des virus de la famille des *Herpesviridae***

*EBV*, Epstein-Barr Virus ; *HCMV*, Human CytoMegalovirus ; *HHV*, Human HerpesVirus ; *HSV-1*, Herpes Simplex Virus type 1 ; *HSV-2*, Herpes Simplex Virus type 2 ; *KSHV*, Kaposi's Sarcoma-associated HerpesVirus ; *VZV*, Varicella-Zoster Virus.

La classification des *Gammaherpesvirinae* fut initialement établie selon des propriétés biologiques telles que l'exclusivité d'hôte, la persistance du génome sous forme d'épisome dans les cellules en division et l'oncogenèse associée à ces virus (Longnecker *et al.*, 2013). En effet, l'EBV et le KSHV sont associés au développement de cancers. L'EBV appartient au genre *Lymphocryptovirus*. D'un point de vue évolutif, ce genre viral aurait évolué à partir des virus du genre *Rhadinovirus*, car ces derniers présentent une diversité génomique plus importante et sont endémiques chez plusieurs mammifères.

## I. 1. C Structure de la particule virale

### I. 1. C. (a) Organisation du virion

Les particules virales de l'EBV présentent une morphologie caractéristique des *Herpesviridae* (Figure 1). Ce sont de « grands » virus mesurant de 120 à 200 nm et comprenant un génome à ADN double brin, protégé par une capsidie icosaédrique à symétrie cubique composée de 162 capsomères. Il s'agit d'un virus possédant une enveloppe décorée de diverses glycoprotéines, permettant notamment l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule cible. Enfin, entre l'enveloppe et la capsidie se trouve le tégument. Cette couche protéique confère une forme irrégulière aux virions, en raison de sa répartition inégale sous l'enveloppe.

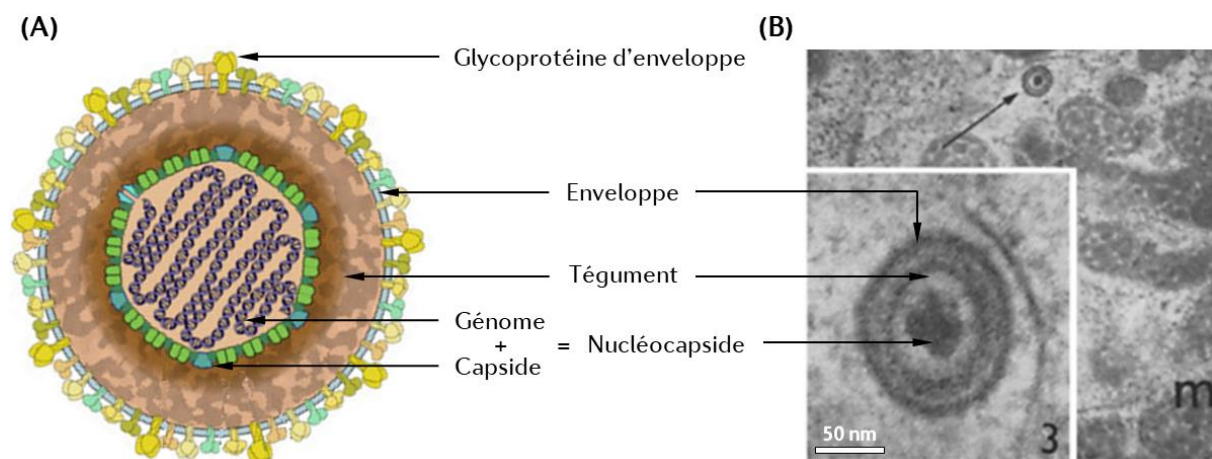


Figure 1 | **Structure de la particule virale de l'EBV**

**(A)** Représentation schématique du virion de l'EBV. **(B)** Photographie de microscopie électronique à transmission d'une particule virale mature. On distingue l'enveloppe virale, grâce à sa double membrane opaque aux électrons, ainsi que la nucléocapsidie abritant le génome viral. Entre l'enveloppe et la capsidie se trouve le tégument donnant sa forme au virion. La particule virale montrée mesure environ 115 nm de diamètre. Adaptée du site ViralZone et de (Epstein *et al.*, 1964).

### I. 1. C. (b) Caractéristiques du génome viral

L'EBV possède un génome à ADN double brin avec un taux de GC (Guanine et Cytosine) d'environ 60 % (Baer *et al.*, 1984; Kieff & Levine, 1974). Au sein de la particule virale, le génome est linéaire alors que dans le noyau des cellules hôtes, il se trouve sous forme circulaire appelée l'épisome. Comme pour l'ensemble des membres de la famille des *Herpesviridae*, la taille de son génome est conséquente : 172 kpb (kilopaires de base). La structure du génome (Figure 2) comprend différents éléments :

- à ses extrémités, deux à cinq séquences répétées nommées TR (*Terminal Repeat*) d'environ 500 pb (Given *et al.*, 1979). Ces séquences permettent la circularisation du génome en

- épisode. La forme épisomale permet à l'EBV de persister de manière latente chez son hôte. L'épisode sera décrit plus en détail dans le paragraphe traitant de la latence virale (§ 1. 2. D) ;
- six à douze séquences répétées à l'intérieur du génome (IR ou *Internal direct Repeat*). La plus grande de ces séquences est IR1 et compte 3,1 kpb ;
  - deux régions uniques, une courte (US) et une longue (UL), qui représentent la quasi-totalité de la partie codante du génome. Ces régions sont séparées l'une de l'autre par IR1 ;
  - les régions uniques, US et UL, sont également sous-divisées en cinq domaines (U1 à U5) ;
  - une origine de répllication latente (*oriP*) est présente ainsi que deux origines de répllication lytique (*oriLyt*) ;
  - il est à noter que les deux sens de lecture du génome, droite et gauche, sont utilisés.

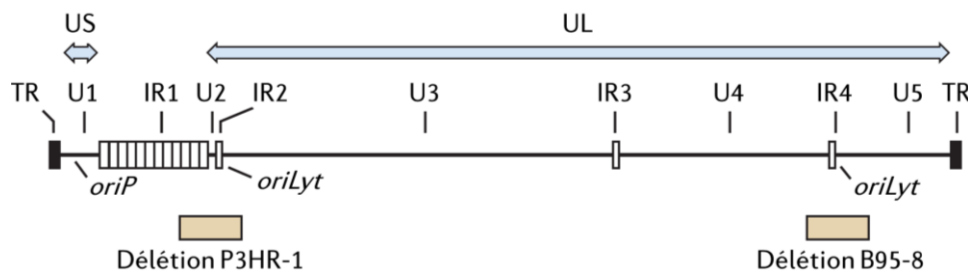


Figure 2 | **Organisation linéaire du génome de l'EBV**

Le génome comprend deux régions uniques US et UL, correspondant aux régions codantes. On retrouve également des répétitions internes (IR1-4), des domaines de séquences uniques (U1-5) ainsi que des séquences répétées TR aux extrémités. La position de l'origine de répllication latente (*oriP*) est indiquée. Les deux origines de répllication lytique (*oriLyt*), localisées dans les domaines uniques U3 et U5, sont également indiquées. Les régions délétées des souches virales P3HR-1 et B95-8 sont montrées. Adaptée de (Longnecker *et al.*, 2013).

IR, *Internal Repeat* ; TR, *Terminal Repeat* ; US, *Unique Short* ; UL, *Unique Long*.

Le génome de l'EBV est sujet à des polymorphismes génétiques, comme des délétions (Figure 4) qui sont observées chez des souches virales de laboratoire (B95-8 et P3HR-1), ayant des conséquences plus ou moins importantes selon la région affectée. Par exemple, la souche B95-8 présente une délétion de 11,8 kpb n'ayant pas d'impacts majeurs sur ses fonctions virales, tandis que la délétion retrouvée chez la souche P3HR-1 la rend incapable de transformer les cellules *in vitro*.

La nomenclature des protéines de l'EBV fut définie lors du séquençage complet du génome de la souche B95-8. La séquence fut obtenue à partir d'une banque de fragments d'ADN viraux, issus de la digestion du génome par l'enzyme de restriction *Bam*HI (Baer *et al.*, 1984). Chaque cadre ouvert de lecture, ou ORF (*Open Reading Frame*), a ensuite été nommé d'après le profil de digestion obtenu. Ainsi, le nom de toutes les protéines de l'EBV commence par la lettre « B » (pour *Bam*HI), suivie d'une seconde lettre (de A à Z) renseignant la position du gène parmi les fragments de digestion, classés en fonction de leur taille décroissante (la lettre A étant pour le fragment le plus grand). Selon l'orientation de transcription du gène s'ajoute la lettre « L », pour *leftward reading frame*, ou « R » pour *rightward*

*reading frame*. Enfin, le numéro du cadre de lecture est renseigné par la lettre « F », pour *frame*, suivi du numéro correspondant. À titre d'exemple, le nom de la protéine BHRF1 est dû à la localisation de son gène sur le 8<sup>ème</sup> fragment (H) *Bam*HI (B), transcrit vers la droite (R) depuis le premier cadre de lecture (F1).

### I. 1. C. (c) Protéines constituant le virion

#### L'enveloppe virale

L'enveloppe de l'EBV est ornée de diverses glycoprotéines, à savoir BLLF1 (gp350/220), BXLF2 (gH), BALF4 (gB), BZLF2 (gp42), BBRF3 (gM), BILF2 (gp78), BLRF1 (gN), BDLF3 (gp150), BKRF2 (gL) et BMRF2.

#### Le tégument

Cette structure, localisée entre l'enveloppe et la capside, se compose de BPLF1 (350-kDa *large tegument protein*), BOLF1 (140-kDa *large tegument binding protein*), BBLF1 (15-kDa *myristylated protein*), BGLF2 (32-kDa *myristylated binding protein*), BVRF1 (58-kDa *capsid associated protein*), BGLF1 (58-kDa *packaging protein*), BSRF1 (27-kDa *palmitylated protein*) et BGLF4 (47-kDa *serine-threonine kinase*). Le tégument de l'EBV possède également des protéines spécifiques des *gammaherpesvirinae* telles que BNRF1 (140-kDa *major tegument protein*), BLRF2, BRRF2, BDLF2 et BKRF4 (Johannsen *et al.*, 2004). Quelques protéines cellulaires entrent également dans la composition du tégument (actine,  $\beta$ -tubuline, cofiline, émolase et des HSP [*Heat Shock Protein*]). Celles-ci seraient probablement incluses lors de l'étape de l'enveloppement secondaire (Longnecker *et al.*, 2013).

#### La capside

La capside est composée de 5 protéines : la protéine majeure de capside BCLF1 (155 kDa *major capsid protein*), BDLF1 (30 kDa *minor capsid protein*), BFRF3 (18 kDa *small capsid protein*), BORF1 (40 kDa *minor capsid binding protein*) et la protéine qui permet l'entrée et la sortie de l'ADN viral dans la capside (« portail ») BBFR1 (68 kDa *portal protein*).

## I. 2 Cycle biologique de l'EBV

### I. 2. A Tropicisme cellulaire

L'EBV présente un tropisme double pour les cellules épithéliales et certaines cellules immunitaires, comme les lymphocytes B et plus rarement les lymphocytes T ou NK (*Natural Killer*). En effet, l'EBV se réplique dans les cellules épithéliales, puis infecte de manière persistante les lymphocytes B, notamment les lymphocytes B mémoires dans lesquels s'établit la latence virale. Périodiquement, ces

lymphocytes infectés de manière latente peuvent devenir permissifs à la réactivation permettant à l'EBV de se répliquer à nouveau.

### I. 2. B Mode de transmission et pénétration dans l'organisme

La transmission interindividuelle de l'EBV s'effectue par voie orale, c'est-à-dire lors de contacts rapprochés, par le biais de la salive, qui est vectrice des particules virales. La primo-infection à l'EBV intervient dans la majorité des cas au cours de la petite enfance, lors des contacts familiaux, passant généralement inaperçue (Gratama *et al.*, 1990). Cependant, dans les populations occidentales la primo-infection est souvent retardée à l'adolescence, car la moitié des enfants de moins de dix ans sont séronégatifs, conduisant à une infection plus souvent symptomatique. Les pathologies associées aux infections à EBV seront traitées plus loin dans ce manuscrit (§ I. 3).

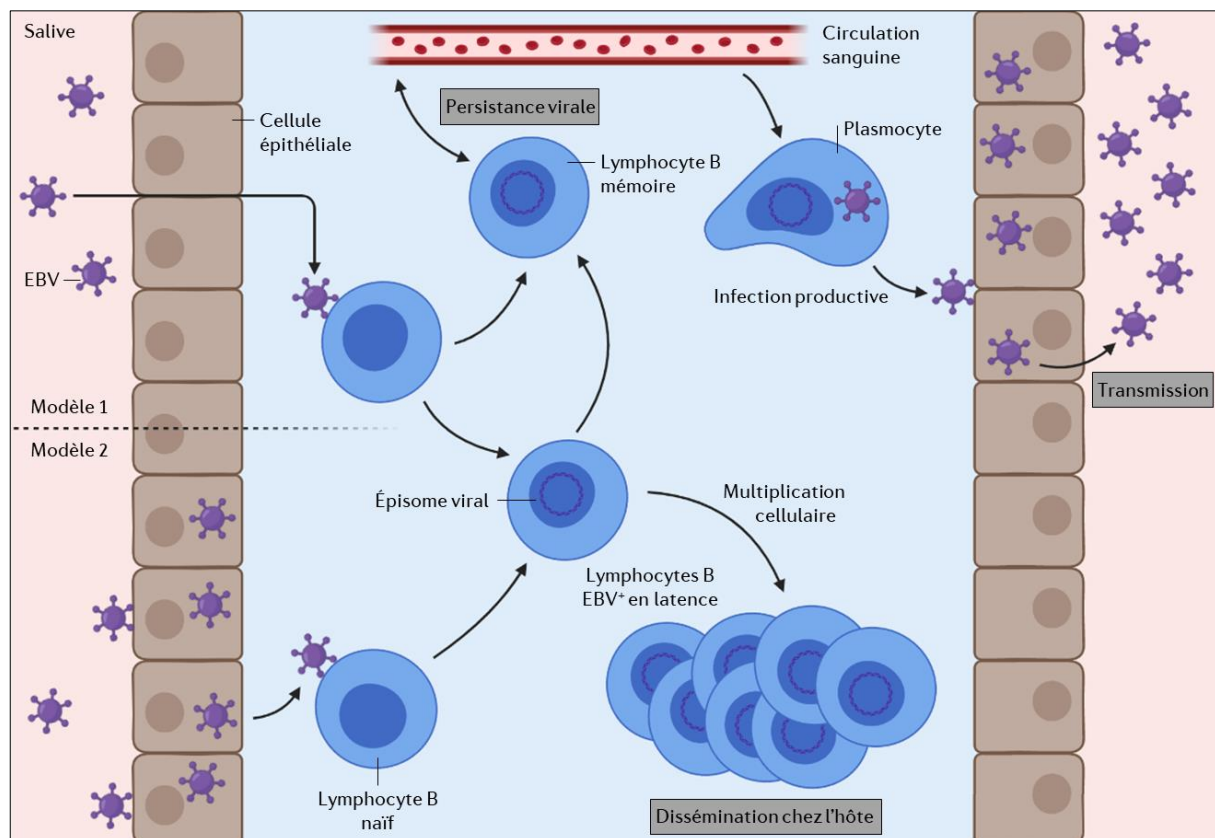


Figure 3 | **Modèle du cycle de vie de l'EBV**

La salive constitue le vecteur de contamination à l'EBV. Au niveau de l'oropharynx, le virus peut, soit cibler directement les lymphocytes B au repos en passant au travers des jonctions serrées de l'épithélium (modèle 1), soit infecter les cellules épithéliales qui, après production de nouveaux virions, entraîneront l'infection des lymphocytes B (modèle 2). Après infection des lymphocytes B, le génome de l'EBV se circularise dans le noyau pour donner une infection latente durant laquelle seuls certains gènes de latence s'expriment. La persistance à vie de l'EBV a lieu dans les lymphocytes B mémoires du sang périphérique. La multiplication des lymphocytes B EBV<sup>+</sup> permet au virus d'assurer sa dissémination chez son hôte. La différenciation des lymphocytes B en plasmocytes est un signal inducteur de la réactivation du cycle productif de l'EBV. Lors de la réactivation, les virus néosynthésés pourront infecter les cellules épithéliales de l'oropharynx, ce qui aboutit au relargage de virions dans la salive, rendant l'individu contaminant. *Created with BioRender.com.*

La transmission verticale de la mère à l'enfant, *in utero* ou au cours de l'allaitement, a également été décrite (Meyohas *et al.*, 1996). La transmission sexuelle est controversée dans la mesure où l'EBV est assez peu retrouvé dans les sécrétions génitales comparativement à la salive (Thomas *et al.*, 2006). Enfin, la transmission iatrogène de l'EBV à la suite de transplantations d'organes (Gratama *et al.*, 1988), ou par voie sanguine via des donneurs présentant une MNI (Tattevin *et al.*, 2002), est également décrite.

Lors de la primo-infection, le mécanisme de pénétration de l'EBV dans notre organisme reste à l'heure actuelle controversé (Figure 3). Un premier modèle propose que le virus pénétrerait dans l'épithélium oropharyngé, où il commencerait à se répliquer, puis infecterait les lymphocytes B des sites sous-muqueux permettant d'établir une infection persistante (Cohen, 2000; Greenspan *et al.*, 1985; Temple *et al.*, 2014). D'autres études ont proposé que les lymphocytes B de l'oropharynx seraient le site primaire d'infection par l'EBV (Anagnostopoulos *et al.*, 1995; Münz, 2019; Niedobitek *et al.*, 1997). Selon ce modèle, le virus passerait par les jonctions serrées des cellules épithéliales, au niveau des cryptes amygdaliennes, afin d'atteindre directement les lymphocytes B et d'y établir une infection latente (Münz, 2019).

### I. 2. C La réplication virale ou cycle productif de l'EBV

Dans l'organisme, l'EBV peut se multiplier de deux manières : soit lors de la division des lymphocytes B mémoires infectés de manière latente ; soit après réactivation du cycle productif (Münz, 2019). La première option permet la dissémination de l'EBV chez un hôte infecté de manière latente tandis que la seconde option assure la transmission virale en permettant la production de nouvelles particules virales infectieuses.

Comme pour tous les *Herpesviridae*, le cycle productif peut être induit à deux étapes du cycle de vie du virus : soit au cours de la primo-infection, soit lors de sa réactivation. Les connaissances actuelles sur le cycle productif de l'EBV, lors de la primo-infection, sont incomplètes puisqu'il n'existe pas de système de culture permettant d'étudier son mécanisme complet. De plus, les infections *in vitro* par l'EBV conduisent généralement à une entrée en latence du virus ou bien à la mort de la cellule hôte. Ainsi, les données actuellement disponibles sur le cycle productif proviennent de lignées cellulaires porteuses de l'EBV latent, dans lesquelles la réactivation du cycle productif a été induite. Un schéma complet du cycle productif de l'EBV est présenté en Figure 4.



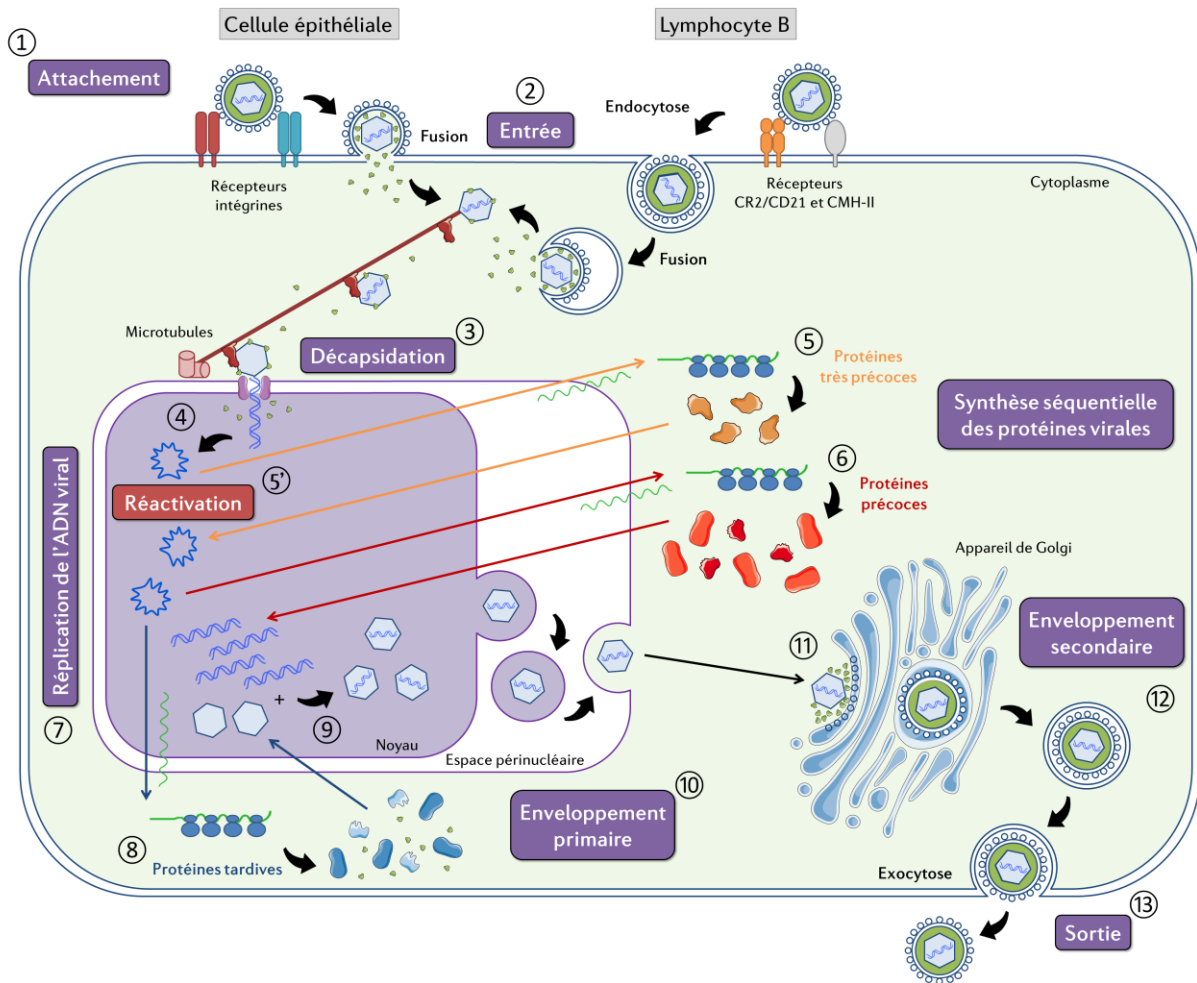


Figure 4 | Schéma du cycle productif complet de l'EBV

L'EBV peut infecter à la fois les cellules épithéliales et les lymphocytes B. Pour y parvenir, il se fixe à la cellule hôte via des récepteurs spécifiques ①. L'entrée se fait par fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique ou endosomale ②. Les nucléocapsides sont acheminées vers le noyau, via les microtubules, où s'effectue la décapsidation ③ pour libérer le génome dans le noyau où il se circularise ④. L'expression séquentielle des protéines virales démarre tout d'abord avec la synthèse des protéines très précoces ⑤ qui vont induire la synthèse des protéines précoces ⑥. Ces dernières permettent la réplication du génome viral ⑦, puis elles initient la synthèse des protéines tardives ⑧. Parmi celles-ci, les protéines de capsid s'auto-assemblent dans le noyau avec les génomes néo-synthétisés ⑨. Les nucléocapsides sortent du noyau : c'est l'enveloppement primaire ⑩. Les nucléocapsides sont adressées à l'appareil de Golgi ⑪, au travers duquel elles transitent afin d'acquérir le tégument et leur enveloppe : c'est l'enveloppement secondaire ⑫. Les virions, présents dans des vésicules dérivées de l'appareil de Golgi, sont libérés de la cellule par exocytose ⑬. Dans le cas d'un cycle productif, consécutif à la réactivation d'un virus latent, le cycle démarre à l'étape ⑤.

### I. 2. C. (a) L'attachement de l'EBV et son entrée

Le mécanisme d'entrée de l'EBV diffère selon le type cellulaire infecté. En effet, l'entrée du virus dans les lymphocytes B se fera après une étape d'endocytose par fusion de son enveloppe avec la membrane endosomale, tandis que l'entrée dans les cellules épithéliales se fera par fusion directe de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique (Longnecker *et al.*, 2013).

La première étape correspond à l'attachement de la particule virale sur son récepteur, ce qui permettra l'entrée dans la cellule cible (Figures 4 et 5). L'entrée de l'EBV implique plusieurs de ses glycoprotéines d'enveloppe, parmi lesquelles :

- gp350/220 et BMRF2. Ces glycoprotéines sont impliquées dans l'attachement du virus à la cellule cible et pour la transduction du signal conduisant à la fusion ;
- gp42 qui permet la fixation à un co-récepteur cellulaire et détermine le tropisme. Lorsque l'enveloppe virale est riche en gp42, l'EBV se fixe préférentiellement aux lymphocytes B, alors qu'une faible proportion de gp42 permet la fixation du virus à la fois aux lymphocytes B et aux cellules épithéliales (Jiang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 1998b) ;
- gB et l'hétérodimère gH/gL. Ces trois glycoprotéines, conservées chez tous les *Herpesviridae*, forment le complexe nécessaire à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Plus précisément, la glycoprotéine gB contient l'élément fusogène du complexe.

#### Mécanisme d'entrée dans les lymphocytes B

L'entrée du virus dans les lymphocytes B (Figure 5) est initiée suite à l'attachement de la glycoprotéine virale gp350/220 au récepteur cellulaire CR2/CD21 (*Complement Receptor 2*) ou CR1/CD35 (D'Addario *et al.*, 2001). Cette adhésion à la surface de la cellule cible entraîne l'endocytose de la particule virale (Miller & Hutt-Fletcher, 1992). La glycoprotéine gp42, associée à gH/gL, interagit avec le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II, un co-récepteur. Cette fixation entraîne un changement de conformation au niveau de la poche hydrophobe de gp42, permettant une interaction avec gB. La gB subit une transition vers son état post-fusion, permettant à l'EBV de pénétrer dans le lymphocyte B par fusion de son enveloppe avec la membrane endosomale (Möhl *et al.*, 2016).

#### Mécanisme d'entrée dans les cellules épithéliales

L'entrée de l'EBV dans les cellules épithéliales (Figure 5) diffère de l'entrée dans les lymphocytes car ces deux types cellulaires n'expriment pas les mêmes récepteurs à leur surface. Les cellules épithéliales étant généralement dépourvues de CMH de classe II (et de récepteurs CD21), l'attachement de l'EBV n'implique pas la gp42, mais plutôt la protéine d'enveloppe BMRF2. En effet, cette glycoprotéine possède un motif RGD (Arg-Gly-Asp) extracellulaire lui permettant d'interagir avec différentes familles d'intégrines ( $\beta$ -1 et  $\alpha$ v) à la surface des cellules épithéliales de l'oropharynx (Xiao *et al.*, 2009). Ainsi, BMRF2 se fixe à l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 (Möhl *et al.*, 2016). La glycoprotéine gH se fixe à une seconde intégrine appelée  $\alpha$ v $\beta$ 6. Un changement de conformation au niveau de l'hétérodimère gH/gL permet son interaction avec la protéine fusogène gB. La glycoprotéine gB passe ainsi en conformation post-fusion, permettant l'entrée de l'EBV par fusion directe de son enveloppe avec la membrane plasmique (Möhl *et al.*, 2016).



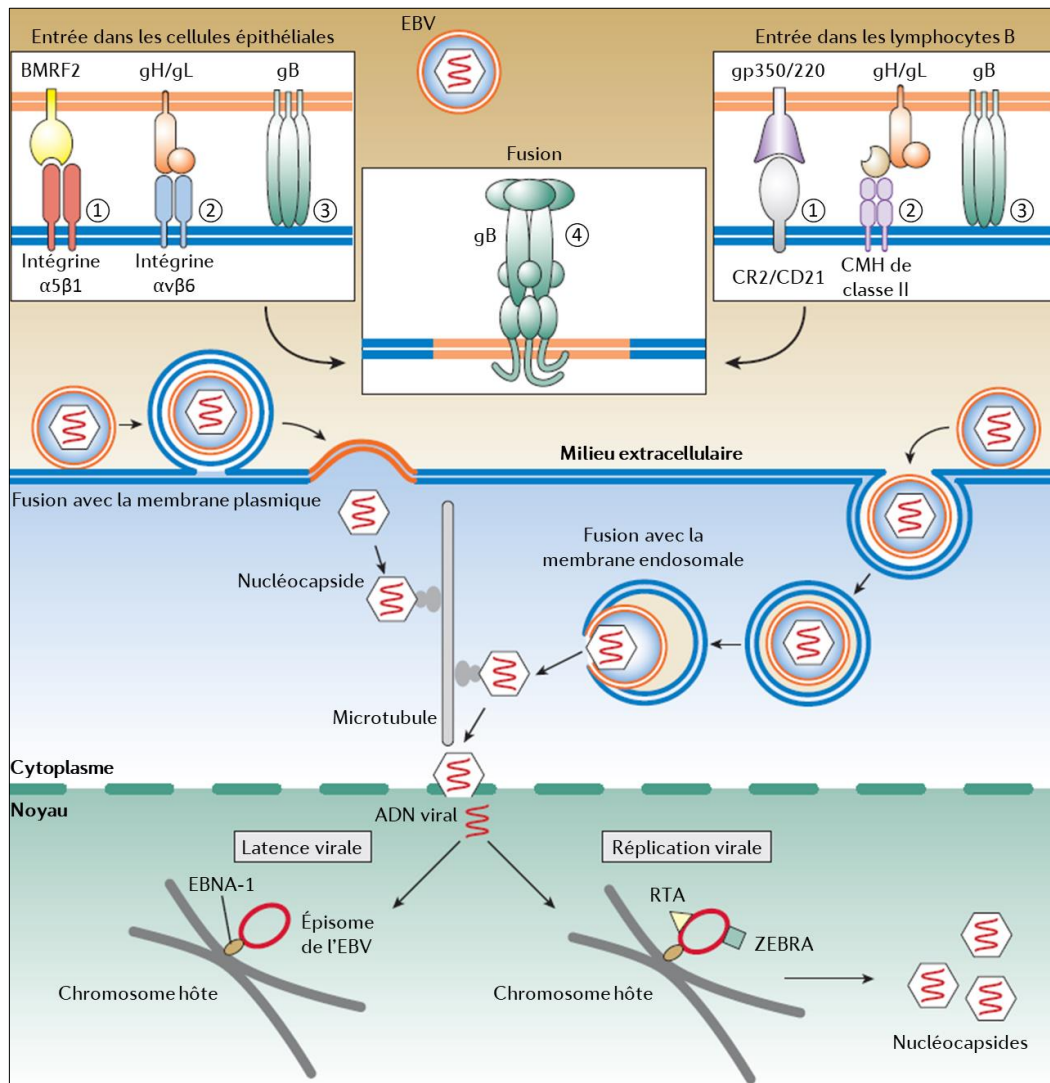


Figure 5 | **Mécanismes d'entrée de l'EBV selon le tropisme cellulaire**

Pour l'entrée dans les cellules épithéliales (panel de gauche), l'EBV se lie aux cellules via l'interaction d'intégrines cellulaires ( $\alpha 5\beta 1$ ) avec BMRF2 (1). Suite à cette interaction, l'hétérodimère gH/gL se fixe à d'autres intégrines ( $\alpha 6\beta 6$ ) (2) induisant un changement de conformation permettant la fusion médiée par gB (3) et (4).

Pour l'entrée dans les lymphocytes B (panel de droite), l'EBV se fixe tout d'abord aux récepteurs CR2/CD21 via la glycoprotéine gp350/220 (1). Suite à cette interaction, gp42 se fixe au CMH de classe II (2), activant la fusion médiée par gH/gL et gB (3) et (4).

Après fusion, la nucléocapside est relarguée dans le cytoplasme puis transportée jusqu'à la membrane nucléaire via les microtubules. Le génome de l'EBV est alors libéré dans le noyau à travers les pores nucléaires. L'infection pourra être latente (panel de gauche) ou productive (panel de droite). Lors de la latence, l'épisome viral est ancré aux chromosomes de l'hôte grâce à la protéine virale EBNA-1 et seules les protéines dites de latence s'expriment. L'infection productive résulte de l'expression des protéines transactivatrices RTA et ZEBRA, et assure la production de nouveaux virions. Adaptée de (Longnecker *et al.*, 2013).

#### Mécanisme d'entrée dans les lymphocytes T/NK

Bien que les lymphocytes T et NK soient dépourvus de CD21, leur infection par l'EBV fut démontrée chez des patients atteints de MNI (Hudnall *et al.*, 2005). Cependant, le récepteur ainsi que le mécanisme d'entrée ne sont pas identifiés. Les lymphocytes NK sont hautement réactifs vis-à-vis des

lymphocytes B EBV<sup>+</sup> et les études s'accordent sur le fait que l'infection des lymphocytes NK aurait lieu lorsque ces derniers ciblent les cellules infectées par l'EBV (Gru *et al.*, 2015; Tabiasco *et al.*, 2003).

#### I. 2. C. (b) Décapsidation et pénétration du génome dans le noyau

L'entrée du virus permet la libération du tégument et de la nucléocapside dans le cytoplasme (Figure 4). Cette dernière se dirige vers le noyau où a lieu l'étape de décapsidation, laissant pénétrer l'ADN viral dans le noyau via les pores nucléaires (Figure 4). Le mécanisme d'acheminement de la nucléocapside vers le noyau est mal compris, mais il pourrait reposer sur l'utilisation du réseau de microtubules, comme cela a déjà été décrit pour HSV-1 (Pasdeloup, 2016). Une fois le génome parvenu au noyau, il subit une étape de circularisation afin de le protéger de la dégradation et de minimiser l'induction de la réponse aux dommages de l'ADN (Hurley & Thorley-Lawson, 1988). Le génome sous forme d'épisome lui permet de se répliquer et d'assurer sa persistance. Le virus utilise à la fois la machinerie enzymatique virale et cellulaire afin de produire ses protéines et répliquer son génome.

#### I. 2. C. (c) Expression des protéines virales très précoces et précoces

Le cycle productif du virus est caractérisé par l'expression séquentielle du répertoire de gènes viraux. Tout d'abord sont exprimés les gènes très précoces (IE pour *Immediate Early*), puis les gènes précoces (E pour *Early*) et enfin les gènes tardifs (L pour *Late*) (Figure 4). Ces derniers codent pour les protéines structurales du virus et ne sont donc synthétisées qu'après répllication du génome viral. La transcription des gènes viraux implique l'ARN polymérase II cellulaire, comme pour tous les *Herpesviridae* (Aubry *et al.*, 2014).

Les gènes très précoces *BZLF1* et *BRLF1* ont pour produits respectifs les protéines ZEBRA (aussi appelée Zta ou EB1) et RTA. Il s'agit de deux protéines transactivatrices, qui agissent de concert pour induire le cycle productif de l'EBV (Chevallier-Greco *et al.*, 1986; Feederle *et al.*, 2000). Ces protéines ne sont donc pas exprimées durant la latence, leur expression sera initiée seulement au cours de la réactivation virale. Une fois synthétisées, les protéines très précoces ZEBRA et RTA gagnent le noyau où elles stimulent les promoteurs de gènes précoces. Ces gènes gouvernent la synthèse de protéines impliquées dans le processus de répllication du génome. Les protéines du complexe de répllication, décrites ci-après (§ I. 2. C. (d)), interviennent au niveau de l'*oriLyf* afin d'amplifier le génome viral (Hammerschmidt & Sugden, 1988). Il est à noter que la primo-infection, *in vitro*, dans des lymphocytes B ne peut pas induire directement un cycle productif (Chiu & Sugden, 2016). En effet, bien que ZEBRA soit exprimée rapidement après l'infection (Wen *et al.*, 2007), elle n'est pas capable d'induire l'expression des gènes viraux du cycle productif car elle a besoin de promoteurs méthylés pour se fixer (Bhende *et al.*, 2004), or l'ADN des virions n'est pas méthylé (Chiu & Sugden, 2016). La

primo-infection est donc dite abortive. Pour induire le cycle productif, une latence doit d'abord s'établir afin que les cellules prolifèrent ce qui permettra à l'ADN viral d'être méthylé. S'en suit une réactivation, où ZEBRA jouera le rôle de transactivateur. Dans le cadre d'une infection des cellules épithéliales, le cycle productif est préférentiellement induit par la protéine RTA (Zalani *et al.*, 1996). En plus de sa fonction transactivatrice, ZEBRA est également essentielle pour la réplication de l'ADN viral en interagissant avec l'*oriLyt* et les protéines du complexe de réplication (Schepers *et al.*, 1996).

Une fois la réplication du génome assurée, certaines protéines précoces sont indispensables pour induire la synthèse des protéines tardives. C'est notamment le cas de BcRF1 qui, en complexe avec d'autres protéines précoces, interagit avec l'ARN polymérase II pour activer la transcription des gènes tardifs (Aubry *et al.*, 2014; Gruffat *et al.*, 2012). Au cours de cette phase, l'EBV exprime également des protéines participant à l'échappement au système immunitaire. Parmi elles, retenons l'expression de BNLF2a qui prévient le chargement de peptides viraux sur les molécules de CMH-I, et donc limite l'élimination des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques (Wycisk *et al.*, 2011). À des fins similaires, BILF1 induit l'internalisation et la dégradation des molécules de CMH-I (Zuo *et al.*, 2009).

#### I. 2. C. (d) Réplication du génome viral

Plusieurs protéines virales néo-synthétisées interviennent dans la réplication du génome de l'EBV. Parmi ces protéines constituant la machinerie de réplication, on trouve : BALF5 (ADN polymérase), BMRF1 (facteur de processivité), BALF2 (protéine majeure de liaison à l'ADN), BORF2/BaRF1 (ribonucléotide réductase), BXLF1 (thymidine kinase) et BGLF5 (exonucléase alcaline). Notons que cette dernière agit comme un facteur de restriction de l'hôte en induisant la dégradation d'ARNm cellulaires et en facilitant l'évasion immunitaire (Rowe *et al.*, 2009). La réplication du génome de l'EBV se produirait selon le modèle du cercle roulant, impliquant la formation de longs concatémères d'ADN tête-queue (Pfüller & Hammerschmidt, 1996). Une fois le génome répliqué, il est coupé au niveau des régions terminales répétées (TR) aboutissant ainsi à un génome linéaire de taille complète, prêt à être encapsidé (Hammerschmidt & Sugden, 2013; Wang *et al.*, 1998a).

#### I. 2. C. (e) Expression des protéines tardives, assemblage du virion et sortie

Les protéines tardives correspondent à des protéines de structure comprenant notamment les protéines de capsid, du tégment, mais également les glycoprotéines d'enveloppe (Longnecker *et al.*, 2013). Les protéines de capsid sont synthétisées dans le cytoplasme, puis gagnent le noyau où elles s'assemblent avec les génomes néo-synthétisés (Figure 4). Les nucléocapsides ainsi formées quittent le noyau par un phénomène d'enveloppement-désenveloppement au travers de la membrane nucléaire. Le passage de la membrane interne fait acquérir aux particules virales une première

enveloppe, qu'elles perdront lors de la fusion avec la membrane externe (Bigalke & Heldwein, 2015; Nowag & Münz, 2015). Ainsi, on retrouve dans le cytoplasme des nucléocapsides nues (Figure 4). L'ensemble des glycoprotéines d'enveloppe étant synthétisées au niveau de l'appareil de Golgi, les nucléocapsides vont se localiser à son niveau afin d'acquérir leur enveloppe finale. Les nucléocapsides bourgeonneront à travers les vésicules de sécrétion du réseau trans-Golgien, emportant avec elles les protéines du tégument (Figure 4). L'enveloppe virale est par conséquent dérivée des membranes de l'appareil de Golgi et décorée, à sa surface, de glycoprotéines virales. Les vésicules contenant les virions fusionneront ensuite avec la membrane plasmique de la cellule hôte, permettant leur libération dans le milieu extracellulaire par exocytose (Figure 4). L'autophagie est particulièrement impliquée au cours des étapes tardives du cycle viral puisqu'il a notamment été rapporté que l'inhibition de l'autophagie conduit à l'accumulation d'ADN viral dans le cytoplasme (Nowag *et al.*, 2014). Cette observation s'explique par le fait que l'autophagie est essentielle à l'EBV pour l'acquisition de son enveloppe mais aussi pour la sécrétion des virions (Granato *et al.*, 2014; Nowag *et al.*, 2014; Nowag & Münz, 2015).

### I. 2. D La latence de l'EBV

Comme tout virus, par définition l'EBV constitue un parasite de notre organisme. Habituellement, une infection virale est transitoire et se résorbe sous l'action du système immunitaire. Cependant, les *Herpesviridae* se distinguent d'autres familles de virus par leur faculté à rester latent. En effet, une fois l'infection lytique contrôlée, le virus persistera chez son hôte jusqu'à sa mort. Le site de latence varie selon les virus. Concernant l'EBV, la latence s'établit dans les lymphocytes B.

#### I. 2. D. (a) L'entrée en latence de l'EBV

La latence correspond à un état de dormance où le virus ne persiste plus que par l'intermédiaire de son génome dans la cellule hôte. Seul un nombre limité de gènes dits « latents » seront exprimés, sans permettre la production de particules virales. Pour l'EBV, les lymphocytes B mémoires qui circulent dans le sang périphérique constituent le site de latence (Thorley-Lawson *et al.*, 2013). L'établissement de la latence repose sur deux phénomènes :

- la répression du cycle lytique suivie de la circularisation de l'ADN viral ;
- l'expression des gènes de latence, qui s'effectue à partir de 3 promoteurs principaux Cp, Wp et Qp (Young *et al.*, 2016).

Le génome viral adopte la forme d'un épisome multi-copies possédant une structure chromosomique similaire aux chromosomes humains (Tempera & Lieberman, 2010). Diverses protéines cellulaires (histones, complexes de remodelage de la chromatine) sont recrutées sur l'épisome entraînant

différentes modifications post-traductionnelles (MPT ; acétylation ou méthylation) via la machinerie épigénétique (Lieberman, 2013). L'EBV peut ainsi se répliquer de façon synchrone à la cellule hôte, en phase S du cycle cellulaire, à partir de l'origine de répllication latente *oriP* (Hammerschmidt & Sugden, 1988; Young *et al.*, 2016). Cette répllication permet le maintien de l'ADN épisomal. La structure de l'épisome est montrée en Figure 6.

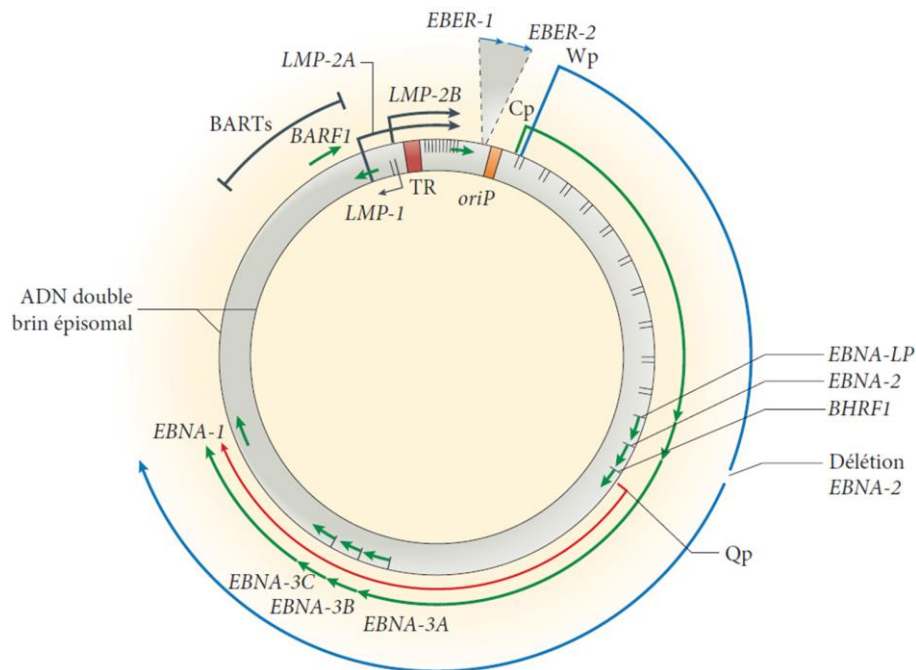


Figure 6 | Organisation des gènes de latence sur l'épisome de l'EBV

L'origine de répllication *oriP* est montrée en orange. Les courtes flèches vertes symbolisent les exons codants les protéines : six antigènes nucléaires EBNA (-1, -2, -3A, -3B, -3C et -LP), trois protéines membranaires LMPs (-1, -2A et -2B), BHRF1 et BARF1. Les petites flèches bleues, en haut, représentent les ARN non-polyadénylés *EBER-1* et *EBER-2*. La longue flèche verte représente les transcrits à partir des promoteurs Cp ou Wp ; les différentes EBNA sont codées par des ARNm individuels, issus de l'épissage d'un même transcrit. La flèche rouge représente le transcrit *EBNA-1* à partir du promoteur Qp. La longue flèche bleue représente le transcrit à partir du promoteur Wp et présentant une délétion au niveau du gène *EBNA-2*. Adaptée de (Young *et al.*, 2016).

#### I. 2. D. (b) Les différentes formes de latence

Les produits de gènes de latence regroupent :

- six protéines nucléaires EBNA (*Epstein-Barr Nuclear Antigen* ; EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C et -LP) ;
- trois protéines membranaires LMP (*Latent Membrane Protein* ; LMP-1, -2A et -2B) ;
- deux ARN nucléaires non-codant *EBER* (*Epstein-Barr Encoded RNA* ; *EBER-1*, -2) ;
- les protéines BARF1 et BHRF1 ;
- ainsi qu'une quarantaine de microARN (miR) produits à partir de deux régions de sens opposés du génome viral (miR-*BHRF1* et miR-*BART*).

La localisation de chaque gène de latence est donnée en Figure 6. Le rôle des protéines et ARN de latence, qui sera vu plus en détail par la suite (§ I. 2. D. (c)), est double. D'une part, ils assurent le contrôle du système immunitaire en permettant aux cellules infectées de ne pas être reconnues et éliminées (Münz, 2016). D'autre part, ces protéines jouent un rôle prépondérant dans la prolifération et la transformation des cellules infectées (Kang & Kieff, 2015; Lieberman, 2013). Ces propriétés des protéines de latence expliquent pourquoi les infections latentes à l'EBV sont associées au développement de cancers.

Au cours de sa latence, l'EBV peut adopter au moins 5 profils d'expression génique, qui correspondent à différents programmes de latence (Rowe *et al.*, 2009). Chaque programme de latence est défini selon le répertoire de gènes viraux s'exprimant (Figure 7). On distingue donc :

- la latence dite « zéro » (L-0). Il s'agit d'une latence stricte au cours de laquelle la dormance de l'EBV est totale. C'est-à-dire qu'aucun élément viral n'est exprimé. On retrouve cette forme de latence au sein des lymphocytes B mémoires quiescents (Babcock *et al.*, 1998). Ces cellules mémoires persisteront toute la vie et constituent le réservoir viral, dans la mesure où elles ne seront pas reconnues et éliminées par le système immunitaire ;
- la latence de type I (L-I), qui se caractérise par l'expression unique de la protéine EBNA-1 sous le contrôle du promoteur Qp ;
- la latence de type II (L-II), qui est caractérisée par l'expression, toujours sous le contrôle du promoteur Qp, de la protéine EBNA-1 et des protéines LMPs (-1, -2A et -2B) ;
- la latence restreinte Wp (L-Wp). Elle se caractérise par une délétion du génome viral, comprenant les régions codantes de l'EBNA-2 et d'une partie d'EBNA-LP. Cette délétion a pour conséquence de positionner le gène *BHRF1* à proximité du promoteur Wp, permettant l'expression à haut niveau de BHRF1 ainsi que du reste de protéines EBNA (Kelly *et al.*, 2009) ;
- la latence de type III (L-III), qui présente l'expression de toutes les protéines de latence (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP, LMP-1, -2A et -2B) ainsi que de BHRF1 sous le contrôle des promoteurs Cp et Wp.



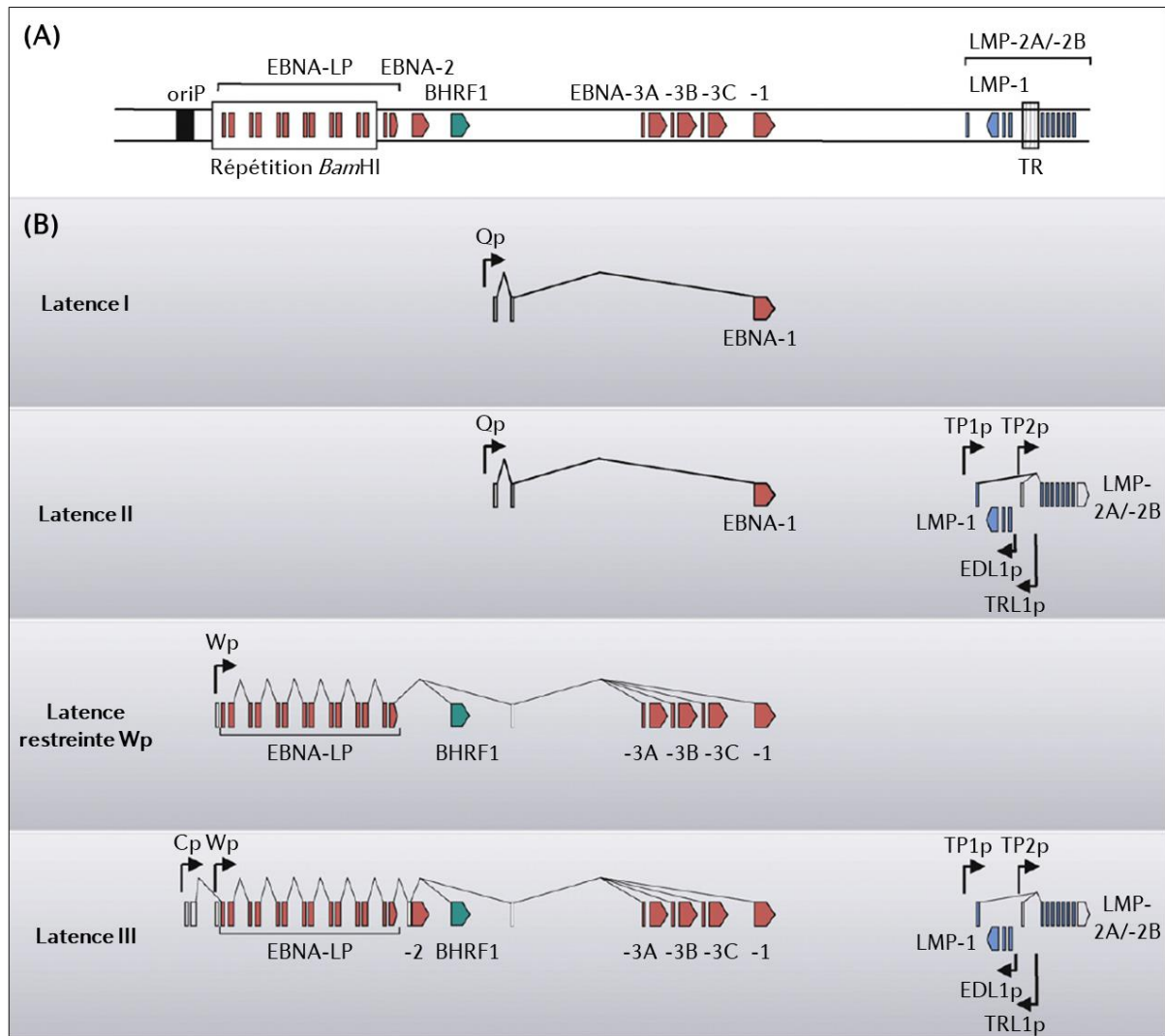


Figure 7 | Profil d'expression génique de l'EBV au cours des différents programmes de latence

**(A)** Représentation simplifiée du génome de l'EBV, montrant la localisation des gènes codants pour les antigènes nucléaires EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C et -LP, les protéines membranaires latentes LMP-1, -2A et -2B, ainsi que la protéine BHRF1. **(B)** Le panel inférieur présente les transcrits exprimés au cours de chaque programme de latence. Les promoteurs impliqués dans l'expression de chaque gène viral sont indiqués par des flèches. Adaptée de (Rowe *et al.*, 2009).

Dès 1998, il a été montré que les cellules positives pour l'EBV étaient les lymphocytes B mémoires du sang périphérique (Babcock *et al.*, 1998). La manière dont l'EBV atteint ces cellules et s'y maintient s'explique au travers des différents programmes de latence, qui sont caractéristiques des différentes étapes franchies par le virus lors de la primo-infection (Figure 8). Initialement, l'EBV infecte les lymphocytes B naïfs des tissus lymphoïdes. Rapidement, l'ARN polymérase II cellulaire permet l'expression des premiers gènes de latence, sous le contrôle des promoteurs Wp et Cp, permettant la mise en place d'une L-III (Babcock *et al.*, 2000).

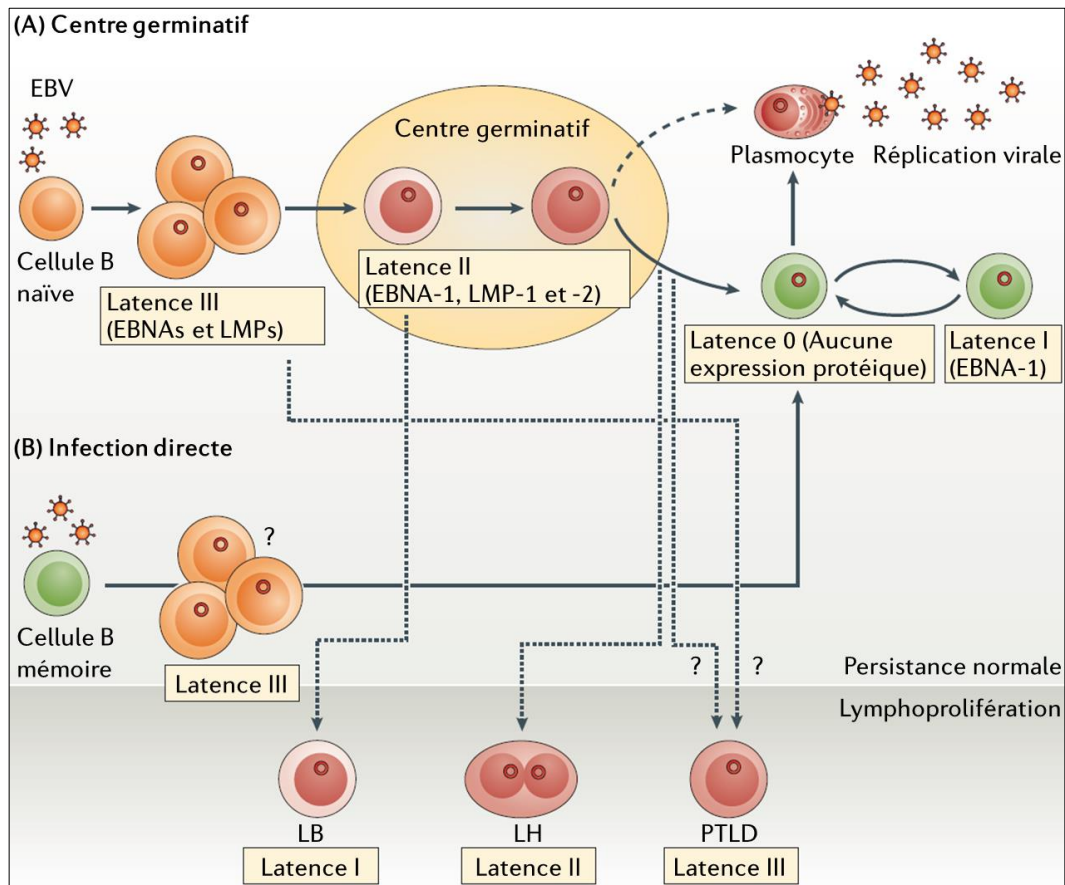


Figure 8 | **Persistence virale dans les lymphocytes B et origine des lymphoproliférations**

L'EBV atteint les lymphocytes B mémoires dans lesquels il persiste, selon deux modèles. **(A)** L'infection des lymphocytes B naïfs conduit à une L-III, permettant l'expansion et la prolifération des cellules infectées. Les cellules atteignent ensuite le centre germinatif où elles expriment le répertoire de gènes caractéristique d'une L-II. Les cellules quittent le centre germinatif pour rejoindre le pool de lymphocytes B mémoires. À cette étape l'expression de protéines virales est entièrement réprimée (L-0). La prolifération des lymphocytes B mémoires infectés nécessite l'expression d'EBNA-1 (L-I) pour permettre la ségrégation de l'épisome. La différenciation des lymphocytes B en plasmocytes induit la réactivation de l'EBV. **(B)** L'infection des lymphocytes B peut également se faire de manière directe, en faisant intervenir un probable passage en L-III. La latence virale est à l'origine de lymphoproliférations, présentées sur le panel inférieur. La figure présente l'origine présumée des cellules responsables des différentes lymphoproliférations associées à l'EBV, elles-mêmes issues de différents programmes de latence virale. Adaptée de (Young *et al.*, 2016).

LB, Lymphome de Burkitt ; LH, Lymphome de Hodgkin; PTLN, *Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder*.

Le timing d'expression des gènes de latence conduisant à l'entrée en L-III est donné en Figure 9. L'expression de l'ensemble des gènes de latence permet l'expansion clonale tout en protégeant les cellules de la mort cellulaire programmée. Elles gagnent par la suite le centre germinatif des lymphocytes B, où l'expression des protéines de latence se restreint pour prendre la forme d'une L-II (Babcock *et al.*, 2000). Cette forme de latence assure la survie des cellules infectées ainsi que leur différenciation en lymphocytes B mémoires où cette fois, il n'y aura plus d'expression de protéines virales, ce qui est caractéristique de la L-0 (Babcock *et al.*, 1998). Il s'agit du réservoir de l'EBV qui permettra sa persistance à vie. Lors de la multiplication de ces lymphocytes B mémoires, la réplication



de l'épisme requiert l'expression d'EBNA-1, ce qui nécessitera un passage transitoire en L-I (Hochberg *et al.*, 2004). À travers ce processus de régulation, le virus restreint au maximum l'expression de ces protéines de latence afin de ne pas être détecté par le système immunitaire et ainsi assurer son maintien. Il est également important de noter que ces programmes de latence sont impliqués de manières différentes dans la pathogenèse du virus (Figure 8).

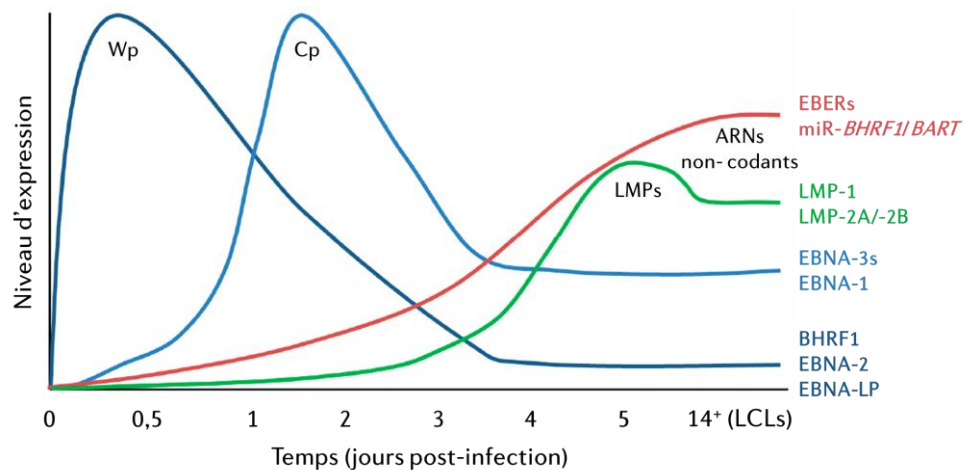


Figure 9 | **Expression des gènes de latence lors de la primo-infection des lymphocytes B naïfs**

Schéma montrant le timing d'expression des gènes de latence lors de l'infection des lymphocytes B naïfs, conduisant à l'établissement d'une L-III. Rapidement après l'infection (huit à douze heures), le promoteur Wp est particulièrement actif et permet principalement l'expression des protéines BHRF1, EBNA-2 et EBNA-LP. Les EBNAs néo-synthétisés transactivent le promoteur Cp permettant l'expression du reste des EBNAs et l'activation des promoteurs gouvernant l'expression des LMPs. Le pic d'expression des protéines issues du Cp est atteint 2 jours post-infection, tandis que le pic d'expression des LMPs est atteint plus tardivement (4-5 jours post-infection). L'expression des ARN non-codants est retardée par rapport aux protéines de latence, avec une détection importante à partir de 5 jours post-infection. Dans les LCLs (Lignées Cellulaires Lymphoblastoïdes) établis, l'EBV est présent sous forme de L-III. Adaptée de (Fitzsimmons & Kelly, 2017).

## I. 2. D. (c) Fonctions des protéines et ARN de la latence

### EBNA-1

À l'exception de la L-0, la protéine EBNA-1 est exprimée dans tous les types de latence (Figure 7.B), car elle est essentielle au maintien de l'épisme viral (Yates *et al.*, 1985). En effet, EBNA-1 possède un domaine de liaison à l'ADN lui permettant de se lier sous forme dimérique à l'épisme, au niveau de la région *oriP*. Elle peut également se lier aux chromosomes de l'hôte. Cette liaison permet d'assurer la réplication de l'épisme viral et sa distribution aux cellules filles lors de la division (Deschamps *et al.*, 2017). EBNA-1 joue également un rôle dans la prolifération et la survie des cellules. En effet, en modèle de souris transgénique, sa seule expression est capable d'induire des lymphomes (Wilson *et al.*, 1996). De plus, cette protéine serait essentielle dans la survie des LB, car elle inhibe l'apoptose en induisant l'expression de p53 (Kennedy *et al.*, 2003) et de la survivine, une protéine anti-apoptotique (Lu *et al.*, 2011).

### EBNA-2

Cette protéine fut découverte lors de l'étude d'une souche de l'EBV, qui avait perdu sa capacité à transformer les lymphocytes B *in vitro* (Rabson *et al.*, 1982). Il s'agit de la souche P3HR-1, qui est dépourvue d'EBNA-2 (Figure 2), montrant le rôle prépondérant de cette protéine, *in vitro*, dans la lymphomagenèse (Mannick *et al.*, 1991). Bien qu'EBNA-2 ne possède aucun motif de fixation à l'ADN, elle agit de concert avec EBNA-LP pour se lier à des facteurs cellulaires leur permettant de transactiver l'expression de protéines cellulaires (CD23, CD21, c-MYC) et virales (LMPs) (Longnecker *et al.*, 2013). Notamment, EBNA-2 se lie à un facteur de liaison à l'ADN, RBP-J (*Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin  $\kappa$  J region*), qui est impliqué dans la voie de signalisation dépendante de Notch1 (Sakai *et al.*, 1998). Cette voie est importante pour la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire. Via son interaction avec RBP-J, EBNA-2 est un homologue constitutivement actif du récepteur Notch1 (Sakai *et al.*, 1998), augmentant la prolifération et la survie cellulaire, ce qui explique son implication dans le développement de lymphomes.

Une étude a récemment démontré que l'infection par la souche P3HR-1, en dépit de son incapacité à induire des lymphomes *in vitro*, est en mesure d'induire des lymphomes *in vivo* chez un modèle murin humanisé (Li *et al.*, 2020a). Cette étude confirme qu'il existe des mécanismes de développement de lymphomes indépendants d'EBNA-2.

### EBNA-3A -3B et -3C

La famille des EBNA-3 possède des propriétés oncogéniques qui diffèrent d'un membre à l'autre. En effet, EBNA-3A et -3C sont importantes pour la transformation des lymphocytes B *in vitro* (Tomkinson *et al.*, 1993). En revanche, il est montré que la délétion du gène *EBNA-3B* n'altère pas la capacité de transformation *in vitro* des lymphocytes B (Chen *et al.*, 2005). EBNA-3B agit même comme suppresseur de tumeur (Allday *et al.*, 2015; White *et al.*, 2012). Concernant le rôle d'EBNA-3C dans la tumorigenèse associée à l'EBV, il est connu que cette protéine interagit avec l'oncogène c-MYC, afin de le stabiliser et d'augmenter l'expression de ses gènes cibles (Bajaj *et al.*, 2008). Une récente étude s'est attachée à explorer l'implication de l'autophagie dans les propriétés oncogéniques d'EBNA-3C (Bhattacharjee *et al.*, 2018). Les auteurs ont démontré qu'EBNA-3C accélère la transcription de gènes autophagiques, conduisant à une augmentation du flux autophagique. Cet effet sur l'autophagie est essentiel pour la survie des cellules infectées de manière latente, notamment en permettant la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (Bhattacharjee *et al.*, 2018).

### EBNA-LP

Le rôle principal d'EBNA-LP est d'agir de concert avec EBNA-2, afin de potentialiser leurs activités transcriptionnelles pléiotropes. Notamment, la co-activation entre EBNA-2 et EBNA-LP permet

d'augmenter la transcription des gènes codants LMP-1 (Nitsche *et al.*, 1997) et LMP-2A (Peng *et al.*, 2005). À elle seule, EBNA-LP n'est pas indispensable à l'établissement de LCLs (Lignées Cellulaires Lymphoblastoïdes), mais elle en augmente l'efficacité de formation (Szymula *et al.*, 2018).

### LMP-1

La protéine LMP-1 apparaît comme l'oncogène majeur de l'EBV pour la transformation des lymphocytes B, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Wang *et al.*, 2017). LMP-1 fournit un signal de type CD40 aux cellules infectées, pouvant même s'y substituer de façon constitutivement active (Gires *et al.*, 1997). LMP-1 active diverses voies de signalisation impliquées dans des processus de prolifération et pro-survie (Wang *et al.*, 2017). En effet, LMP-1 active constitutivement la voie NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor- $\kappa$ B*), la voie des MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), celles des PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) ou encore la voie des IRFs (*Interferon Regulatory Factors*) (Wang *et al.*, 2017). De plus, il a récemment été rapporté que l'induction de l'autophagie par LMP-1 améliorerait la viabilité des cellules issues de lymphomes de Hodgkin (LH) (Lin *et al.*, 2021).

### LMP-2A et -2B

Les protéines LMP-2A et -2B sont codées par le même gène, mais leur transcription est initiée par deux promoteurs distincts. Il était initialement connu que LMP-2A pouvait se fixer au BCR (*B-Cell Receptor*) afin de bloquer la signalisation qui en dépend (Caldwell *et al.*, 1998). Plus récemment il fut proposé que LMP-2A pourrait mimer et réguler les fonctions dépendantes du BCR afin de favoriser la prolifération et la survie des cellules infectées par l'EBV (Fish *et al.*, 2020). En effet, LMP-2A impacte l'apoptose et la progression du cycle cellulaire en modulant l'expression du régulateur apoptotique BCL-X<sub>L</sub> et du suppresseur de tumeur RB1 (*RetinoBlastoma-associated protein 1*) (Fish *et al.*, 2020). De plus, l'expression de LMP-2A au cours du développement des lymphocytes B permet leur sortie du centre germinatif, même en absence de BCR, et ainsi de persister dans le sang périphérique sans être éliminés par apoptose (Anderson & Longnecker, 2008). LMP-2A jouerait également un rôle dans l'évasion à l'immunité cellulaire. Elle induit en effet l'expression de molécules inhibant l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, prévenant ainsi la reconnaissance et l'élimination des cellules infectées (Rancan *et al.*, 2015). La fonction de LMP-2B n'est en revanche pas connue.

### BARF1

Il s'agit d'une protéine s'exprimant au cours de la latence et du cycle productif (Zhang *et al.*, 1988). Son expression lors du cycle productif est principalement retrouvée dans les lymphocytes B où BARF1 appartient aux répertoires des protéines précoces. Il s'agit d'une protéine sécrétée par les cellules infectées et capable de se fixer au CSF-1 (*Colony-Stimulating Factor 1*). Via cette interaction BARF1 favorise l'échappement au système immunitaire en inhibant la sécrétion d'interféron-alpha (IFN- $\alpha$ ) par

les monocytes (Cohen & Lekstrom, 1999). Au cours de la latence virale, elle est spécifiquement exprimée au cours des cancers épithéliaux. En effet, les transcrits *BARF1* sont abondamment retrouvés dans les tissus dérivés de carcinome du nasopharynx (CNP) et de carcinome gastrique (CG) (Seto *et al.*, 2005). *BARF1* possède effectivement des propriétés immunomodulatrices et oncogéniques, ouvrant des perspectives thérapeutiques ciblant cette protéine (Lo *et al.*, 2020).

### BHRF1

Une section complète du manuscrit, ci-après, est dédiée à cette protéine (§ III).

### Les ARN non-codants

L'EBV fut le premier virus humain pour lequel on a découvert des miRs (Pfeffer *et al.*, 2004). Il s'agit de petits ARN non-codants qui sont impliqués dans la modulation de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel. À ce jour, on dénombre quarante-quatre miRs codés par l'EBV (Dong *et al.*, 2019):

- quatre exprimés à partir de la région génomique *BHRF1* ;
- quarante exprimés à partir de la région génomique *BART* (*BamHI fragment A Rightward Transcript*).

Leurs fonctions sont multiples, allant du maintien de la latence, à l'échappement à l'immunité cellulaire, en passant par le développement et la progression des tumeurs associées à l'EBV (Figure 10). Notamment, retenons que certains miRs-*BART* favorisent le maintien de la latence virale en ciblant et diminuant l'expression de transcrits du cycle productif (Marquitz & Raab-Traub, 2012). Par exemple, miR-*BART2* inhibe l'expression de la polymérase virale BALF5 (Pfeffer *et al.*, 2004). L'implication des miRs-*BART* dans le développement de tumeurs peut s'expliquer par le fait qu'ils favorisent la survie cellulaire via un effet anti-apoptotique (Kang *et al.*, 2015), mais également en ciblant des suppresseurs de tumeurs (Hsu *et al.*, 2014; Lei *et al.*, 2013). Enfin, les miRs-*BHRF1* sont eux aussi impliqués dans des processus de transformation cellulaire en inhibant l'apoptose et en favorisant la prolifération des lymphocytes B infectés (Feederle *et al.*, 2011; Seto *et al.*, 2010).

L'EBV code également pour deux autres ARN non-codants, les *EBERs-1* et *-2*, qui sont les transcrits viraux les plus abondants au cours de la latence (Rymo, 1979). Leur structure secondaire forme des boucles, donnant aux *EBERs* une allure d'ARN double brin (Glickman *et al.*, 1988). Grâce à cette structure particulière ils peuvent être reconnu par RIG-I (*Retinoic acid-Inducible Gene I*), un senseur de l'immunité innée (Samanta *et al.*, 2006). Par la suite, il a été démontré que cette stimulation de l'immunité innée par les *EBERs* contribuait à l'oncogenèse chez des patients présentant un LB ou un CNP (Takada, 2012).

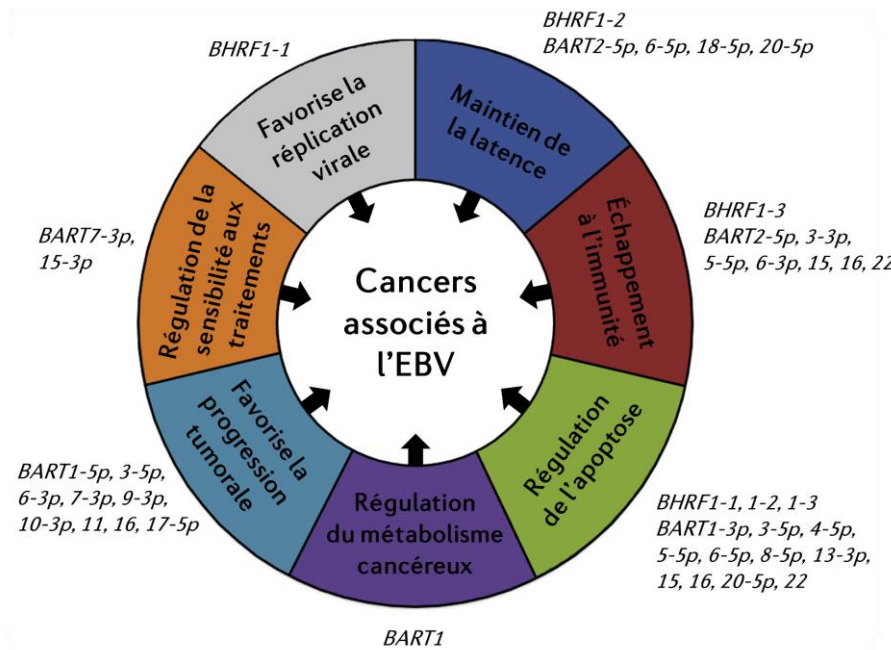


Figure 10 | **Fonctions des miRs dans la tumorigenèse associée à l'EBV**

Les miRs de l'EBV participent au développement et à la progression des tumeurs en ciblant à la fois des processus cellulaires et viraux. Adaptée de (Dong *et al.*, 2019).

#### I. 2. D. (d) La réactivation de l'EBV

La réactivation correspond à la transition de l'EBV d'un état latent vers un cycle productif. Ce processus est induit par divers stimuli, *in vivo* ou *ex vivo*, qui induisent l'expression des transactivateurs ZEBRA et RTA, et par extension des autres gènes du cycle productif.

La régulation de la réactivation de l'EBV dans les lymphocytes B a été plus étudiée sur des modèles *in vitro* qu'*in vivo*. Néanmoins, chez l'être humain, la réactivation est probablement déclenchée par la stimulation du BCR (Davies *et al.*, 2010) et par la différenciation en plasmocytes des lymphocytes B mémoires infectés (Figure 8) (Al Tabaa *et al.*, 2009; Laichalk & Thorley-Lawson, 2005). En effet, l'activation du BCR enclenche une cascade de signalisation, aboutissant à l'initiation de la transcription du gène *BZLF1*. Ainsi, *in vitro*, il est possible d'induire la réactivation de l'EBV en utilisant des anticorps dirigés contre les IgG (Immunoglobuline G) humaines qui stimuleront le BCR (Daibata *et al.*, 1990). Dans les plasmocytes nouvellement différenciés, l'induction du cycle productif est due au facteur de différenciation XBP-1s (*X-box Binding Protein-1s*), qui active l'expression de ZEBRA (Sun & Thorley-Lawson, 2007). Le traitement par du TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor-Beta*) est aussi utilisé puisqu'il permet d'induire la transcription de *BZLF1* via la voie des MAPK (Fahmi *et al.*, 2000). Des modulateurs chimiques peuvent également être utilisés tels que le TPA/PMA (12-*O*-TétradécanoylPhorbol-13-Acétate / Phorbol-12-Myristate-13-Acétate). Cette association de drogues augmente l'acétylation des histones, rendant certains promoteurs viraux (*BZLF1* et *BRLF1*) davantage accessibles aux facteurs de

transcription (Baumann *et al.*, 1998). Dans la même idée, l'utilisation d'inhibiteurs d'HDAC (Histone DéACétylase), tels que l'acide butyrique, permet de réactiver l'EBV (Ghosh *et al.*, 2012). Au vu du caractère essentiel de ZEBRA et RTA lors de la réactivation, la seule surexpression d'une de ces protéines dans des cellules EBV<sup>+</sup> induit la reprise d'un cycle productif (Wille *et al.*, 2013).

Chez l'hôte immunocompétent, la persistance à vie de l'EBV est possible grâce à l'expression minimale d'éléments viraux, limitant sa détection par le système immunitaire. Ainsi, la réactivation est une option « dangereuse » pour le virus, dans la mesure où une reprise de sa réplication peut induire différents mécanismes cellulaires pouvant conduire à son élimination. En conséquence, l'EBV dispose de plusieurs protéines, dont les fonctions exactes sur l'immunité innée seront détaillées dans la suite du manuscrit (§ IV. 3. C), apportant au virus le moyen d'induire sa réactivation tout en contrôlant les systèmes de défense de l'hôte.

## I. 3 Physiopathologie des infections par l'EBV

### I. 3. A Données épidémiologiques

Selon les estimations, la séropositivité vis-à-vis de l'EBV se situe entre 90 et 95 % de la population adulte (Kieff *et al.*, 2007). La séroconversion intervient généralement au cours de la petite enfance, passant inaperçue. Parmi les populations où les contacts sociaux sont plus tardifs, la primo-infection à l'EBV est souvent retardée à l'adolescence, provoquant une MNI dans un tiers des cas.

Actuellement, deux sous-types de l'EBV (EBV-1 et EBV-2) sont décrits. Ils diffèrent au niveau de la séquence de certains gènes de latence (*EBNA-2*, *-3A*, *-3B*, *-3C* et *LP*). Des études séro-épidémiologiques suggèrent que dans les pays occidentaux la quasi-totalité de la population est infectée par le sous-type EBV-1. Le sous-type EBV-2 est restreint à l'Afrique, particulièrement dans les zones où le LB est endémique, avec 20 % de la population saine qui est porteuse de ce variant. Bien que le sous-type EBV-1 bénéficierait d'un pouvoir transformant plus important que le sous-type EBV-2 (Rickinson *et al.*, 1987), les deux variants sont associés aux mêmes pathologies (Palser *et al.*, 2015).

### I. 3. B Les pathologies au cours de la primo-infection

#### I. 3. B. (a) La mononucléose infectieuse

L'atteinte la plus communément associée aux infections par l'EBV est la MNI. Cette pathologie, aussi appelée « maladie du baiser », se caractérise par des symptômes généralement bénins tels qu'une poussée de fièvre, associée à une pharyngite et une lymphadénopathie. Les symptômes sont généralement transitoires, mais l'asthénie peut persister plusieurs semaines après la phase aigüe de

la maladie, notamment chez les adultes. Ces symptômes sont la conséquence d'une activation majeure de la réponse des lymphocytes T cytotoxiques contre l'EBV. La MNI est plus fréquente chez les adolescents lors de la primo-infection, du fait de son mode de transmission par la salive. En revanche, lorsque la séroconversion à l'EBV intervient au cours de l'enfance, il ne s'agira que rarement d'une infection symptomatique.

### I. 3. B. (b) La leucoplasie chevelue de la langue

La leucoplasie orale chevelue a été décrite pour la première fois en 1984. Il s'agit d'une maladie non-tumorale des muqueuses, qui se manifeste sous forme de plaques blanchâtres sur la surface latérale de la langue. Cette pathologie est corrélée à la réactivation du cycle productif de l'EBV et survient quasi exclusivement chez les personnes fortement immunodéprimées, que ce soit consécutivement à une greffe ou à une infection par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) non traitée (Khammissa *et al.*, 2016). Elle a quasiment disparue chez les personnes infectées par le VIH, suite à l'avènement de la trithérapie antirétrovirale.

### I. 3. C Les pathologies cancéreuses au cours de la latence

La capacité de l'EBV à immortaliser les cellules humaines *in vitro* fut démontrée dès 1968. En effet, l'infection de lymphocytes B normaux par l'EBV les transforme dans 3 à 10 % des cas en LCL, appuyant ainsi les propriétés oncogéniques de ce virus (Pope *et al.*, 1968). *In vitro*, les LCLs expriment tous les gènes de latence (L-III) permettant leur prolifération. *In vivo*, de telles cellules se différencieraient en lymphocytes B mémoires, où le virus passerait en L-0 (Babcock *et al.*, 1998). Chez l'être humain, on estime que l'EBV est chaque année associé d'environ 200 000 cancers, et il fut estimé en 2010 que 1.8% des cancers mortels étaient reliés à l'EBV (Khan & Hashim, 2014; Young *et al.*, 2016). On distingue deux catégories de cancers associés aux infections latentes à l'EBV, les lymphomes et les carcinomes, qui reflètent la diversité du tropisme viral.

#### I. 3. C. (a) Les lymphoproliférations malignes

##### Le lymphome de Burkitt (LB)

Le LB est un cancer des lymphocytes B non-Hodgkinien, décrit pour la première fois par D. Burkitt en 1958 (Burkitt, 1958). Il s'agit d'un cancer agressif nécessitant une prise en charge précoce. À ce jour, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) distingue 3 formes cliniques de LB :

- une forme endémique, qui est retrouvée en Afrique subsaharienne et en Papouasie-Nouvelle-Guinée dans les zones où le paludisme est présent (Figure 11). Cette forme de LB est associée

quasi-systématique à l'EBV (Molyneux *et al.*, 2012) et se manifeste par des tumeurs localisées à la mâchoire et parfois au niveau de la cavité abdominale ;

- une forme sporadique, qui est décrite pour le reste du monde. Cette forme de LB n'est que rarement associée à l'EBV (moins de 1 cas sur 10) et se manifeste par des tumeurs abdominales (Brady *et al.*, 2007; Kelly & Rickinson, 2007) ;
- une forme associée au SIDA (Syndrome de l'ImmunoDéfiance Acquisée), qui survient chez des patients infectés par le VIH et pour 40 % d'entre eux l'EBV y est également associé (Molyneux *et al.*, 2012).

D'un point de vue génétique, le LB est caractérisé par la translocation chromosomique du proto-oncogène *c-MYC* au locus codant les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines. Différentes translocations chromosomiques existent dans les LB et entraînent systématiquement la surexpression de *c-MYC*. Cet événement génétique est considéré comme l'élément majeur de la pathogenèse des LB (Magrath, 1990).

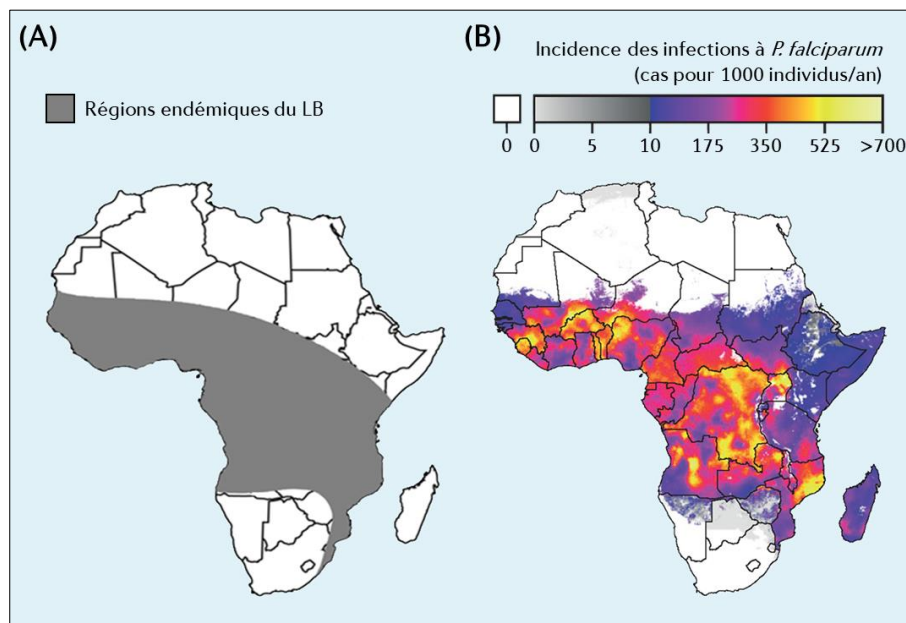


Figure 11 | **Corrélation géographique entre la répartition des LB endémiques et du paludisme**

(A) La zone délimitée en gris sur la carte de l'Afrique représente les régions où le LB est endémique d'après les études épidémiologiques de D. Burkitt. (B) Distribution géographique des infections à *Plasmodium falciparum* en 2017. On s'aperçoit que les régions où le LB et le paludisme sont endémiques se superposent parfaitement, suggérant un lien de causalité entre ces deux pathologies. Adaptée de (Sugden, 2014) et (Weiss *et al.*, 2019).

La survenue des LB endémiques est corrélée à l'infection par *Plasmodium falciparum*, l'un des agents responsables du paludisme (Sugden, 2014; Weiss *et al.*, 2019) (Figure 11). En effet, ce parasite induit une instabilité génétique (Robbiani *et al.*, 2015) qui, combinée à une réduction de la réponse T cytotoxique spécifique de l'EBV, augmente le risque de translocation chromosomique pouvant conduire au développement d'un LB. Une étude a même suggéré que le paludisme favoriserait un



dysfonctionnement immunitaire des lymphocytes T cytotoxiques, propice à la prolifération des lymphocytes B transformés par l'EBV, et/ou qu'il favoriserait la réplication virale (Moormann *et al.*, 2011). La plupart des LB associés à l'EBV présentent une L-I. Toutefois 15 % d'entre eux sont issus d'une L-Wp (Fitzsimmons & Kelly, 2017).

#### Le lymphome de Hodgkin (LH)

Les LH correspondent à une prolifération incontrôlée de lymphocytes B anormaux, appelés cellules de Reed-Sternberg. D'un point de vue clinique, ils se manifestent sous forme d'adénopathies persistantes. Le lien entre le développement d'un LH et l'infection par l'EBV est établi de longue date. L'EBV est effectivement retrouvé dans 30 % des cellules issues d'un LH classique, où il établit une L-II (Taylor *et al.*, 2015). L'association avec l'EBV est quasi systématique chez les patients VIH<sup>+</sup> faisant un LH (Taylor *et al.*, 2015).

#### Le lymphome T ou NK extraganglionnaire de type nasal

Il s'agit d'un type rare de lymphome non-Hodgkinien (LNH) dont la prévalence est beaucoup plus élevée en Asie et en Amérique Latine qu'en Europe (Wang *et al.*, 2021). Cette lymphoprolifération est dite extraganglionnaire, car elle apparaît dans des tissus autres que les ganglions lymphatiques. Les LNH sont habituellement des tumeurs affectant les lymphocytes B (85 %), or dans le cas présent ce lymphome prend naissance dans les lymphocytes T et plus souvent dans les lymphocytes NK. L'infection latente à l'EBV est rapportée dans certains cas de LNH et l'association est quasi constante dans les cas de lymphomes T/NK extraganglionnaires (Mestiri *et al.*, 2008). Ces cellules EBV<sup>+</sup> présentent un profil de L-I ou L-II (Cai *et al.*, 2015; Kanegane *et al.*, 1998). L'infection des lymphocytes T/NK par l'EBV ainsi que son rôle dans ce type de pathologie reste peu compris par manque de modèles de lymphocytes T/NK immortalisés par l'EBV.

#### Le syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (PTLD)

La prise d'immunosuppresseurs, consécutive à une greffe d'organes ou de moelle osseuse, peut entraîner des lymphoproliférations dont l'incidence est estimée à 5 %. La survenue précoce de ces PTLD (*Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder*) est associée à l'EBV dans environ 90 % des cas et fait suite à une primo-infection, acquise du donneur ou non (Allen *et al.*, 2002). Par conséquent, le risque de développer un PTLD est accru si le donneur est séropositif vis-à-vis de l'EBV et le receveur séronégatif. Ceci est confirmé par les chiffres sur l'incidence de survenue des PTLD qui est plus importante chez les enfants, plus souvent séronégatifs vis-à-vis de l'EBV au moment de la greffe, que chez les adultes (Hall *et al.*, 2013). Chez des patients greffés EBV<sup>+</sup>, l'apparition d'un PTLD est aussi possible à la suite de la réactivation du virus. Les PTLD sont causés par l'immunodépression qui entraîne une diminution de la surveillance immunitaire par les lymphocytes T cytotoxiques, avec pour

conséquence une augmentation de l'expression des gènes de latence chez les lymphocytes B EBV<sup>+</sup> et une prolifération de ces cellules. L'ensemble des gènes de latence de l'EBV sont exprimés au cours des PTLD, c'est-à-dire un profil de L-III (Fitzsimmons & Kelly, 2017).

### I. 3. C. (b) Les proliférations épithéliales malignes

En raison de son tropisme épithélial, les infections par l'EBV sont également associées au développement de carcinomes tels que les CNP ou les CG. Leur mise en place reste peu élucidée, mais la littérature s'accorde sur le fait qu'ils résulteraient de l'établissement d'une latence aberrante dans des cellules épithéliales ayant subi des modifications génétiques précancéreuses (Young & Dawson, 2014).

#### Le carcinome du nasopharynx (CNP)

Il s'agit d'une tumeur maligne de l'épithélium nasopharyngé systématiquement associée à l'EBV (Tsao *et al.*, 2017). La carcinogenèse est un processus multifactoriel qui impliquerait l'EBV, des facteurs environnementaux ainsi qu'une composante génétique.

La prévalence des CNP est inégale selon les régions et le sexe. En effet, ces cancers sont rarement trouvés dans les pays occidentaux, tandis qu'ils touchent essentiellement les populations d'Afrique et d'Asie, et plus souvent les hommes (ratio homme/femme de 3 pour 1) (Torre *et al.*, 2015). Durant de nombreuses années, on pensait que cette disparité géographique s'expliquait en grande partie par le régime alimentaire de ces populations. Mais une récente étude suggère que l'influence alimentaire serait minime comparée à l'influence génétique (Chang *et al.*, 2021). En effet, la primo-infection des cellules épithéliales du nasopharynx n'induit pas directement la transformation cellulaire. L'entrée en latence de l'EBV dans ces cellules est nécessaire, et la transformation serait due à la combinaison de d'altérations génétiques et de l'inflammation de la muqueuse du nasopharynx. Les cellules de CNP EBV<sup>+</sup> expriment les protéines virales LMP-1 et EBNA-1, caractéristiques d'une L-II (Rowe *et al.*, 2009; Tsao *et al.*, 2015).

Un dernier paramètre gouvernant l'apparition des CNP a pu être identifié. En effet, les régions endémiques du CNP correspondent aux régions où la séroconversion a lieu tôt, suggérant qu'une infection précoce à l'EBV favorise le développement du CNP. Une étude appuie cette hypothèse en montrant que les patients ayant développé une MNI avaient 60 % de risque en moins de développer un CNP (Levine *et al.*, 1998).

#### Le carcinome gastrique (CG)

Les CG constituent la troisième cause de mortalité par cancer dans le monde (Tavakoli *et al.*, 2020) avec près de 800 000 décès dénombrés en 2018 (Bray *et al.*, 2018). L'EBV fut détecté pour la première

fois dans des prélèvements d'adénocarcinomes gastriques atypiques en 1992. Depuis, il est associé dans environ 9 % des cas de CG (Tavakoli *et al.*, 2020). Il est à noter que l'oncogène BARP1 s'exprime dans tous les CG à EBV (Seto *et al.*, 2005). Ces carcinomes présentent des similitudes morphologiques avec les CNP. De plus, la majorité des cas de CG EBV<sup>+</sup> présentent le même type de latence que les CNP, même si une L-I peut également être associée aux CG.

## II L'autophagie et l'apoptose

L'autophagie et l'apoptose sont deux mécanismes cellulaires conservés impliqués dans des processus de dégradation, respectivement d'éléments cytoplasmiques et d'une cellule entière. La différence majeure entre l'autophagie et l'apoptose tient au fait que l'apoptose est exclusivement un processus de mort cellulaire tandis que l'autophagie est, la plupart du temps, un mécanisme cytoprotecteur. De plus, l'autophagie et l'apoptose « communiquent » entre elles afin de déterminer le devenir de la cellule. Dans le cadre d'une infection par l'EBV, les régulations de l'autophagie et de l'apoptose par le virus pourraient même expliquer le pouvoir oncogène associé à celui-ci. Nous verrons dans cette section le principe général de ces deux processus cellulaires et comment ils s'imbriquent afin de réguler le devenir cellulaire.

### II. 1 L'autophagie : dégrader pour mieux survivre

L'étymologie du terme « autophagie » signifie en grec ancien « s'auto-manger » et fait référence au processus catabolique par lequel la cellule induit la dégradation de ses propres constituants cytosoliques par le biais des lysosomes (De Duve & Wattiaux, 1966; Deter *et al.*, 1967). L'autophagie permet en effet à la cellule d'éliminer des organites endommagés ou surnuméraires, des agrégats protéiques, des protéines à longue durée de vie ou encore des agents pathogènes. Les produits résultant de la dégradation autophagique seront ensuite recyclés par la cellule afin de servir de nouveaux métabolites. Ainsi, en condition physiologique, l'autophagie influence directement la survie en maintenant l'homéostasie cellulaire.

La découverte de l'autophagie fut récompensée en 2016 par le prix Nobel de médecine, pour son potentiel intérêt dans la compréhension des pathologies liées au vieillissement (Levine & Klionsky, 2017). Plus précisément, ce prix fut décerné à Yoshimori Ohsumi pour ses travaux visant à identifier et à caractériser la machinerie autophagique, en particulier les gènes impliqués appelés *ATG* (*AuTophagy-related genes*) chez la levure (Tsukada & Ohsumi, 1993). Par la suite fut montrée la conservation des gènes *ATG* chez les mammifères, mais aussi chez les plantes (Nakatogawa, 2020).

#### II. 1. A Généralités sur l'autophagie

L'induction de l'autophagie est sous la dépendance de l'environnement et des stress que rencontre la cellule. En effet, la carence nutritive, l'hypoxie ou encore la présence d'agents pathogènes sont des signaux conduisant à la stimulation de l'autophagie. Chez les mammifères, trois formes d'autophagie existent, conduisant pour chacune à la dégradation de constituants cellulaires. On distingue :

- la macro-autophagie (Figure 12.A), qui est le processus le mieux décrit et certainement le plus utilisé par la cellule (Boya *et al.*, 2013). Il se caractérise par la séquestration d'éléments cellulaires dans des vésicules à double membrane, appelées autophagosomes. Les autophagosomes fusionnent ensuite avec les lysosomes dans le but d'induire la dégradation de leur contenu via l'activité des hydrolases lysosomales. Les métabolites issus de la dégradation seront ensuite transportés dans le cytoplasme afin d'être recyclés ;
- la micro-autophagie (Figure 12.B), qui correspond à l'internalisation directe d'une portion cytoplasmique par invagination ou protrusion de la membrane lysosomale ou endosomale (Oku & Sakai, 2018). Certains organites ou protéines peuvent également être adressés aux endosomes tardifs pour être dégradés par une voie nommée la micro-autophagie endosomale (Sahu *et al.*, 2011). La micro-autophagie permet l'élimination de cargos par des mécanismes sélectifs ou non ;
- l'autophagie médiée par les protéines chaperons (CMA pour *Chaperone-Mediated Autophagy*) (Figure 12.C). Au cours de cette forme d'autophagie, tout peptide disposant d'un motif KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) est reconnu par la protéine chaperon HSC70 (Dice, 1990). Cette dernière s'associe avec la protéine lysosomale LAMP-2A, dont l'oligomérisation entraîne la relocalisation des protéines fixées à HSC70 vers la lumière du lysosome (Kaushik & Cuervo, 2018).

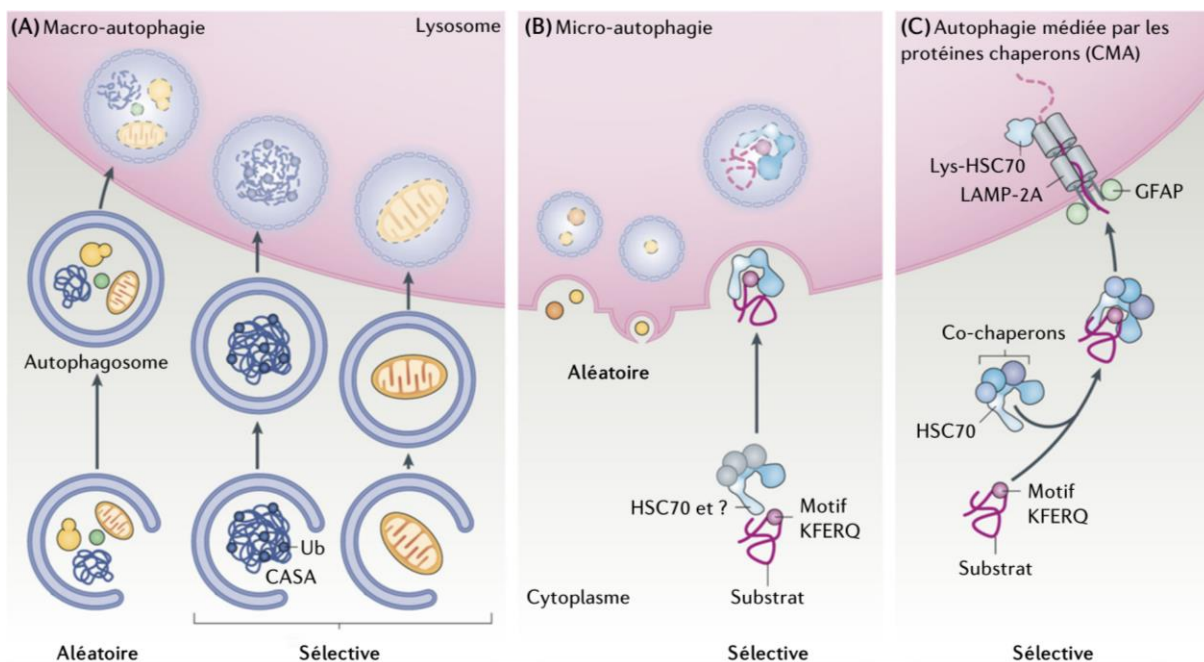


Figure 12 | Les différentes formes d'autophagie chez les mammifères

On distingue trois types d'autophagie : (A) la macro-autophagie, (B) la micro-autophagie et (C) l'autophagie médiée par les protéines chaperons. Adaptée de (Kaushik & Cuervo, 2018).

CASA, Chaperone-Assisted Selective Autophagy ; GFAP, Glial Fibrillary Acidic Protein ; Ub, Ubiquitine.

La macro- et micro-autophagie sont des mécanismes conservés de la levure à l'être humain tandis que la CMA a seulement été caractérisée chez les vertébrés (mammifères, oiseaux, poissons ...) du fait que l'effecteur LAMP-2A est absent chez la levure et les champignons (Lescat *et al.*, 2020; Tekirdag & Cuervo, 2018). Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons uniquement à la macro-autophagie chez les mammifères qui sera désignée sous le terme d'autophagie.

## II. 1. B Déroulement de l'autophagie

L'autophagie est un processus dynamique, dont le déroulé peut être découpé en six étapes (Figure 13). Chacune des étapes sera détaillée ci-après, et parmi elles on distingue :

- l'initiation, qui induit le recrutement des complexes initiateurs du processus ;
- la nucléation, qui permet la mise en place d'une membrane d'isolation appelée phagophore ;
- l'élongation, qui assure au phagophore sa capacité de s'allonger pour englober une portion de cytoplasme ;
- la fermeture du phagophore, qui engendre la formation d'un autophagosome ;
- la maturation, qui correspond à l'étape de fusion entre l'autophagosome et le lysosome ;
- puis la dégradation, qui est médiée par l'activité des hydrolases, apportées par les lysosomes.

L'ensemble du processus autophagique allant de la génération de l'autophagosome à la fusion/dégradation au sein des autolysosomes représente le flux autophagique (Mizushima *et al.*, 2010).

### ① Initiation

L'étape initiale consiste en la formation d'une membrane, appelée d'isolation ou phagophore. Ce dernier est issu de membranes cellulaires diverses (Lamb *et al.*, 2013) et se forme au sein d'une structure dérivée du RE, dénommée l'omégasome (Roberts & Ktistakis, 2013).

L'initiation de la formation du phagophore résulte d'une cascade de signalisation finement régulée. En effet, la biogenèse du phagophore est assurée par le complexe ULK1/2 (*Unc-51-Like autophagy activating Kinase 1/2*) qui se compose des protéines ULK1/2, ATG13, ATG101 et FIP200 (*FAK family kinase-Interacting Protein of 200kDa*) (Figure 13). Ce complexe est lui-même régulé négativement par la protéine mTOR (*mammalian Target Of Rapamycine*) au sein du complexe mTORC1 (Ganley *et al.*, 2009; Rabanal-Ruiz *et al.*, 2017). Il s'agit d'une sérine/thréonine kinase capable d'intégrer divers signaux, en particulier la teneur en acide aminés dans la cellule. En condition basale, mTOR interagit avec le complexe ULK1/2 pour y phosphoryler ULK1 et ATG13, ayant pour conséquence d'inactiver l'activité du complexe. En revanche lors d'un stress inducteur de l'autophagie, tel qu'une carence nutritive, mTOR est inactif et n'est plus en mesure d'interagir avec le complexe ULK1/2. L'inhibition sur

la kinase ULK1 est levée, ce qui lui permet de s'autophosphoryler ainsi que de phosphoryler ATG13 et FIP200, permettant d'activer le complexe et d'induire son transport vers le RE (Mizushima *et al.*, 2011) (Figure 13).

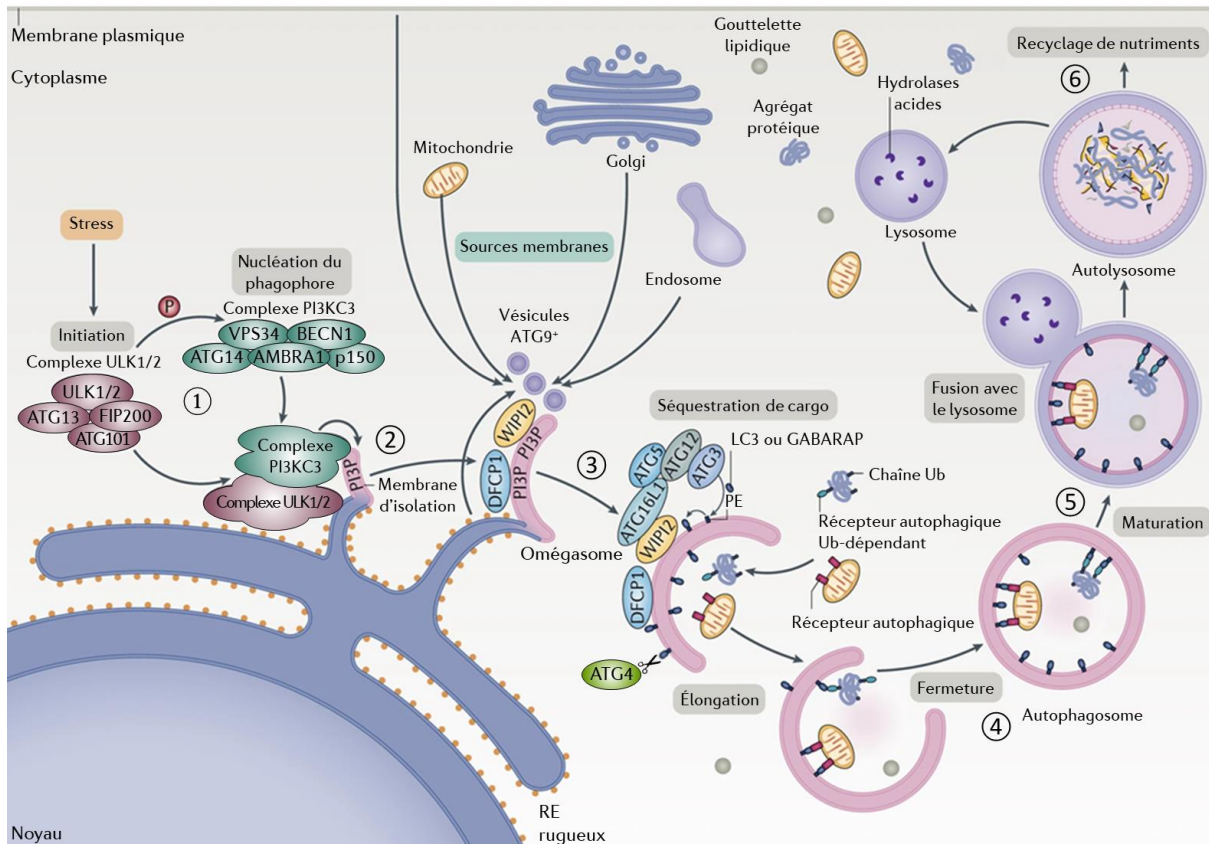


Figure 13 | **Vue d'ensemble du processus autophagique**

Les signaux conduisant à l'activation de l'autophagie correspondent à des stress d'origines variées qui vont activer le complexe ULK1/2. ① En condition de stress, mTOR n'interagit plus avec le complexe ULK1/2 ce qui permet son activation et son recrutement au niveau du RE. ② Le complexe ULK1/2 phosphoryle les composants du complexe PI3KC3. VPS34, ainsi activée, permet la formation de PI3P au niveau des omégasomes. Ceci permet le recrutement de WIP2 et DFCP1. Une double membrane, appelée phagophore, se forme grâce à la fusion de vésicules contenant la protéine ATG9. Ces vésicules proviennent de diverses membranes cellulaires ou de l'extrusion de membranes d'organites impliqués dans le trafic cellulaire. ③ Les systèmes de conjugaison sont recrutés au phagophore, au niveau des PI3P. Le premier système permet la formation du complexe ATG5-ATG12/ATG16L1 qui est nécessaire au second système de conjugaison assurant la lipodation de LC3. Grâce aux systèmes de conjugaison, le phagophore s'allonge via l'apport de lipides. ④ La fermeture du phagophore se produit via un phénomène de fission entre ses extrémités afin de former l'autophagosome. À cette étape une portion de cytoplasme est englobée de manière aléatoire, ou bien l'intervention de récepteurs autophagiques assure une séquestration sélective de constituants intracellulaires. ⑤ Après maturation de l'autophagosome a lieu sa fusion avec les lysosomes. ⑥ Le contenu acide des lysosomes active les hydrolases qui dégradent le contenu intra-vésiculaire, ainsi que la membrane interne de l'autophagosome pour former un autolysosome. Par un mécanisme d'efflux, les métabolites issus de la dégradation se retrouveront dans le cytoplasme où ils seront recyclés. Adaptée de (Dikic & Elazar, 2018).

## ② Nucléation

À cette étape, un second complexe est essentiel à la nucléation du phagophore. Il s'agit du complexe PI3KC3 (PI3K de classe III) qui se compose des protéines BECN1, VPS34 (*Vacuolar Protein Sorting 34*),



ATG14L, p150 et AMBRA1 (*Activating Molecule in BECN1-Regulated Autophagy protein 1*) (Figure 13). Certaines de ces protéines (BECN1, ATG14L et VPS34) sont phosphorylées par le complexe ULK1/2, permettant notamment à ATG14L de rapprocher le complexe au niveau du RE via son interaction avec STX17 (*SynTaXine 17*), une protéine SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*) présente à la surface du RE (Hamasaki *et al.*, 2013). L'omégasome, une protrusion du RE à l'origine du phagophore, se forme. Cet omégasome est une zone enrichie en lipides membranaires PI3P (Phosphatidylinositol-3-Phosphate), qui sont synthétisés par la kinase VPS34 à partir de PI (Phosphatidylinositol). Les PI3P, ancrés au niveau de la membrane d'isolation, permettront le recrutement de nombreuses protéines nécessaires à la suite du processus autophagique, comme la protéine DFCP1 (*Double FYVE-Containing Protein 1*) (Figure 13).

### ③ Élongation

Une fois les divers complexes protéiques recrutés au niveau des omégasomes, le phagophore prend forme et peut s'allonger. Son élongation est sous la dépendance de deux systèmes de conjugaison (Figure 14), possédant un mode de fonctionnement qui s'apparente à l'ubiquitinylation des protéines. En effet, ils impliquent trois éléments : une enzyme E1 qui est activatrice, une enzyme E2 qui catalyse la conjugaison et une enzyme E3 qui reconnaît la cible et assure la ligation (Beau *et al.*, 2008; Parzych & Klionsky, 2014).

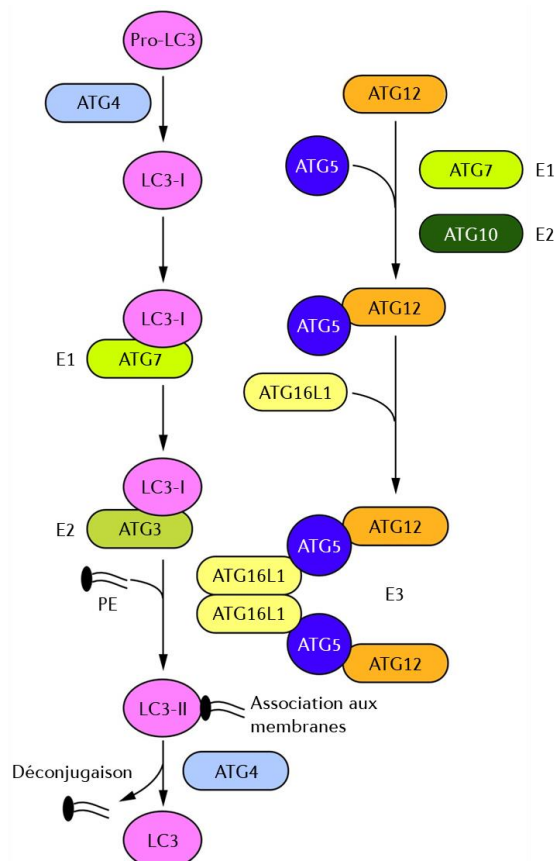


Figure 14 | **Systèmes de conjugaison permettant l'élongation du phagophore**

Lors de l'étape d'élongation du phagophore (Figure 13-③), deux systèmes de conjugaison *ubiquitin-like* interviennent. Ceux-ci requièrent l'enzyme activatrice ATG7 (E1-like) pour leur mise en place.

Le premier système (à droite) permet la conjugaison d'ATG5 à ATG12 via l'activité catalytique d'ATG10 (E2-like). Le conjugué néoformé se fixe à ATG16L1 pour donner un complexe qui, après dimérisation, s'associe avec le phagophore. Ce complexe agira en tant qu'enzyme E3-like pour la lipodation de LC3.

Le second système permet la conjugaison du PE à LC3 via l'activité d'ATG3 (E2-like). La forme lipidée de LC3 (LC3-II) s'associe aux membranes du phagophore. La déconjugaison implique la protéase ATG4. Adaptée de (Parzych & Klionsky, 2014).



Le recrutement des systèmes de conjugaison sur le phagophore est médié par les protéines DFCP1 et WIPI2 (*WD-repeat protein Interacting with PI*) (Figure 13). En effet, au niveau des PI3P se fixent des protéines possédant un motif FYVE (Phe-Tyr-Val-Glu), ce qui est le cas de WIPI2 et DFCP1 (Nakatogawa, 2020). Ainsi, WIPI2 se lie également aux PI3P et recrute le premier système de conjugaison (Melia *et al.*, 2020). WIPI2 interagit directement avec ATG16L1 permettant la formation du complexe ATG5-ATG12/ATG16L1 (Dooley *et al.*, 2014). La protéine ATG12 est activée par ATG7 (*E1 like*), puis transférée sur ATG10 (*E2 like*) qui catalyse la conjugaison entre ATG5 et ATG12 (Figure 14.A). Il s'en suit l'interaction de la protéine ATG16L1 avec le couple ATG5-ATG12, ce qui forme le premier complexe (Mizushima *et al.*, 1998). Ce dernier permet notamment la courbure du phagophore, lors de son élongation, ainsi que le recrutement du second système de conjugaison (Parzych & Klionsky, 2014).

Le deuxième système de conjugaison assure la lipidation des protéines de la famille ATG8/LC3 (*microtubule-associated protein Light Chain 3*). Chez les mammifères, ce groupe de protéines est séparé en deux sous-familles : les protéines LC3 (LC3A, B et C) et les GABARAP (GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2 [ou GATE16]) (Schaaf *et al.*, 2016). Le processus de lipidation reste le même pour tous les LC3 (Figure 14.B). Tout d'abord, les précurseurs de LC3 (pro-LC3) sont clivés par les cystéines protéases ATG4, afin d'exposer un résidu Glycine à l'extrémité C-terminale et donner la forme I de LC3 (LC3-I), qui est diffuse dans le cytoplasme (Ichimura *et al.*, 2000). Lorsque l'autophagie est induite, la forme LC3-I est convertie en une forme LC3-II lipidée, c'est-à-dire lié de manière covalente au PE (PhosphatidylÉthanolamine). La conjugaison fait intervenir ATG7 comme enzyme activatrice (*E1 like*), qui induit le transfert de LC3-I vers ATG3 (*E2 like*), puis le complexe ATG5-ATG12/ATG16L1 agit en tant que ligase (*E3 like*). La lipidation des LC3 entraîne leur localisation à la fois dans la membrane interne et externe de l'autophagosome (Kabeya *et al.*, 2004), faisant de LC3 un marqueur classique des vésicules autophagiques (Klionsky *et al.*, 2021).

L'association de l'ensemble de ces protéines au niveau du phagophore assure sa courbure ainsi que son élongation par apport de lipides provenant de vésicules donneuses (Figure 13). La protéine transmembranaire ATG9, présente dans la membrane de diverses vésicules permet leur recrutement au niveau des structures pré-autophagosomales (Orsi *et al.*, 2012).

#### ④ Fermeture

Lorsque le phagophore s'est suffisamment allongé, ses extrémités se rejoignent afin de fermer la vésicule qui sera alors appelée un autophagosome (Figure 13). Le processus permettant la fermeture de la vésicule correspond à de la scission/fission (Figure 15), et non de la fusion contrairement à ce qu'il pourrait être intuitif de penser (Knorr *et al.*, 2015). En effet, la scission membranaire conduit à la rupture d'une membrane en deux membranes distinctes, alors que la fusion permet de ne former

qu'une membrane à partir de deux membranes séparées. Après fermeture de l'autophagosome, les LC3 de la membrane externe seront clivés par ATG4 (Figure 13).

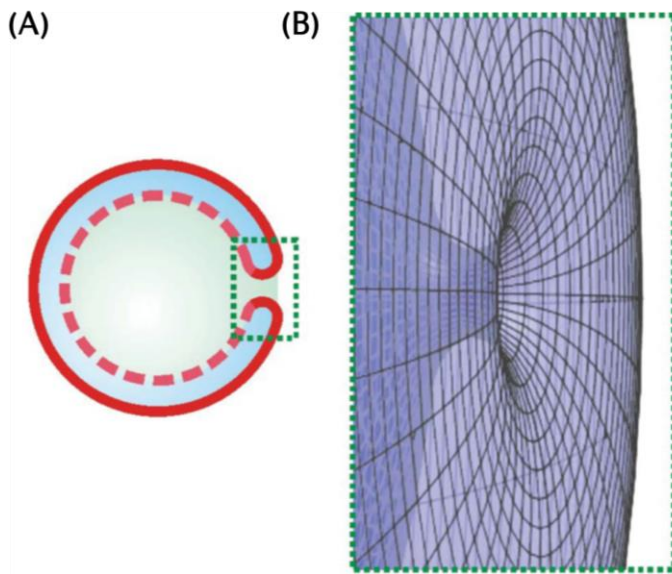


Figure 15 | La scission membranaire assure la fermeture du phagophore

(A) Vue en coupe 2D d'un phagophore sur le point de se fermer. On peut voir la double membrane se courber, ce qui rapproche ses deux extrémités. La zone de scission est montrée par le rectangle vert. (B) Vue en 3D de la zone de scission des extrémités du phagophore. La scission permet de créer deux membranes distinctes à partir d'une seule membrane. Cette étape permet la création d'un autophagosome où la membrane interne et la membrane externe deviennent deux entités distinctes. Adaptée de (Knorr *et al.*, 2015).

Dans le cas d'une autophagie non-sélective, la fermeture de l'autophagosome permet d'englober en son sein une portion cytoplasmique de manière aléatoire. Des voies d'autophagie sélective permettent de dégrader spécifiquement un cargo. Elles impliquent des protéines adaptatrices, appelées des récepteurs autophagiques, qui permettent de recruter la machinerie nécessaire à la synthèse d'un phagophore autour du cargo à dégrader (Melia *et al.*, 2020). Ce type d'autophagie sera détaillé dans le paragraphe suivant (§ II. 1. C).

### ⑤ Maturation

La maturation de l'autophagosome correspond à l'étape préparant sa fusion avec les lysosomes. Pour cela, la machinerie nécessaire à l'adressage des autophagosomes aux lysosomes sera recrutée, tout comme les effecteurs assurant la fusion (Dikic & Elazar, 2018). Cette fusion membranaire fait intervenir des protéines présentes sur la vésicule donneuse et la vésicule receveuse, et elle implique notamment les protéines de la famille des SNARE. Ainsi, la fusion entre l'autophagosome et le lysosome requiert les protéines STX17 et SNAP29 (*SyNaptosomal Associated Protein 29kDa*), localisées sur la membrane de l'autophagosome, et VAMP8 (*Vesicle-Associated Membrane Protein 8*), localisée sur le lysosome (Diao *et al.*, 2015; Itakura *et al.*, 2012). La fusion aboutit à la formation d'un autolysosome (Figure 13).

### ⑥ Dégradation

Au sein de l'autolysosome, l'activité enzymatique des hydrolases permet la dégradation de la membrane interne de l'autophagosome ainsi que du contenu qui y est séquestré. Les produits de dégradation sont exportés vers le cytoplasme, grâce à un mécanisme d'efflux, et les métabolites ainsi libérés seront recyclés par la machinerie cellulaire (Dikic & Elazar, 2018) (Figure 13).

## II. 1. C L'autophagie sélective

Alors que l'autophagie était initialement considérée comme un mécanisme de dégradation non-spécifique, de nombreuses voies d'autophagie sélective sont aujourd'hui décrites. Ces dernières ont pour but d'éliminer de manière sélective des organites endommagés ou surnuméraires, ainsi que du matériel non désiré tel que des agrégats protéiques ou des agents pathogènes intracellulaires (Galluzzi *et al.*, 2017). Ces mécanismes d'autophagie sélective offrent à la cellule un contrôle qualité fondamental dans le maintien de son homéostasie. Les diverses voies d'autophagie sélective ont été nommées selon le type de cargo destiné à être éliminé (Figure 16).

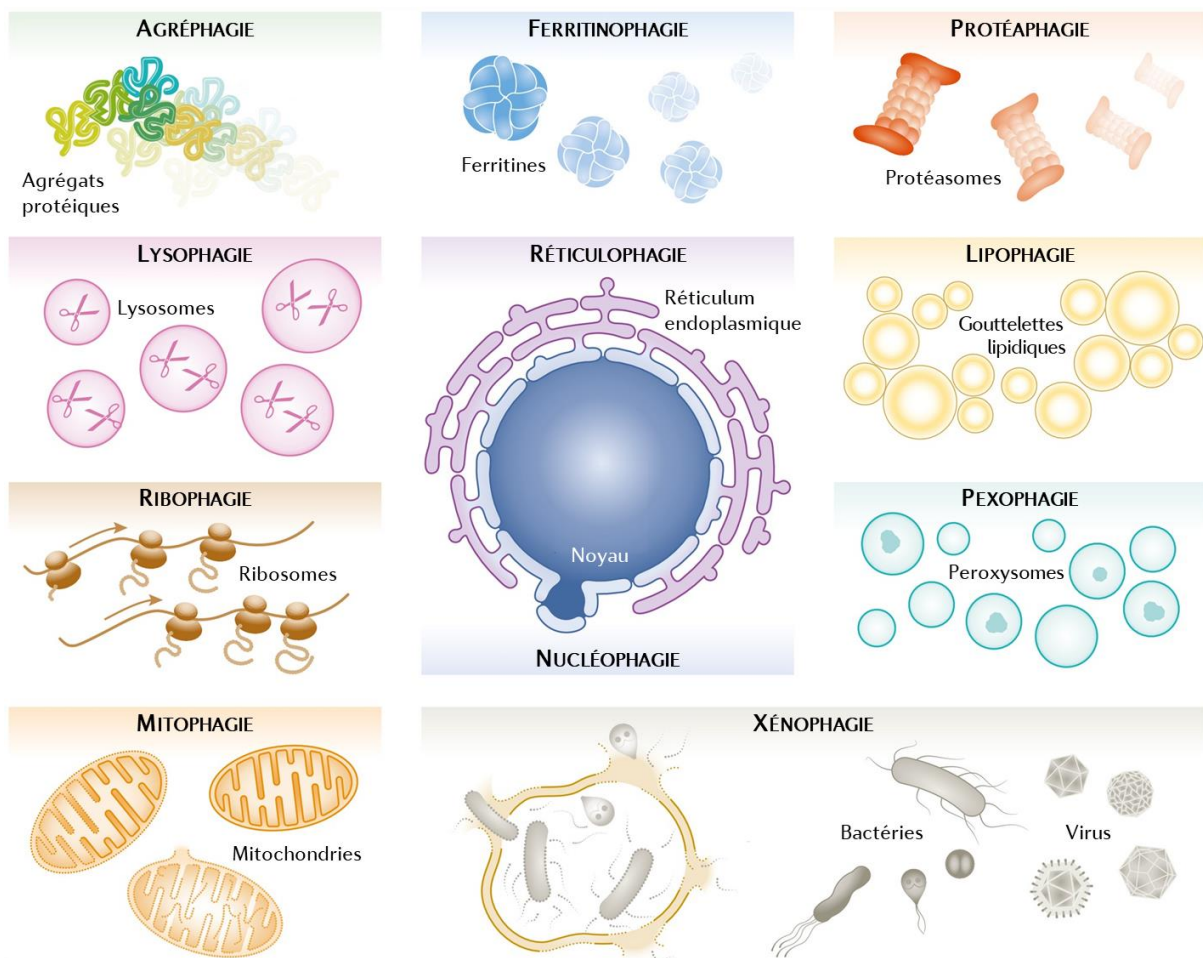


Figure 16 | Les différentes formes d'autophagie sélective chez les mammifères

Une grande variété de cargos cytoplasmiques peut être ciblée par la dégradation lysosomale autophagique. Différentes formes d'autophagie sélective ont donc été caractérisées selon le type de cargo pris en charge : agrégats protéiques (agréphagie), lysosomes (lysophagie), ribosomes (ribophagie), mitochondries (mitophagie), ferritine (ferritinophagie), RE (réticulophagie), portions de noyau (nucléophagie), protéasomes (protéaphagie), gouttelettes lipidiques (lipophagie), peroxysomes (pexophagie), virus ou bactéries (xénophagie). Adaptée de (Galluzzi *et al.*, 2017).

À titre d'exemple, l'élimination d'agrégats protéiques est appelée de l'agréphagie (Morimoto *et al.*, 2015), celle des peroxysomes est de la pexophagie (Cho *et al.*, 2018) ou celle d'agents pathogènes est

de la xénophagie (Mao & Klionsky, 2017). Lorsqu'il s'agit de la dégradation de mitochondries, on parle de mitophagie (Mizushima & Levine, 2010; Pickles *et al.*, 2018) ou encore de réticulophagie quand des portions de réticulum endoplasmique (RE) sont dégradées (Khaminets *et al.*, 2015). Dans la suite de ce manuscrit (§ IV. 1. C), nous reviendrons en détail sur les mécanismes de la mitophagie.

La sélectivité du processus autophagique est rendue possible par l'existence de récepteurs spécifiques des cargos à éliminer. La plupart de ces récepteurs possèdent un motif LIR (*LC3-Interacting Region*) (Wild *et al.*, 2014) leur permettant de se lier aux protéines de la famille LC3 et ainsi d'adresser le cargo au phagosome (Schaaf *et al.*, 2016). De plus, certains récepteurs possèdent un motif de liaison à l'Ub (UBD pour *Ub-binding domain*) leur permettant de reconnaître des cibles ubiquitinylées. Ainsi, deux voies d'autophagie sélective existent : l'une dépendante de l'Ub et l'autre indépendante (Figure 17).

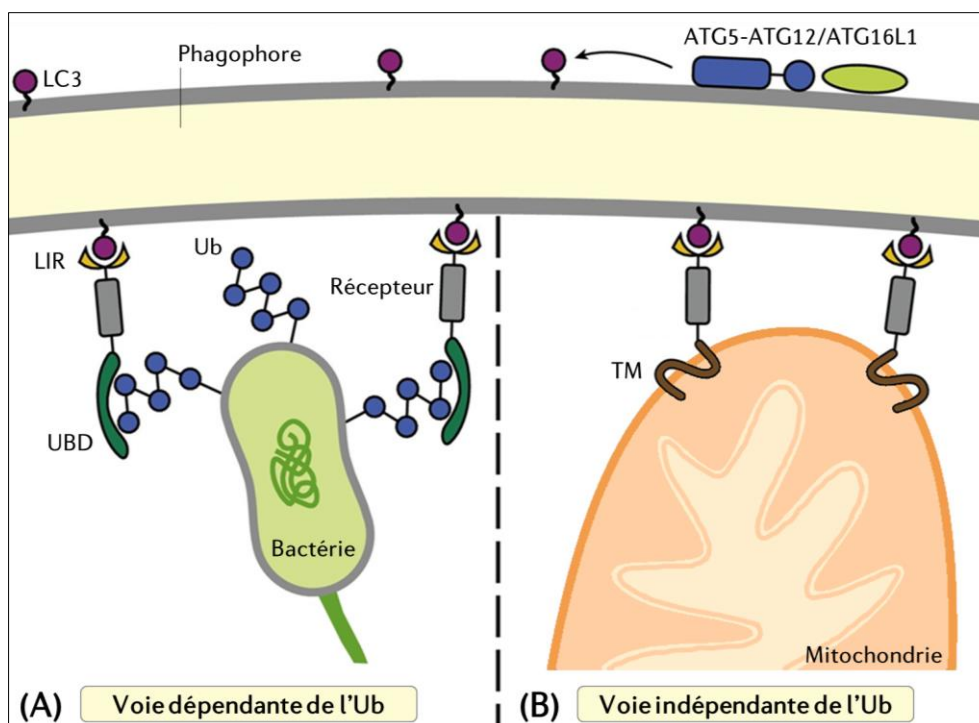


Figure 17 | Principe de l'autophagie sélective et rôle de l'Ub

Les protéines LC3 jouent un rôle fondamental lors de l'autophagie sélective. La forme lipidée de LC3, associée aux membranes du phagosome, interagit avec des récepteurs autophagiques possédant des domaines LIR. **(A)** Lors de la voie dépendante de l'Ub, les récepteurs reconnaissent via leur domaine UBD les chaînes d'Ub attachées à un composant intracellulaire (ici une bactérie). Cette interaction permet le recrutement du phagosome autour du cargo. **(B)** Lors de la voie indépendante de l'Ub, les récepteurs autophagiques se fixent directement à leur cible (ici une mitochondrie), dans certains cas via leur domaine TM. De la même manière le cargo se retrouvera dans la lumière de l'autophagosome. Adaptée de (Khaminets *et al.*, 2016).

LIR, *LC3-Interacting Region* ; TM, *TransMembranaire* ; Ub, *Ubiquitine* ; UBD, *Ubiquitin-Binding Domain*.

Les récepteurs impliqués dans la voie dépendante de l'Ub incluent p62/SQSTM1, NBR1, OPTN, NDP52, RPN10, TOLLIP et TAX1BP1 (Gatica *et al.*, 2018; Khaminets *et al.*, 2016 - Tableau 2). Concernant la voie indépendante de l'Ub, d'autres récepteurs cellulaires peuvent lier directement leurs substrats, c'est le cas des récepteurs BNIP3, NIX, FUNDC1, PHB2, FAM134B ou encore la galectine-8 (Gatica *et al.*, 2018;

Khaminets *et al.*, 2016 - Tableau 2). La reconnaissance du cargo induit le recrutement du complexe ULK1/2 via l'interaction de FIP200 avec les récepteurs autophagiques (Melia *et al.*, 2020; Ravenhill *et al.*, 2019). S'en suit le recrutement du complexe PI3KC3, ainsi que l'ensemble du processus aboutissant à la formation, *de novo*, du phagophore autour du cargo. Après la fermeture du phagophore, le cargo, fixé à son récepteur autophagique, se trouvera dans la lumière de l'autophagosome où il pourra être dégradé.

| Voies d'autophagie sélective | Récepteurs impliqués                 |
|------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Ub-dépendante</b>         |                                      |
| Agréphagie                   | p62, NBR1, OPTN, TOLLIP              |
| Lysophagie                   | p62                                  |
| Mitophagie                   | p62, OPTN, NDP52, TAX1BP1            |
| Péxophagie                   | p62, NBR1                            |
| Protéaphagie                 | RPN10                                |
| Xénophagie                   | p62, NDP52, OPTN                     |
| <b>Ub-indépendante</b>       |                                      |
| Ferritinophagie              | NCOA4                                |
| Lysophagie                   | Galectine-8                          |
| Mitophagie                   | NIX, BNIP3, FUNDC1, BCL2L13          |
| Péxophagie                   | NBR1                                 |
| Réticulophagie               | FAM134B                              |
| Xénophagie                   | Galectine-8, TRIM5 $\alpha$ , SMURF1 |

Tableau 2 | Récepteurs impliqués lors des différentes voies d'autophagie sélective

Seuls les récepteurs autophagiques identifiés chez les mammifères sont indiqués dans le tableau. D'après les données de (Gatica *et al.*, 2018) et (Khaminets *et al.*, 2016).

BCL2L13, *BCL2-Like13*; BNIP3, *BCL-2-interacting Protein 3*; FAM134B, *FAMily with sequence similarity 134*; FUNDC1, *FUN14 Domain-Containing 1*; NBR1, *Neighbor of BRCA1 gene 1 protein*; NCOA4, *Nuclear Receptor Coactivator 4*; NDP52, *Nuclear Dot Protein 52 kDA*; NIX, *NIP3-like protein X*; OPTN, *OPTiNeurine*; RPN10, *Regulatory Particle Non-ATPase 10*; SMURF1, *SMAD Ubiquitin Regulatory Factor 1*; TAX1BP1, *TAX1-Binding Protein 1*; TOLLIP, *TOLL Interacting Protein*; TRIM5 $\alpha$ , *TRlpartite Motif-containing protein 5 $\alpha$* .

## II. 1. D Quelques fonctions biologiques de l'autophagie

### II. 1. D. (a) Rôles physiologiques

L'autophagie est active à un niveau basal dans la plupart des organismes et son but premier est d'assurer le contrôle qualité des constituants cellulaires afin de maintenir l'homéostasie. En effet, comme vu avant, l'autophagie participe à l'élimination de protéines à longue durée de vie, de macromolécules ou encore de certains organites endommagés ou surnuméraires. Dans un modèle souris, il a été montré qu'un défaut d'autophagie entraîne l'accumulation d'éléments cellulaires toxiques tels que des agrégats protéiques ubiquitinylés ou encore des mitochondries dysfonctionnelles (Murrow & Debnath, 2013). De plus, la dégradation autophagique ne présente pas de pertes pour la cellule puisqu'elle génère des métabolites primaires (acides aminés et acides gras) qui seront recyclés lors de la biosynthèse protéique ou pour la production d'énergie (Yorimitsu & Klionsky, 2005).

De nombreuses études indiquent un rôle fondamental de l'autophagie au cours du développement. Chez les mammifères, l'autophagie est essentielle lors de l'embryogenèse en permettant l'implantation du fœtus (Tsukamoto *et al.*, 2008). Mais aussi, il a été montré que l'extinction de différents gènes autophagiques conduit à de la létalité embryonnaire chez des modèles souris



(Mizushima & Levine, 2010). L'autophagie est également impliquée dans la différenciation de divers types cellulaires, notamment lors de la maturation des cellules sanguines en leucocytes et en érythrocytes. Par exemple, l'autophagie participe à la dégradation des mitochondries lors de la maturation des réticulocytes en érythrocytes (Mizushima & Levine, 2010; Yousefi & Simon, 2009).

En permettant l'élimination de constituants intracellulaires, il n'est pas surprenant que l'autophagie soit impliquée dans des processus immunitaires. Par exemple, lorsque la phagocytose ne parvient pas à contrôler l'infection par un agent pathogène intracellulaire, l'autophagie peut contribuer à sa dégradation, il s'agit de la xénophagie (Mao & Klionsky, 2017). L'autophagie participe également à la présentation antigénique par les cellules dendritiques, en permettant de charger des peptides microbiens ou endogènes sur les molécules de CMH-II (Crotzer & Blum, 2009). De plus, comme nous le verrons dans la suite de ce manuscrit (§ IV. 2), les mitochondries sont essentielles pour l'induction de l'immunité innée. En maintenant l'homéostasie mitochondriale, via l'élimination des entités endommagées, la mitophagie permet, *in fine*, de réguler l'immunité innée (Cho *et al.*, 2020).

Lors de divers stress tels qu'une carence nutritive, une hypoxie ou une exposition à des radiations, l'autophagie agit comme un mécanisme pro-survie en protégeant la cellule des désordres extérieurs. Par exemple, en réponse à un dommage à l'ADN, une voie de signalisation complexe appelée la DDR (*DNA Damage Response*) se met en place et aboutit à l'activation de l'autophagie. Cette activation protège la cellule des dommages causés à l'ADN. D'ailleurs, le dysfonctionnement de l'un des mécanismes de la DDR peut conduire à des pathologies telles que le vieillissement prématuré ou le développement de cancers (Gomes *et al.*, 2017).

La mort cellulaire joue un rôle fondamental dans l'homéostasie de l'organisme en éliminant l'excès de cellules indésirables, la plupart du temps, par apoptose. Au-delà de ses divers rôles résolument pro survie, l'autophagie peut également contribuer à la mort cellulaire, dépendante ou non de l'apoptose (Denton & Kumar, 2019). Ces mécanismes de communication entre les voies autophagiques et apoptotiques seront discutés plus en détail dans la suite de ce manuscrit (§ II. 3).

#### II. 1. D. (b) Rôles pathologiques

Les fonctions de l'autophagie sont essentielles à l'intégrité de notre organisme, et cela se confirme par le nombre de pathologies humaines imputables à des déficits autophagiques (Figure 18). Les altérations de l'autophagie sont impliquées dans des pathologies systémiques comme des cancers ou des maladies métaboliques, et dans des pathologies spécifiques d'organes comme des maladies neurodégénératives, qui touchent le système nerveux central, la maladie de Crohn ou encore des myopathies (Schneider & Cuervo, 2014).

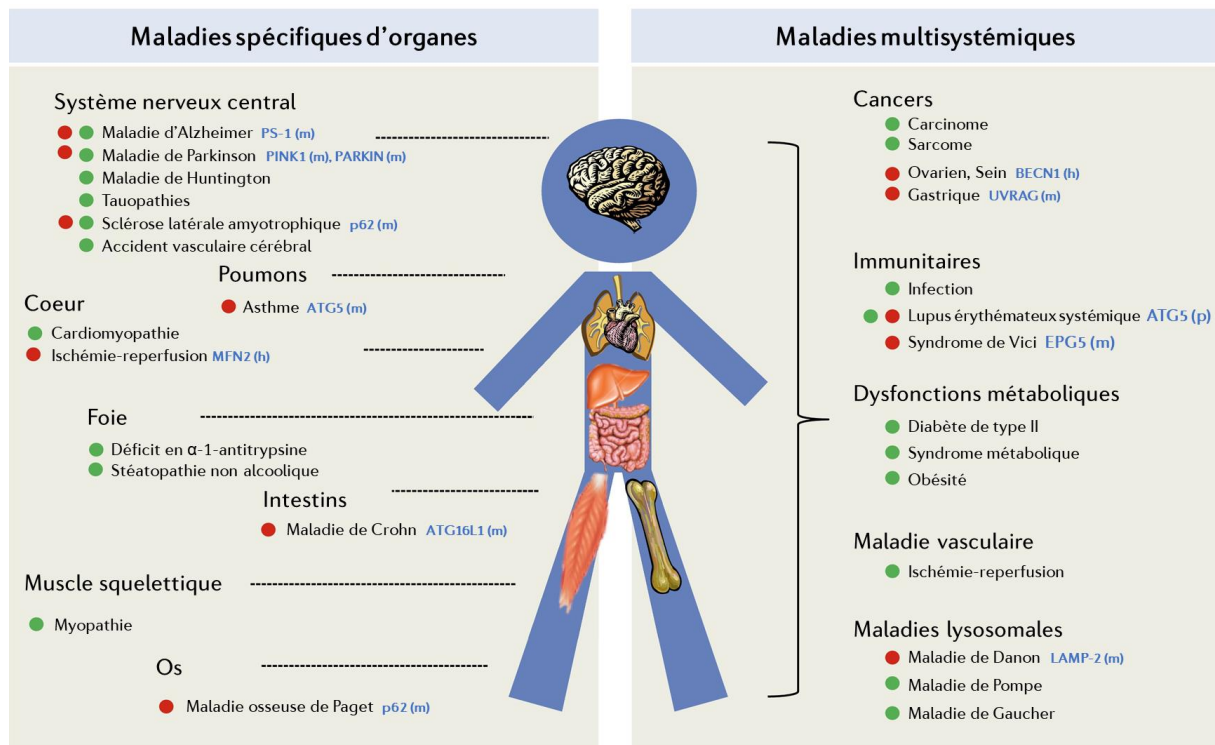


Figure 18 | **Pathologies humaines liées à l'autophagie**

Représentation des différentes pathologies humaines spécifiques d'organes (gauche) et systémiques (droite) pour lesquelles des altérations autophagiques sont décrites. Les points rouges indiquent des défauts autophagiques antérieurs à la maladie, tandis que les points verts indiquent des défauts autophagiques postérieurs ou réactifs à la maladie. Pour chaque pathologie est indiqué en bleu quel composant de la machinerie autophagique est altéré et entre parenthèse la nature de l'altération : m, mutations ; p, polymorphismes ; h, haplo-insuffisances. Adaptée de (Schneider & Cuervo, 2014)

L'autophagie est particulièrement impliquée dans la biologie des cancers dans lesquels elle présente un rôle bivalent, à savoir pro- ou anti-tumoral, selon le contexte. Le premier lien direct entre le développement de tumeur et l'autophagie fut découvert lors de l'identification du rôle du gène *BECN1* (Liang *et al.*, 1999). Ce gène est muté dans plusieurs types de cancers humains et son invalidation, chez la souris, conduit au développement de tumeurs, suggérant un rôle oncosuppresseur de l'autophagie (Yue *et al.*, 2003). Par la suite, d'autres gènes autophagiques ont été décrits comme suppresseurs de tumeurs tels qu'*UVRAG* (*UV radiation Resistance-Associated Gene*), *ATG5* ou encore *ATG7* (Liang *et al.*, 2006; Takamura *et al.*, 2011). Dans des cellules saines, ou aux étapes précoces du développement tumoral, l'autophagie basale agit en tant que suppresseur de tumeur en éliminant des composants cellulaires endommagés tels que les mitochondries. Ces dernières produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROSmt pour *Reactive Oxygen Species*), qui induisent une inflammation et causent des dommages à l'ADN, deux paramètres favorables à la progression tumorale (Green *et al.*, 2011). De plus, la protéine p62/SQSTM1 possède une activité pro-tumorale et est un substrat autophagique. Ainsi, l'autophagie basale limite l'oncogenèse en contrôlant son accumulation dans les cellules (Rubinsztein *et al.*, 2012).

À l'inverse, lorsque le développement tumoral est plus avancé, l'autophagie peut être utilisée à l'avantage des cellules cancéreuses en améliorant le métabolisme et la survie cellulaire (Galluzzi *et al.*, 2015). Par exemple, suite à la transformation cellulaire par l'oncogène RAS, des modifications métaboliques se produisent conduisant à une augmentation de la glycolyse au détriment de la respiration mitochondriale. Dans ces conditions, l'autophagie est stimulée et participe à la survie des cellules tumorales (Guo *et al.*, 2011). Un article montre ce double rôle de l'autophagie au cours de l'oncogenèse à travers l'exemple du cancer oral (Patil *et al.*, 2015). L'autophagie inhibe l'initiation de l'oncogenèse en assurant la stabilité génomique via la dégradation d'organites endommagés. Cependant, l'autophagie est favorable aux cancers déjà avancés en améliorant la survie des cellules et leur résistance aux traitements chimiothérapeutiques. L'inhibition pharmacologique de l'autophagie permet de resensibiliser les cellules aux traitements, offrant des perspectives thérapeutiques (Patil *et al.*, 2015).

L'autophagie intervient dans la protection des cellules neuronales vis-à-vis de l'accumulation d'agrégats protéiques toxiques. Lors d'un déficit autophagique, les agrégats ne sont plus éliminés et leur accumulation peut conduire à la dégénérescence neuronale. Il est notamment démontré chez la souris qu'en absence d'autophagie, elles développent de graves maladies neurodégénératives (Hara *et al.*, 2006). Chez l'être humain, diverses pathologies neurodégénératives sont associées à des défauts autophagiques, comme la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer ou encore la maladie de Huntington (Yang & Klionsky, 2020).

## II. 2 L'apoptose : la mort cellulaire programmée

### II. 2. A Généralités sur l'apoptose

Le terme apoptose fut proposé pour la première fois en 1972 afin de désigner un processus conservé de mort cellulaire induit par divers stress (Kerr *et al.*, 1972). L'apoptose est définie comme une mort cellulaire programmée puisqu'elle requière des signaux spécifiques permettant à la cellule, dans un premier temps, de contrôler sa propre destruction, puis dans un second temps a lieu l'élimination de la cellule apoptotique, notamment par phagocytose (Kerr *et al.*, 1972). La mort par apoptose s'accompagne d'un phénotype caractéristique avec une condensation du cytoplasme et de la chromatine, une fragmentation de l'ADN et d'organites (appareil de Golgi, RE, mitochondries), un bourgeonnement de la membrane plasmique ou encore l'expulsion de fragments cellulaires appelés « corps apoptotiques » (Saraste & Pulkki, 2000; Taylor *et al.*, 2008). Les cellules en apoptose perdent également l'asymétrie de distribution des phospholipides membranaires puisqu'elles exposent à leur surface la phosphatidylsérine (PS), uniquement retrouvée sur le feuillet interne de la membrane



plasmique en condition physiologique (Schlegel & Williamson, 2001). L'externalisation des PS est un signal permettant la reconnaissance des cellules apoptotiques par les macrophages afin de les éliminer par phagocytose (Fadok *et al.*, 1992).

## II. 2. A. (a) Les caspases

Lors de l'apoptose, les altérations de la cellule sont orchestrées par les enzymes de la famille des caspases, des protéases à cystéines, qui clivent en cascade divers substrats protéiques conduisant à la mort cellulaire. À ce jour, dix-huit caspases ont été identifiées chez les mammifères et classées selon leurs structures et fonctions (Figure 19).

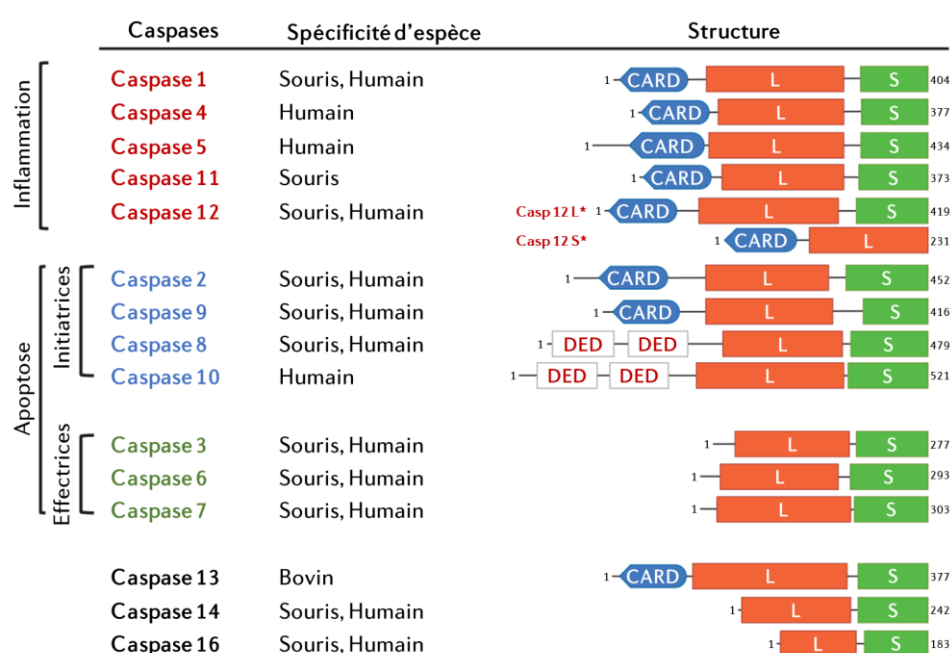


Figure 19 | **Classification des caspases chez les mammifères**

Les caspases 1, 4, 5, 11 et 12 sont des caspases inflammatoires. Les caspases apoptotiques sont subdivisées en deux catégories : les initiatrices (2, 8, 9 et 10) et les effectrices (3, 6 et 7). Les caspases 15, 17 et 18 ne sont pas représentées ici car non retrouvées chez les mammifères placentaires. Toutes ces caspases sont retrouvées dans le cytoplasme sous forme inactive (pro-caspases). Leur activation requiert un double clivage, le premier au niveau du pro-domaine N-terminal et le second permettant de séparer les sous-unités L et S. Après clivage, les caspases s'assemblent en hétérotétramères enzymatiquement actifs. Le pro-domaine N-terminal des caspases initiatrices de l'apoptose contient soit un domaine DED soit un domaine CARD, leur permettant d'être recrutées dans des complexes multiprotéiques comme l'apoptosome (caspase 2 et 9) ou le complexe DISC (caspase 8 et 10). Une fois les caspases initiatrices activées, elles seront en charge d'initier la phase d'exécution de l'apoptose en activant, par clivage, les caspases effectrices. Adaptée de (Shalini *et al.*, 2015).

CARD, *C*Aspases *R*ecruitment *D*omain ; DEAD, *D*eath *E*ffector *D*omain ; L, *L*arge subunit ; S, *S*mall subunit ; S\*, *S*hort form ; L\*, *L*ong form.

Certaines caspases sont impliquées dans le processus inflammatoire et d'autres dans l'apoptose. Parmi ces dernières, on distingue les caspases initiatrices (2, 8, 9 et 10) et les caspases effectrices (3, 6 et 7), activées par les initiatrices (Shalini *et al.*, 2015). De nombreux substrats des caspases effectrices

existent. Ces substrats correspondent à des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire, dans les mécanismes de réparation de l'ADN ou encore dans la régulation du cycle cellulaire (Julien & Wells, 2017). De fait, l'activité des caspases effectrices conduit au démantèlement de la cellule, puis à sa mort.

## II. 2. A. (b) Les protéines de la famille BCL-2

Le gène *BCL-2* (*B-Cell Lymphoma-2*) fut identifié en 1984 dans des lymphomes B folliculaires (Tsujiimoto *et al.*, 1984). Ces lymphomes sont la conséquence d'une translocation chromosomique de type t(14;18), plaçant le gène *BCL-2* sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde des immunoglobulines et entraînant son expression constitutive. BCL-2 est un facteur pro-survie dans la mesure où sa surexpression dans les lymphocytes B provoque un allongement de leur viabilité (Vaux *et al.*, 1988). En effet, BCL-2, qui se localise dans les mitochondries, inhibe la mort cellulaire programmée par apoptose (Hockenbery *et al.*, 1990). L'identification de ce gène impliqué dans le blocage de l'apoptose laissait supposer la possible existence d'agonistes ou d'antagonistes du processus permettant sa régulation. Une vingtaine d'homologues furent d'ailleurs identifiés sur la base de la présence de motifs conservés BH (*BCL-2 Homology domain*), composant ainsi la famille BCL-2 (Aouacheria *et al.*, 2019). Aujourd'hui, cette vaste famille de protéines a été classée en 3 sous-groupes, sur des critères structuraux et fonctionnels (Figure 20). On distingue :

- les membres anti-apoptotiques. Au niveau structural, ces protéines présentent la plus forte homologie avec BCL-2 et disposent d'une variété importante de domaines BH. Elles sont également pourvues d'un domaine transmembranaire permettant leur localisation mitochondriale ou dans le RE. Ces membres sont représentés par les protéines BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>, BCL-w, MCL-1, A1 et BCL-B ;
- les membres pro-apoptotiques ...
  - ... à multi-domaines. Ils se caractérisent par la présence de trois domaines BH (BH1 à BH3) ainsi que d'un domaine transmembranaire. Ces membres sont représentés par les protéines BAX, BAK et BOK ;
  - ... à domaine *BH3-only*. Ces protéines ne disposent que du domaine BH3, qui est essentiel pour leur activité pro-apoptotique. Ces membres sont représentés par les protéines BID, BIM, PUMA, NOXA, HRK, BIK, BAD et BMF.

Au-delà de leur rôle au cours de l'apoptose, les protéines de la famille BCL-2 sont impliquées dans divers processus liés à la survie cellulaire. En effet, elles régulent la physiologie du RE et de la mitochondrie, des processus métaboliques complexes, la progression du cycle cellulaire, ou encore l'autophagie (Gross & Katz, 2017).

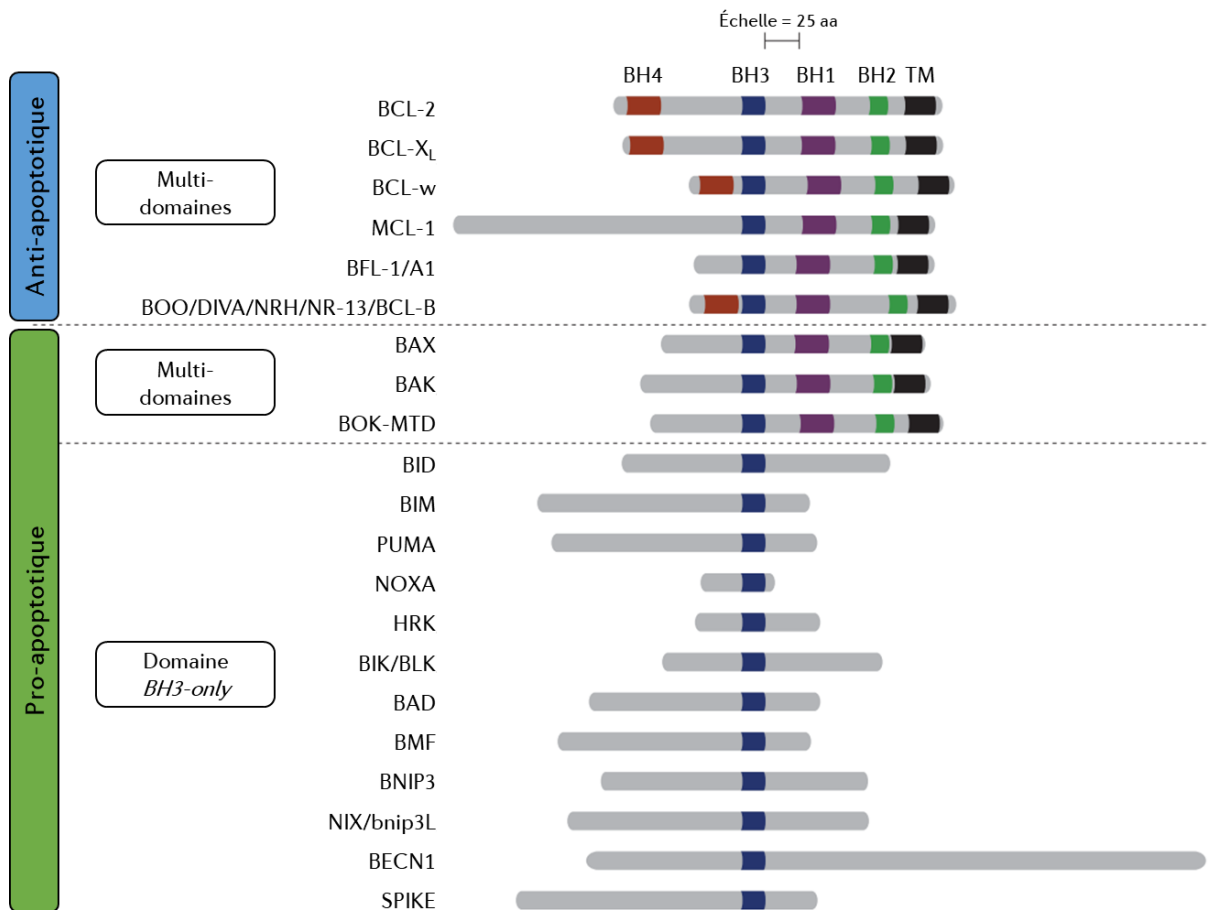


Figure 20 | **Classification des membres de la famille BCL-2**

Les membres de la famille BCL-2 se distinguent selon leur capacité à inhiber ou activer l'apoptose. Les domaines BH et TM, conservés entre les différents membres de la famille, sont montrés. Adaptée de (Gross & Katz, 2017). BH, *BCL-2 Homology domain* ; TM, TransMembranaire.

## II. 2. B Déroulement de l'apoptose

Suivant la signalisation impliquée, deux voies d'induction de l'apoptose se distinguent. La première, dite intrinsèque ou mitochondriale, est une voie régulée par les protéines de la famille BCL-2, au cours de laquelle la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MME) est l'étape clé de son activation. La seconde, dite extrinsèque, est une voie activée lors de la stimulation des récepteurs de mort, présents à la surface de la cellule (Figure 21) (Mariño *et al.*, 2014).

### II. 2. B. (a) La voie intrinsèque/mitochondriale

La voie intrinsèque, également connue sous le nom de voie mitochondriale, est initiée par une variété de perturbations environnementales et de stress cellulaires tels que des dommages à l'ADN, un stress du RE, l'accumulation de ROSmt, ou encore une carence nutritive (Galluzzi *et al.*, 2018). Cette voie est finement régulée par les protéines de la famille BCL-2 et la mitochondrie joue un rôle central dans son initiation (Figure 21.B). En effet, la voie intrinsèque est initiée par une perte du potentiel de la

membrane mitochondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) conduisant à sa perméabilisation. Ce phénomène appelé MOMP (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*) permet le passage d'une multitude de molécules activatrices de l'apoptose vers le cytoplasme telles que le cytochrome C, le facteur AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) ou encore l'endonucléase G (EndoG) (Kale *et al.*, 2018). La libération dans le cytoplasme du cytochrome C lui permet d'interagir avec APAF-1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor-1*) et de l'activer. APAF-1 se lie à la pro-caspase 9, qu'elle active à son tour formant ainsi l'apoptosome. Ce dernier induit l'activité des caspases effectrices.

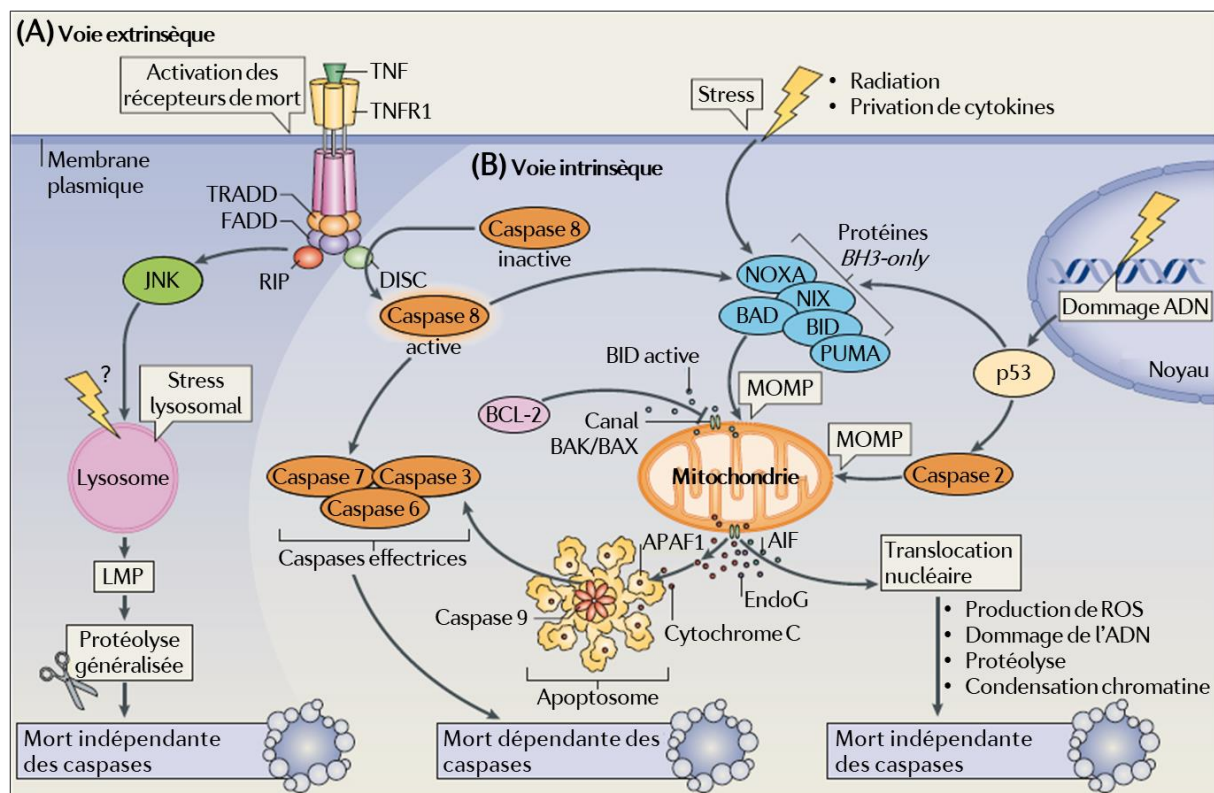


Figure 21 | Les différentes voies de l'apoptose

**(A)** La voie extrinsèque correspond à l'induction de l'apoptose par un signal extracellulaire. Elle est initiée par la stimulation d'un récepteur de mort (TNFR1) par son ligand (TNF). Cette activation conduit au recrutement de diverses protéines telles que TRADD, FADD ou encore la pro-caspase 8. Cette dernière est activée par clivage protéolytique lui permettant à son tour d'activer les caspases effectrices de la mort (3, 6 et 7). La caspase 8 peut également agir au niveau des protéines *BH3-only* afin de stimuler la voie mitochondriale de l'apoptose. La stimulation des récepteurs de mort peut aussi induire un stress lysosomal pouvant conduire à la perméabilité de sa membrane (LMP). La LMP libère dans le cytoplasme des hydrolases et cathépsines, qui induisent une protéolyse généralisée conduisant à de la mort cellulaire indépendante des caspases. **(B)** La voie intrinsèque de l'apoptose est caractérisée par la MOMP, entraînant la libération dans le cytoplasme du cytochrome C, où il interagit avec APAF-1 et la pro-caspase 9, formant ainsi l'apoptosome. La caspase 9 pourra ensuite cliver les caspases effectrices de la mort. La MOMP peut être induite de plusieurs manières. La stabilisation des protéines *BH3-only* conduit à l'oligomérisation de BAX et BAK à la surface mitochondriale où ils forment un canal responsable de la MOMP. Les dommages à l'ADN peuvent induire la transactivation de gènes pro-apoptotiques via la protéine p53. Cette dernière active la caspase 2 qui provoque la MOMP en clivant BID. Parmi les protéines libérées suite à la MOMP, AIF et EndoG peuvent également induire de la mort cellulaire indépendante des caspases. Adaptée de (Mariño *et al.*, 2014).

LMP, *Lysosomal Membrane Permeabilization* ; MOMP, *Mitochondrial Outer Membrane*

La voie intrinsèque peut aussi induire une mort indépendante des caspases. Celle-ci repose sur la libération d'AIF et d'EndoG lors de la MOMP, qui vont aller dans le noyau afin d'induire directement la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (Kroemer *et al.*, 2007). Ces mécanismes sont redondants mais convergent tous vers l'initiation de l'apoptose lorsqu'un certain « seuil » de dommage au niveau mitochondrial est atteint. Il est à noter que la voie mitochondriale peut aussi être induite consécutivement à la stimulation des récepteurs de mort afin d'amplifier le signal apoptotique. En effet, l'activation de la caspase 8 au sein du complexe DISC (*Death Inducing Signaling Complex*) conduit au clivage de BID, ce qui constitue un signal pro-apoptotique induisant la MOMP (Figure 22).

### Régulation

Les membres de la famille BCL-2 jouent un rôle crucial dans la régulation de cette voie (Strasser *et al.*, 2011). En effet, les protéines de cette famille interagissent entre elles et leurs activités déterminent la sensibilité de la cellule à la mort en impactant directement la MOMP (Figure 22). La MOMP est causée par les membres pro-apoptotiques BAX et BAK qui, une fois activés, s'oligomérisent pour former des pores au niveau de la MME (Figure 22). Ce phénomène est régulé par les autres protéines de la famille BCL-2 mais aussi par les protéines VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*). En condition basale, BAK est constitutivement associée à la MME où son activité est réprimée par VDAC2 (Lazarou *et al.*, 2010), tandis que BAX est maintenue dans le cytoplasme à l'état inactif (Schellenberg *et al.*, 2013). Lors d'un stress inducteur de l'apoptose, VDAC1 jouerait un rôle pro-apoptotique en se liant à BAX pour former un canal hétéro-oligomérique libérant le cytochrome C dans le cytoplasme (Magrì *et al.*, 2018). Il est à noter que VDAC1 peut également s'oligomériser et former des pores, indépendamment des protéines de la famille BCL-2 (Magrì *et al.*, 2018). L'activité de BAK et BAX est aussi régulée négativement par les membres anti-apoptotiques, notamment BCL-2 et BCL-X<sub>L</sub> qui établissent des interactions antagonistes (Edlich *et al.*, 2011). Les protéines *BH3-only* favorisent quant à elle la stabilisation de BAK et BAX, par le biais de deux mécanismes : l'un direct et l'autre indirect (Kuwana *et al.*, 2005). Par le mécanisme direct, les protéines *BH3-only* s'associent et activent BAK et BAX. C'est le cas de la protéine BID, qui est activée par la caspase 8 via une protéolyse (Figure 22). Sa forme tronquée (BIDt) interagit avec BAX et la recrute à la MME lui permettant de s'oligomériser et de former un canal perméabilisant la MME (Kale *et al.*, 2018). L'activation peut aussi se faire de manière indirecte via l'association et la neutralisation de l'activité des membres anti-apoptotiques par les protéines *BH3-only*. C'est le cas de BAD qui possède une forte affinité de liaison pour BCL-X<sub>L</sub> permettant de déplacer l'interaction antagoniste qu'établit BCL-X<sub>L</sub> avec BAX (Kale *et al.*, 2018).

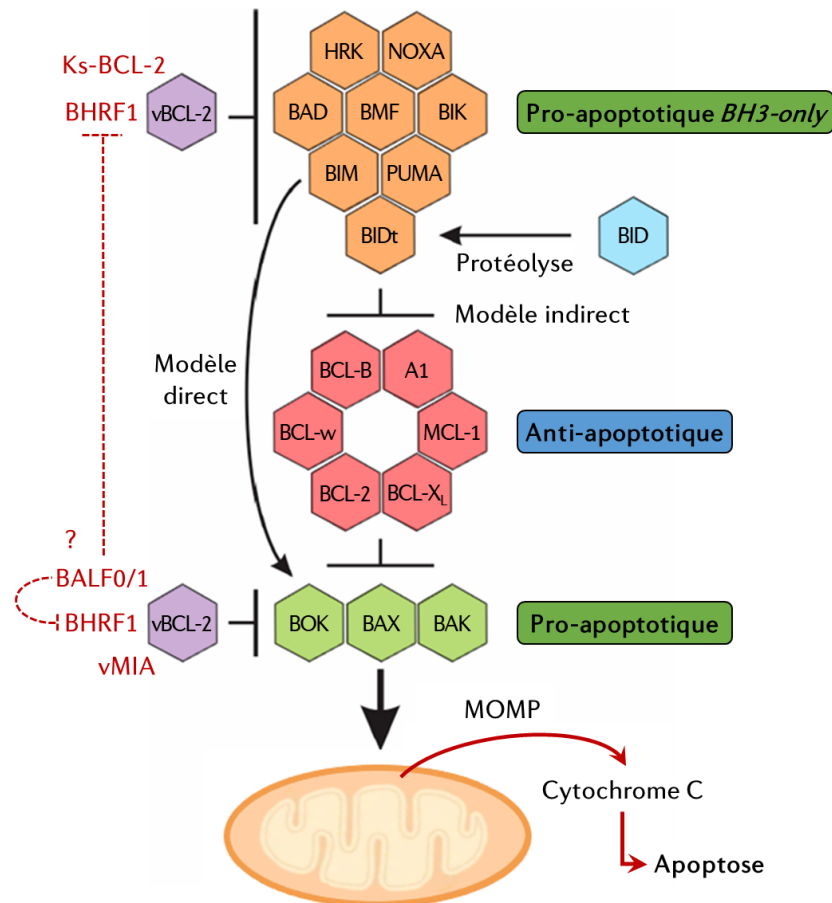


Figure 22 | **Mode d'action des BCL-2 et de quelques vBCL-2**

Le contrôle de l'intégrité de la membrane externe mitochondriale fait intervenir une régulation à trois niveaux via la famille des protéines BCL-2. L'activation de BOK, BAX et BAK conduit à la MOMP et à la libération de facteurs (cytochrome C) présents dans l'espace intermembranaire. Cet événement conduit à l'activation de caspases effectrices de l'apoptose. Les protéines à domaine *BH3-only* activent BOK, BAX et/ou BAK, soit en levant l'inhibition exercée par les protéines anti-apoptotiques (modèle indirect), soit par une activation directe (modèle direct). La protéine BID (*BH3 only*) est active à la suite d'un clivage protéolytique par la caspase 8. Les homologues viraux de BCL-2 (vBCL-2) préviennent l'initiation de l'apoptose soit en bloquant l'activité des protéines pro-apoptotiques *BH3-only*, soit en bloquant directement l'action des protéines BOK, BAX et/ou BAK. Les cibles de quelques vBCL-2, exprimées par des *Herpesviridae* humains, sont indiquées. Adaptée de (Kvansakul *et al.*, 2017).

La régulation positive de la voie intrinsèque fait intervenir le suppresseur de tumeur p53 (Figure 21.B). Il s'agit d'un facteur de transcription modulant, entre autres, l'expression des gènes codants les protéines de la famille BCL-2 (Vousden, 2005) et APAF-1 (Fortin *et al.*, 2001). Autrement, p53 pourrait également avoir une fonction extranucléaire en agissant de manière analogue à une protéine *BH3-only* en interagissant avec les protéines BCL-2 et BCL-X<sub>L</sub> afin de libérer les protéines BAK et BAX (Erster & Moll, 2005).

Un mécanisme naturel de régulation négative de la voie intrinsèque de l'apoptose existe et implique les protéines de la famille des IAPs (*Inhibitor of Apoptosis*). Ces protéines possèdent des domaines BIR (*Baculoviral IAP Repeat*) leur permettant d'interagir avec les caspases effectrices, puis d'induire leur dégradation via le protéasome (Suzuki *et al.*, 2001). Lors d'un stress conduisant à la MOMP, la protéine

mitochondriale SMAC/DIABLO est libérée dans le cytoplasme. Il s'agit d'un répresseur d'inhibiteur de caspases puisque SMAC/DIABLO interagit avec les IAPs pour inhiber leur fonction (Martinez-Ruiz *et al.*, 2008). Ainsi, l'inhibition sur la maturation des caspases est levée permettant l'induction de l'apoptose.

### II. 2. B. (b) La voie extrinsèque

La voie extrinsèque est initiée par un stimulus provenant du milieu extracellulaire, détecté par divers récepteurs de mort qui, une fois activés, conduisent à l'apoptose (Figure 21.A). Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs au TNF (*Tumour Necrosis Factor*) tels que FASR, TNFR1 (*TNR Receptor 1*) ou encore TRAILR (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor*) (Gaur & Aggarwal, 2003). La fixation du ligand entraîne la trimérisation de son récepteur, offrant une plateforme pour l'assemblage d'un complexe multiprotéique via le recrutement des protéines adaptatrices TRADD (*TNFR1-Associated Death Domain*) et FADD (*FAS-Associated Death Domain*). Ces dernières assurent la formation du complexe DISC, au sein duquel les caspases initiatrices 8 et 10 sont recrutées. La proximité entre leurs sites catalytiques permet leur activation par auto-protéolyse. L'activation des caspases initiatrices augmente leur activité catalytique et modifie la spécificité de substrat leur permettant de cliver, entre autres, BID et les caspases effectrices conduisant à la suite du processus apoptotique (Kantari & Walczak, 2011).

#### Régulation

L'étape initiale de la voie extrinsèque est régulée négativement par la protéine cFLIP (*cellular FLICE Inhibitory Protein*). Il s'agit d'un homologue structural de la caspase 8 qui se présente sous deux isoformes chez l'être humain : cFLIP<sub>L</sub> (*long*) et cFLIP<sub>S</sub> (*short*) (Irmiler *et al.*, 1997). Ces protéines possèdent deux domaines DED (*Death Effector Domain*), leur permettant d'interagir à la fois avec FADD et les pro-caspases 8 et 10, via une interaction domaine-domaine (Figure 19). Ainsi, cFLIP entre en compétition avec ces caspases initiatrices pour l'interaction avec FADD, ce qui empêche leur recrutement au complexe DISC et donc inhibe l'induction de l'apoptose (Irmiler *et al.*, 1997).

## II. 2. C Quelques fonctions biologiques de l'apoptose

### II. 2. C. (a) Rôles physiologiques

L'apoptose est importante au cours du développement, une phase associée avec une importante prolifération cellulaire, en permettant l'élimination de cellules surnuméraires, indésirables ou endommagées. Il a ainsi été montré que des souris résistantes à l'apoptose (triple délétion pour BAK, BAX et BOK) présentent une importante létalité fœtale associée à des anomalies physiques (Ke *et al.*,



2018). L'apoptose est fondamentale lors du développement cérébral, puisque près de la moitié des progéniteurs neuronaux seront éliminés par cette voie après prolifération (Southwell *et al.*, 2012).

L'apoptose est également impliquée dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. Le foie est un organe qui a la capacité de filtrer les toxines de notre organisme. Cette fonction s'explique par la capacité des hépatocytes à accumuler les toxines, puis à induire leur propre mort par apoptose. La mort des hépatocytes entraîne la libération de cytokines permettant de stimuler la régénération du foie et la prolifération cellulaire (Luedde *et al.*, 2014).

L'apoptose joue aussi un rôle important dans le développement du système immunitaire. Par exemple, lors de la prolifération des lymphocytes T, seules les cellules matures sont conservées, tandis que les immatures sont éliminées par apoptose (Nagata & Tanaka, 2017).

#### II. 2. C. (b) Rôles pathologiques

Un défaut d'apoptose ou sa dérégulation peut résulter dans le développement de cancers, de maladies neurodégénératives, ou encore dans la prolifération d'une infection virale (Singh *et al.*, 2019).

L'une des propriétés majeures d'une cellule cancéreuse est sa capacité à résister à l'apoptose, et il a été montré dans divers modèles que l'inhibition de l'apoptose facilite le développement des cancers (Lopez & Tait, 2015). Cette résistance à l'apoptose est d'origine variée suivant le type de cancers, mais résulte le plus souvent de la dérégulation de la balance entre l'activité des protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille BCL-2 (Campbell & Tait, 2018).

L'induction précoce de l'apoptose constitue un système de défense de l'hôte au cours d'une infection virale (Nainu *et al.*, 2017), mais aussi pour l'élimination de cellules tumorales (Chowdhury & Lieberman, 2008). Pour cela, les cellules granuleuses de l'immunité (lymphocytes T cytotoxiques et NK) reconnaissent les cellules indésirables. Au niveau de la zone de contact sont relarguées des granules cytotoxiques. Parmi elles, des perforines, qui s'oligomérisent à la surface cellulaire afin de former un pore permettant l'entrée des granzymes. La granzyme B, une sérine-protéase analogue aux caspases, clive divers substrats conduisant à l'apoptose (Chowdhury & Lieberman, 2008). L'élimination par phagocytose des cellules apoptotiques, suite à l'infection, prévient la propagation virale. De plus, ce mécanisme permet de stimuler la présentation antigénique et, par conséquent, d'amplifier les réponses immunitaires adaptatives (Nainu *et al.*, 2017).



## II. 3 Mécanismes d'interaction entre autophagie et apoptose

### II. 3. A Généralités et modèles d'interaction

L'autophagie et l'apoptose sont deux mécanismes interconnectés de réponse aux stress. Leurs voies d'induction sont difficiles à dissocier du fait que l'autophagie et l'apoptose peuvent être induites à la suite des mêmes stress et qu'elles partagent de nombreux acteurs communs, renforçant le lien étroit existant entre elles (Bloemberg & Quadriatero, 2019).

Plusieurs études montrent le lien direct entre l'induction de l'autophagie puis de l'apoptose. Ceci peut s'expliquer par le fait que les membranes autophagosomales offrent un support d'assemblage aux complexes nécessaires à l'induction de l'apoptose (Young *et al.*, 2012). D'un point de vue chronologique, l'autophagie précède souvent l'apoptose et elle permet de contrôler son induction, tandis que l'apoptose est activée lors d'un stress prolongé dont l'intensité est supérieure à un certain « seuil » (Kroemer *et al.*, 2010) (Figure 23.A). En condition de stress, l'inhibition de l'autophagie, par l'extinction du gène *ATG5*, promeut l'apoptose ce qui confirme le rôle cytoprotecteur de l'autophagie vis-à-vis de l'apoptose (Xu *et al.*, 2013). À l'inverse, l'induction de l'autophagie est exacerbée si l'apoptose est réprimée par l'extinction des gènes codants BAK/BAX, ou par expression d'inhibiteurs de caspases (Shimizu *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004). Ainsi, les interactions entre ces deux voies peuvent être résumées de la manière suivante :

- ① en absence de stress, l'autophagie basale permet le maintien de l'homéostasie cellulaire tandis que l'apoptose est maintenue à un faible niveau ;
- ② lors d'un stress de faible intensité, l'autophagie est induite et active des mécanismes anti-apoptotiques dans le but de permettre la survie de la cellule tout en contrôlant la source de stress : c'est l'autophagie cytoprotectrice. Elle permet d'atténuer les stress cellulaires, par exemple en éliminant, via la mitophagie, des mitochondries endommagées, afin de prévenir l'induction de l'apoptose (Figure 23.B) ;
- ③ si le stress est trop important, les mécanismes pro-apoptotiques s'enclenchent tandis que l'autophagie se voit réprimée, menant à l'élimination de la cellule. Les caspases de l'apoptose sont effectivement capables de cliver des protéines autophagiques avec pour conséquence d'amplifier les signaux de mort (Figure 23.C).

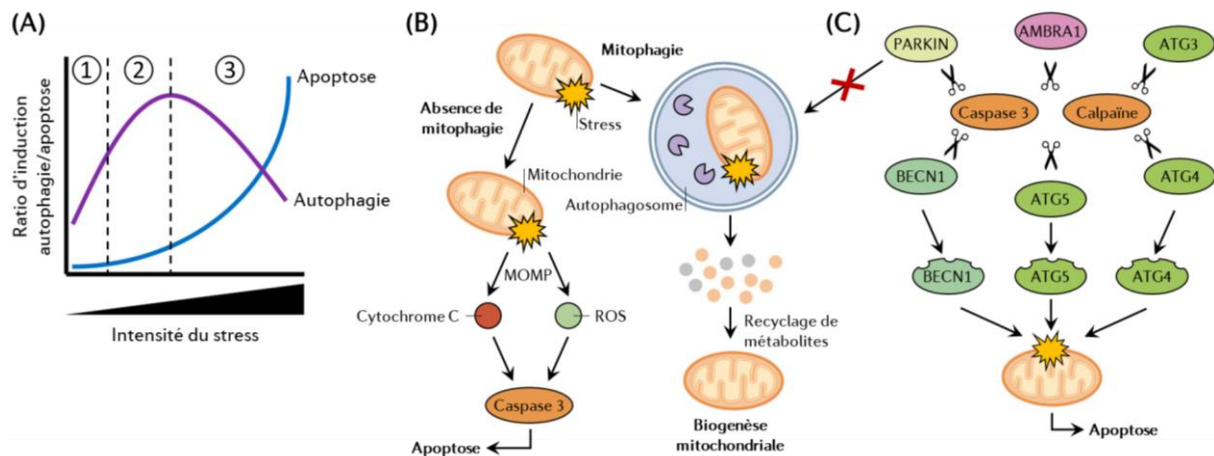


Figure 23 | **Relations générales entre l'autophagie et l'apoptose**

(A) La plupart des stress cellulaires induisent l'autophagie et l'apoptose. ① En condition basale, la cellule présente un faible niveau d'autophagie tandis que l'apoptose est absente. ② Lors d'un stress, les cellules présentant un niveau d'autophagie élevé montrent une relative résistance à l'apoptose, suggérant qu'une importante réponse autophagique prévient son induction. ③ Lorsque le stress est trop important, l'autophagie n'est plus suffisante pour protéger la cellule et la balance s'inverse au profit de l'apoptose. (B) L'autophagie est généralement cytoprotectrice puisqu'elle permet d'éliminer les sources de stress. Par exemple, les dysfonctions mitochondriales conduisent éventuellement à la MOMP, ce qui libère des signaux pro-apoptotiques dans le cytoplasme (entre autres du cytochrome C et des ROSmt). Cependant, la dégradation des mitochondries endommagées par mitophagie permet d'éliminer ces sources de stress, tout en participant à la biogenèse de nouvelles mitochondries par recyclage. (C) Une activation prolongée des effecteurs apoptotiques est délétère pour l'autophagie car de nombreuses protéines autophagiques sont la cible de protéases apoptotiques (caspases et calpaïnes). Le clivage de BECN1, ATG5 et ATG4 induisent des signaux pro-mortalité, tandis que le clivage de PARKIN prévient l'induction de la mitophagie. Adaptée de (Bloemberg & Quadriatero, 2019).

L'une des particularités de l'autophagie tient au fait que ce mécanisme cytoprotecteur peut aussi être impliqué dans la mort cellulaire (Denton & Kumar, 2019). En effet, le rôle de l'autophagie dans la mort peut être défini comme il suit (Figure 24) :

- l'autophagie peut être associée à la mort, c'est-à-dire que l'induction de l'autophagie coïncide avec l'induction de l'apoptose, sans pour autant que l'autophagie ne joue un rôle actif dans la progression de la mort cellulaire ;
- l'autophagie peut médier la mort, c'est-à-dire que la stimulation autophagique entraîne l'induction de l'apoptose ;
- enfin la mort peut être dépendante de l'autophagie, c'est-à-dire qu'elle survient lors d'un stress pro-autophagique et de manière indépendante des processus d'apoptose ou de nécrose. Ce concept de « mort autophagique » fut suggéré pour la première fois après qu'il ait été observé une augmentation de vacuoles autophagiques dans des cellules mourantes (Schweichel & Merker, 1973). Depuis, ce processus fut longtemps controversé et la communauté scientifique appelle à la vigilance quant à l'emploi du terme « mort autophagique » (Klionsky *et al.*, 2021). Aujourd'hui, cette dénomination doit être réservée à un contexte de mort cellulaire, indépendant des autres formes connues, et au cours duquel

l'inhibition moléculaire de l'autophagie corrèle avec une augmentation de la survie cellulaire (Klionsky *et al.*, 2021). À l'heure actuelle la seule mort autophagique répondant à ces critères fut l'autose décrite en 2013 par le laboratoire de Beth Levine (Liu *et al.*, 2013).

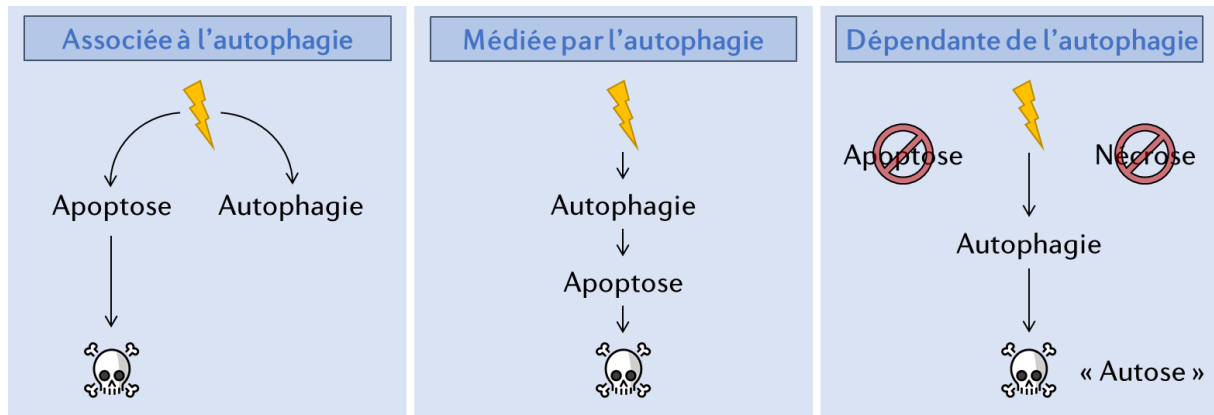


Figure 24 | **Intervention de l'autophagie dans la mort cellulaire**

L'autophagie peut contribuer de multiples façons à la mort cellulaire. En effet, la mort cellulaire peut être associée à l'autophagie lorsqu'au cours d'un stress l'induction de l'autophagie accompagne parallèlement l'induction de l'apoptose. La mort cellulaire peut aussi être médiée par l'autophagie lorsque cette dernière active l'apoptose. Enfin, la mort cellulaire peut également être dépendante de l'autophagie lorsqu'elle survient indépendamment des autres types de mort cellulaire. C'est par exemple le cas de l'autose.

Dans ce paragraphe, nous nous concentrerons sur les acteurs clés partagés entre l'autophagie et l'apoptose, ainsi que sur la manière par laquelle ils communiquent pour influencer ces deux voies cataboliques.

## II. 3. B Les différents niveaux d'interaction entre les deux voies

### II. 3. B. (a) Au niveau des protéines de la famille BCL-2

La famille BCL-2 a constitué le premier point de convergence entre l'autophagie et l'apoptose, lorsqu'il a été montré que l'activité du complexe BECN1 était régulée négativement par les membres anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-X<sub>L</sub> (Maiuri *et al.*, 2007; Pattingre *et al.*, 2005). BCL-2 inhibe aussi l'autophagie en interagissant avec AMBRA1 (Strappazzon *et al.*, 2011). Lorsque l'autophagie est induite, BECN1 et AMBRA1 sont libérées de leur interaction avec BCL-2 ce qui permet d'initier la formation du phagophore. L'interaction inhibitrice exercée sur BECN1 est interrompue par les protéines *BH3-only* qui interagissent avec BCL-2 et BCL-X<sub>L</sub> (Maiuri *et al.*, 2007; Pattingre *et al.*, 2005). En revanche, le mécanisme de dissociation entre AMBRA1 et BCL-2 n'est pas connu. Les récepteurs de la mitophagie BNIP3 et NIX agissent de manière semblable en interrompant l'interaction entre BECN1 et BCL-2 (Bellot *et al.*, 2009). Notons que l'expression des protéines *BH3-only* est régulée par des signaux de mort ou des stress cellulaires (Galluzzi *et al.*, 2018), tandis que l'expression de BNIP3 et NIX

est induite par un stress hypoxique (Bellot *et al.*, 2009). Ainsi, le modèle de régulation suivant peut être établi :

- en absence de stress, BCL-2 et BCL-X<sub>L</sub> interagissent avec BECN1, se traduisant par une inhibition de l'autophagie ;
- lors d'un stress cellulaire l'expression des protéines *BH3-only* est induite et l'activité de JNK permettent de lever l'inhibition sur l'autophagie ;
- lors d'un stress prolongé, la balance entre l'activité des protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques penche en faveur de ces dernières conduisant à l'activation de BAX et BAK et à l'apoptose.

### II. 3. B. (b) À la suite d'un stress cellulaire

Lors d'un stress, des processus pro-survie et pro-mort sont activés et le devenir de la cellule va dépendre des interactions entre ces processus. La carence nutritive est largement connue pour sa capacité à stimuler l'autophagie (Klionsky *et al.*, 2021). En effet, la carence nutritive induit la phosphorylation de BCL-2 par JNK (*Jun N-terminal Kinase*), restreignant son activité anti-autophagique (Wei *et al.*, 2008). Cependant, une exposition prolongée à un tel stress conduit à de la mortalité. Des études démontrent en effet qu'en condition de carence nutritive, l'inhibition de l'autophagie (génétique ou pharmacologique) induit de la mort cellulaire par apoptose (Boya *et al.*, 2005), notamment par l'augmentation de l'activité de la caspase 3 (Bloemberg & Quadriatero, 2019). Les récepteurs à facteur de croissance sont également impliqués dans la communication autophagie/apoptose. Dans des cellules résistantes à l'apoptose (double extinction des gènes *BAK* et *BAX*), l'autophagie assure la survie cellulaire à la suite d'une privation prolongée en facteur de croissance, via le catabolisme de constituants intracellulaires (Lum *et al.*, 2005).

### II. 3. B. (c) Au niveau de la mitophagie

L'un des principaux mécanismes par lequel l'autophagie permet de réprimer l'entrée en apoptose est la mitophagie (Youle & Narendra, 2011). Les dommages mitochondriaux induisent l'apoptose (Galluzzi *et al.*, 2018). Par conséquent, l'élimination de mitochondries endommagées, par autophagie, permet d'éliminer une source de stress et donc de rehausser le « seuil » de déclenchement de l'apoptose (Figure 23.B). En effet, la mitophagie prévient la production de ROSmt, la libération de cytochrome C ou encore l'activation des caspases (Yang *et al.*, 2010). En revanche, si le nombre de mitochondries endommagées excède la capacité de mitophagie de la cellule, ou si la mitophagie est réprimée, la cellule entrera en apoptose pour minimiser les dégâts au niveau de l'organisme entier (Kubli & Gustafsson, 2012). Il a par exemple été montré qu'un défaut de mitophagie accroît l'apoptose dans

des cellules neuronales (MacCormac *et al.*, 2004). Plus récemment, une étude a démontré que VDAC1 régule à la fois la mitophagie et l'apoptose suivant son niveau d'ubiquitylation (Ham *et al.*, 2020). En effet, la poly-ubiquitylation de VDAC1 par PINK1 (*PTEN-Induced putative Kinase 1*) promeut la mitophagie dépendante de PARKIN, tandis que la mono-ubiquitylation de VDAC1 inhibe l'apoptose. Les auteurs suggèrent que lors de dommages mitochondriaux, l'ubiquitylation de VDAC1 serait augmentée pour induire la mitophagie et protéger la cellule de l'apoptose (Ham *et al.*, 2020). Ces résultats suggèrent ainsi le rôle préventif de la mitophagie sur l'induction de l'apoptose.

### II. 3. B. (d) Via le suppresseur de tumeur p53

Le suppresseur de tumeur p53 est un médiateur essentiel des voies de réponse aux stress et l'inactivation de son gène conduit au développement de nombreux cancers. Il s'agit d'un facteur de transcription qui, à l'état basal, est présent dans le cytoplasme et à la suite d'un stress, tel qu'un dommage à l'ADN, est retrouvé dans le noyau. Le pool nucléaire de p53 se fixe sur les promoteurs de plusieurs gènes permettant la régulation, entre autres, du cycle cellulaire, de l'autophagie et/ou de l'apoptose (Riley *et al.*, 2008). Des études montrent que le pool cytoplasmique de p53 inhibe l'autophagie en bloquant le complexe d'initiation ULK1/2, tandis que le pool nucléaire restaure l'autophagie (Tasdemir *et al.*, 2008). La protéine p53 peut agir sur les différentes voies de l'apoptose de manière variée (Aubrey *et al.*, 2018). Elle peut stimuler l'expression de protéines pro-apoptotiques (BAX, PUMA, NOXA, APAF-1) et réprimer l'expression de protéines anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>), induire l'expression de récepteurs de mort (FASR) ou encore interagir avec des protéines anti-apoptotiques (BCL-2 et BCL-X<sub>L</sub>) (Aubrey *et al.*, 2018). Lors d'un stress, une partie du pool cytosolique de p53 peut atteindre la matrice mitochondriale. À cet endroit p53 interagit avec la cyclophiline D, ce qui induit la formation de pores stimulant, suivant l'intensité du dommage mitochondrial, soit la mitophagie, soit l'apoptose (Mariño *et al.*, 2014).

### II. 3. B. (e) Via les enzymes de l'apoptose

Les caspases apoptotiques clivent une multitude de substrats pouvant impacter d'autres voies que l'apoptose. En effet, l'induction de l'apoptose dépendante des caspases se fait parfois au détriment de l'autophagie. Par exemple, lors de l'apoptose induite par BAX, la caspase 3 clive BECN1 conduisant à inhiber l'autophagie (Luo & Rubinsztein, 2010). Cette inhibition pourrait même potentialiser l'induction de l'apoptose (Figure 23.C) puisque le fragment C-terminal, issu du clivage de BECN1, se localise dans les mitochondries et cause la MOMP (Luo & Rubinsztein, 2010; Wirawan *et al.*, 2010). D'autres protéines autophagiques, telles qu'AMBRA1 et ATG3, peuvent être clivées par les caspases et calpaïnes, avec pour effet d'inhiber le processus autophagique (Oral *et al.*, 2012; Pagliarini *et al.*, 2012).

À l'inverse, la caspase 9, qui est impliquée dans la formation de l'apoptosome, possède une activité pro-autophagique, en augmentant la lipidation de LC3 via son interaction avec ATG7 (Han *et al.*, 2014). Cette interaction permet également de restreindre l'activité pro-apoptotique de la caspase 9. Comme indiqué précédemment, la mitophagie est un mécanisme protecteur vis-à-vis de l'apoptose. Cependant, lors d'un stress apoptotique, les caspases 1 et 8 clivent et inactivent PARKIN, une protéine majeure de la mitophagie, bloquant ce processus et induisant des dommages cellulaires (Kahns *et al.*, 2003). ATG5 est aussi impliquée dans l'apoptose. En effet, l'exposition à un stimulus pro-apoptotique entraîne le clivage d'ATG5 par la calpaïne, puis sa relocalisation mitochondriale où elle interagit avec BCL-X<sub>L</sub> permettant d'induire la voie intrinsèque de l'apoptose (Yousefi *et al.*, 2006). L'activité des caspases n'induit donc pas uniquement l'apoptose, elles peuvent aussi entraver ou renforcer l'autophagie en interagissant et/ou clivant des protéines autophagiques.

### II. 3. C Conséquences sur les cancers et leurs traitements

Au travers de ces paragraphes, on peut s'apercevoir que la régulation, ainsi que les interactions, entre l'autophagie et l'apoptose gouvernent le devenir cellulaire. De plus, une meilleure compréhension de ces interactions contribuerait à la recherche de traitements contre les cancers (Tompkins & Thorburn, 2019). La thérapie anti-cancéreuse a pour objectif principal d'éliminer les cellules tumorales tout en minimisant l'impact sur les cellules saines, et pour cela l'une des stratégies consiste à resensibiliser les cellules cancéreuses à la mort. Cependant, ces cellules présentent des niveaux de réponse variables aux stimuli apoptotiques, ce qui conditionne la réussite ou non du traitement. Nous avons vu le rôle cytoprotecteur de l'autophagie et que les interactions entre l'apoptose et l'autophagie étaient en mesure de faire varier ce « seuil ». En effet, l'inhibition de l'autophagie rend les cellules cancéreuses plus susceptibles aux traitements dans la mesure où la cytoprotection vis-à-vis de l'apoptose est altérée (Tompkins & Thorburn, 2019). Le phénomène inverse se vérifie puisqu'il est clairement établi qu'augmenter le niveau d'autophagie améliore la survie des cancers préétablis et contribue à leur résistance aux traitements (White, 2012). En conséquence, cibler l'autophagie constitue aujourd'hui une stratégie de traitement pour différents types de cancers. De nombreux essais cliniques utilisant cette stratégie sont actuellement en cours (Chude & Amaravadi, 2017; Mulcahy Levy & Thorburn, 2020).

Cependant, des interrogations subsistent sur ces stratégies thérapeutiques dans la mesure où des études suggèrent que l'inhibition de l'autophagie des lymphocytes T pourrait en retour réduire la réponse anti-tumorale de ces cellules (Jiang *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2013). De nombreuses molécules inhibitrices de l'autophagie existent et leurs mécanismes d'action sont à considérer quant au choix du type de molécules à utiliser. En effet, les structures autophagosomales servent de plateforme à

l'induction de l'apoptose et de la nécroptose (Basit *et al.*, 2013; Young *et al.*, 2012). Donc, sous certaines conditions, la présence d'autophagosomes est nécessaire pour induire la mort cellulaire. Ainsi, à l'heure actuelle, les inhibiteurs de la maturation des autophagosomes sont privilégiés (comme la chloroquine ou l'hydroxychloroquine) plutôt que ceux qui bloquent leur formation. De plus, la sécurité quant à l'utilisation de la chloroquine ou de l'hydroxychloroquine, au cours d'une thérapie anti-cancéreuse, a été démontrée lors d'essais cliniques (Chude & Amaravadi, 2017). Depuis très récemment, les scientifiques se penchent également sur l'intérêt d'une thérapie combinant à la fois des inhibiteurs et des inducteurs autophagiques (Liu *et al.*, 2020).

### III BHRF1, un homologue viral de BCL2

#### III. 1 Les orthologues de BCL-2 chez les *Herpesviridae*

Chez un organisme pluricellulaire, l'apoptose constitue un mécanisme de défense intrinsèque envers les pathogènes intracellulaires, en entraînant la mort d'une cellule au profit de l'organisme entier. En conséquence, les virus ont évolué de manière à inhiber l'apoptose afin d'assurer leur réplication et leur dissémination, tout en contournant l'immunité innée (Neumann *et al.*, 2015). Cette capacité des virus à moduler certaines fonctions cellulaires s'explique notamment par l'expression de protéines mimétiques. Plus particulièrement, certains virus à ADN expriment des orthologues de BCL-2 (vBCL-2) afin de bloquer l'apoptose (Kvansakul *et al.*, 2017). C'est en particulier le cas des *Herpesviridae* humain. Par exemple, HCMV exprime la protéine vMIA (*viral Mitochondrion-localized Inhibitor of Apoptosis*). Ce vBCL-2 inhibe la perméabilisation mitochondriale dépendante de BAX/BAK, et donc l'induction de l'apoptose (Norris & Youle, 2008) (Figure 22). Parmi les *Gammaherpesvirinae*, KSHV exprime la protéine Ks-BCL-2 qui se fixe à de nombreuses protéines pro-apoptotiques à multi-domaines afin d'inhiber l'apoptose (Flanagan & Letai, 2008; Sarid *et al.*, 1997) (Figure 22). Concernant l'EBV, il code au total pour 3 protéines orthologues de BCL-2 (vBCL-2), appelées BHRF1, BALF0 et BALF1 (Cleary *et al.*, 1986; Khanim *et al.*, 1997; Marshall *et al.*, 1999). Initialement, l'ORF correspondant à *BALF0/1* était connue pour coder pour une protéine unique, mais une récente étude a montré que ce gène permet à deux protéines distinctes, BALF0 et BALF1, de s'exprimer lors de la phase précoce du cycle productif (Shao *et al.*, 2019). Les vBCL-2 de l'EBV possèdent des propriétés anti-apoptotiques (Altmann & Hammerschmidt, 2005; Henderson *et al.*, 1993; Marshall *et al.*, 1999). Néanmoins, l'activité anti-apoptotique de BALF0/1 reste controversée puisqu'une étude ne parvient pas à retrouver cet effet et montre même que BALF0/1 inhiberait l'activité anti-apoptotique de BHRF1 (Bellows *et al.*, 2002) (Figure 22).

#### III. 2 Structure génomique et protéique de BHRF1

Le gène *BHRF1* est localisé dans le fragment « H » obtenu après la digestion du génome de l'EBV par l'enzyme de restriction *Bam*HI. Ce gène de 1,8 kpb comprend la phase codante de la protéine BHRF1 (ORF), flanquée de trois séquences correspondantes à des miRs (Figure 25.A). Selon l'étape du cycle viral, la transcription du gène sera initiée à partir de l'un des trois promoteurs : Cp, Wp ou BHRF1p (Austin *et al.*, 1988). Le miR-*BHRF1-1* est localisé dans la région 5' UTR (*UnTranslated Region*) de l'ARN et chevauche la boîte TATA du BHRF1p, tandis que les miRs-*BHRF1-2* et -3 sont localisés dans la région



3' UTR (Pfeffer *et al.*, 2004). Après transcription, les ARN seront épissés afin d'éliminer l'intron, présent en amont de l'ORF, qui bloque la traduction en protéine (Figure 25.B).

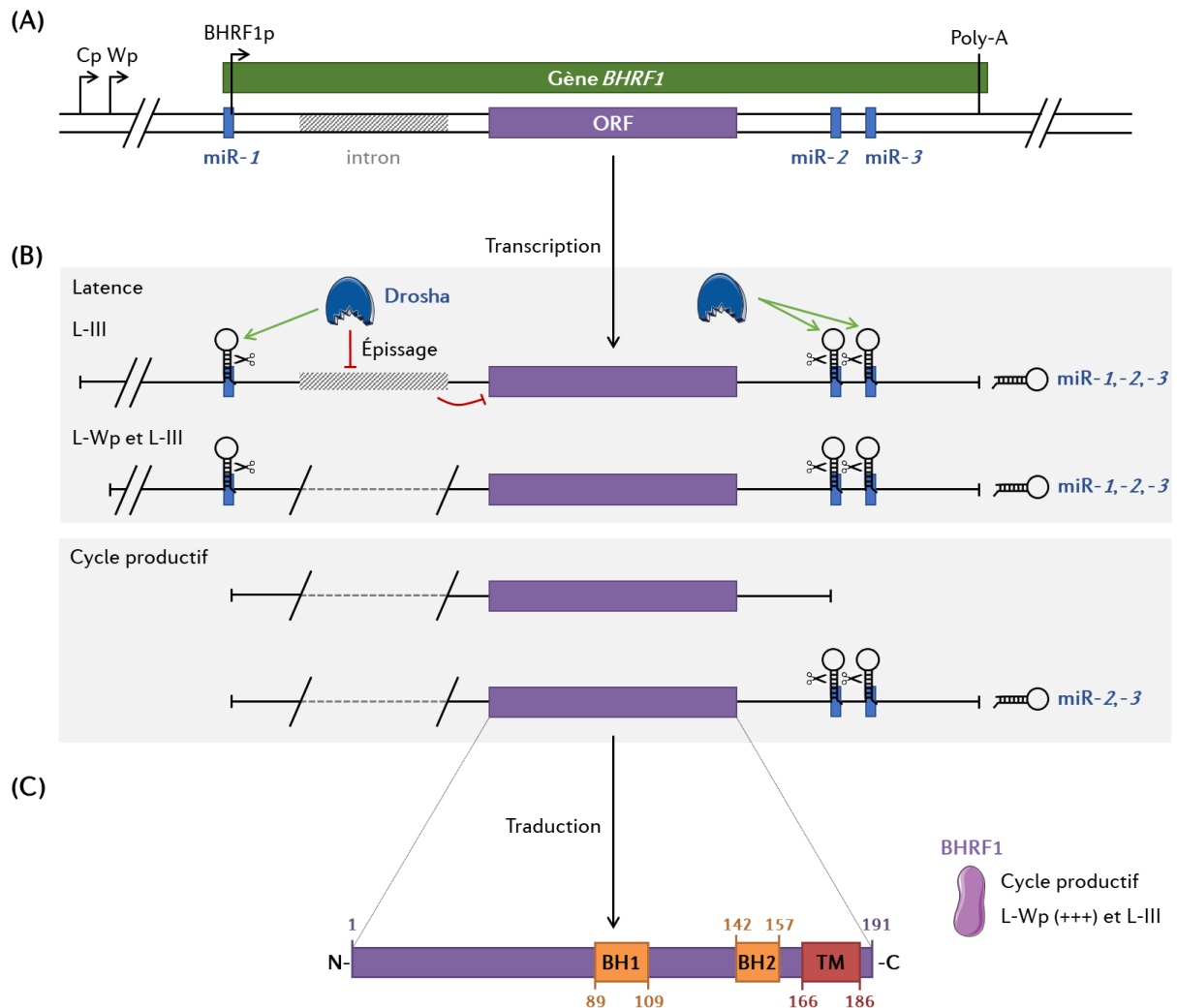


Figure 25 | Organisation génomique de *BHRF1* et son expression

**(A)** Organisation du locus porteur du gène *BHRF1*. Le gène comprend l'ORF ainsi que 3 séquences de miR (miR-*BHRF1*-1, -2 et -3). Un intron est présent en amont de l'ORF. Les promoteurs, associés à la latence, Cp (L-III) et Wp (L-III et L-Wp) sont représentés. Le promoteur de *BHRF1* lors du cycle productif (BHRF1p) se localise dans la séquence du miR-1. **(B)** En phase de latence la transcription débute au niveau des promoteurs Cp ou Wp. Le complexe Droscha assure le clivage et la maturation des miRs. En L-III, Droscha inhibe l'épissage de certains transcrits bloquant la traduction de l'ORF. En L-Wp (et plus rarement en L-III), l'ARNm est épissé et l'ORF traduite. Au cours du cycle productif, la transcription débute à partir du promoteur BHRF1p. Cette transcription donne deux types de transcrits épissés : un transcrit long, qui permet la production des miRs-2 et -3, ainsi qu'un transcrit plus court, issu des clivages de Droscha. Ces transcrits permettent la synthèse de BHRF1 après traduction. **(C)** Structure de BHRF1, une protéine de 191 acides aminés qui possède un domaine transmembranaire ainsi que deux domaines d'homologies à BCL-2 (BH1 et BH2).

BHRF1 est une protéine de 191 acides aminés. L'analyse de sa séquence protéique a dévoilé la présence de deux domaines BH (BH1 et BH2 - Figure 25.C), qui permettent de classer BHRF1 parmi les orthologues de BCL-2. BHRF1 et BCL-2 présentent en effet 38 % d'homologie de séquence (Hickish *et al.*, 1994). BHRF1 possède aussi à l'extrémité C-terminale un domaine transmembranaire et plusieurs

études ont montré que BHRF1 était présente dans les mitochondries (Bellows *et al.*, 2002; Hickish *et al.*, 1994) (Figure 26). Au laboratoire, nous avons également observé une localisation de BHRF1 au niveau du RE et de la membrane nucléaire, qui est en continuité avec le RE. La localisation subcellulaire de BHRF1 est donc semblable à celle de BCL-2, ce qui est confirmé par la colocalisation des deux protéines observée par microscopie confocale (Henderson *et al.*, 1993). Ceci suggère une homologie fonctionnelle.

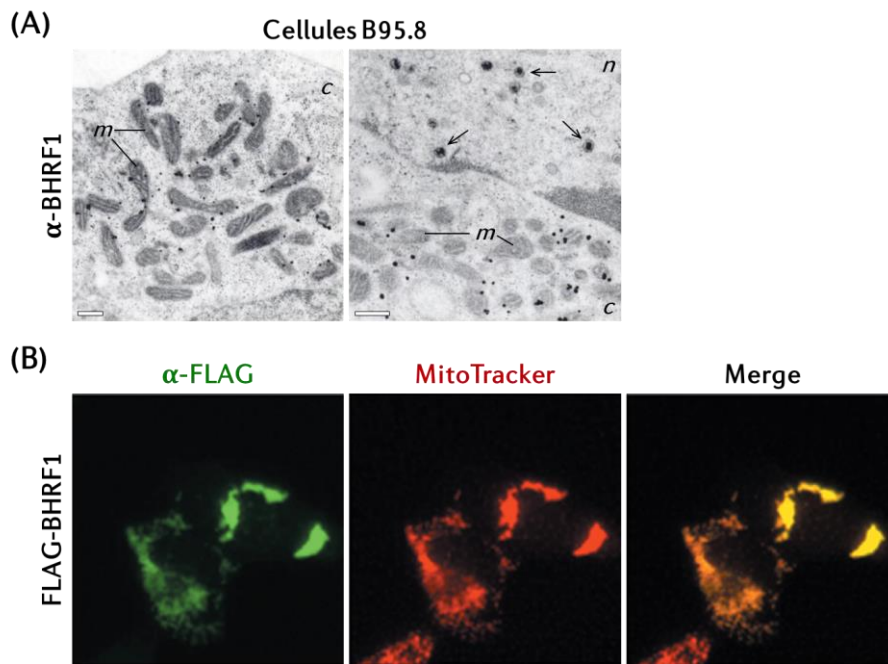


Figure 26 | Localisation mitochondriale de BHRF1

(A) Photos de microscopie électronique à transmission sur des cellules de la lignée de marmouset B95.8 et marquées pour BHRF1 (immunogold). Sur la photo de gauche, on observe dans le cytoplasme (c) des billes d'or localisées à proximité d'un groupe de mitochondries (m). Sur la photo de droite, on peut également voir des mitochondries positives pour BHRF1. De plus, des particules virales (flèches) sont observables dans le noyau (n), confirmant que BHRF1 s'exprime lors du cycle productif. L'échelle des images est de 0,25  $\mu\text{m}$ . Les billes d'or colocalisent à 60 % avec la périphérie mitochondriale. Adaptée de (Hickish *et al.*, 1994) (B) Des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*) ont été transfectées pour 24 h avec un plasmide codant pour FLAG-BHRF1. Les cellules sont ensuite traitées par du MitoTracker CMXRos, puis immunomarquées avec un anticorps anti-FLAG. La superposition des images (merge) montre la colocalisation de BHRF1 avec les mitochondries. Adaptée de (Bellows *et al.*, 2002).

### III. 3 Expression de BHRF1

Initialement, BHRF1 a été associée aux étapes précoces du cycle productif de l'EBV (Pearson *et al.*, 1987), avec pour fonction de favoriser la survie de l'hôte et améliorer la réplication virale. Lors de la primo-infection de lymphocytes B par la souche virale B95.8, les ARNm *BHRF1* sont détectés vingt-quatre heures post-infection (Altmann & Hammerschmidt, 2005). L'expression protéique est également retrouvée trois à six heures post-induction, après réactivation du virus à partir de

lymphocytes B en L-I (Lu *et al.*, 2006). Enfin, BHRF1 est détectée dans des cellules infectées par un virus défectif qui ne peut pas se réactiver démontrant que BHRF1 s'exprime aussi durant la latence (Kelly *et al.*, 2009).

Effectivement, BHRF1 s'exprime au cours de certains programmes de latence tels que la L-III et la L-Wp (Fitzsimmons & Kelly, 2017). Cependant, en L-III le gène ne s'exprimerait qu'au niveau transcriptionnel. En effet, une étude montre l'absence d'expression protéique dans des cellules EBV<sup>+</sup> en L-III dans lesquelles seuls des transcrits non-épissés de *BHRF1* sont détectés (Xing & Kieff, 2007). Ces transcrits présentent en effet un intron en amont de l'ORF qui inhibe la traduction de BHRF1 au cours de cette latence (Figures 25.A et B). En revanche, après réactivation du virus dans ces cellules les auteurs détectent des transcrits de *BHRF1* épissés et polyadénylés ainsi que l'expression protéique (Xing & Kieff, 2007). Bien que la synthèse de BHRF1 soit bloquée au cours de la L-III, la maturation des miRs-*BHRF1*, médiée par le complexe Drosha, est toujours observée (Xing & Kieff, 2011). Certaines études rapportent en revanche la synthèse à bas niveau de BHRF1 dans des LCLs en L-III (Kelly *et al.*, 2009; Tierney *et al.*, 2015), qui serait la conséquence de l'activité résiduelle du promoteur Wp (Figure 9). Concernant la L-Wp, les transcrits *BHRF1* épissés sont abondamment exprimés et l'expression protéique a été clairement observée (Kelly *et al.*, 2009). De plus, la présence d'une réponse immunitaire à lymphocytes T cytotoxiques, dirigés contre BHRF1, confirme la synthèse de BHRF1 sous cette latence (Kelly *et al.*, 2009). En conclusion, BHRF1 est exprimée lors de la primo-infection, au cours de la réactivation et pendant la latence, faiblement au cours de la L-III et fortement lors de la L-Wp (Amoroso *et al.*, 2011).

En conséquent, la protéine BHRF1 est exprimée dans divers cancers associés à l'EBV, tels que les LB endémiques et plus précisément dans les 15 % de ces lymphomes issus d'une L-Wp (Fitzsimmons & Kelly, 2017). Au cours des CNP, des anticorps anti-BHRF1 sont détectés dans le sérum de 60 % des patients (Liu *et al.*, 1998). Cependant, la détection de ces anticorps est certainement consécutive à la synthèse protéique de BHRF1 lors de l'infection productive de l'EBV dans les cellules épithéliales, car les CNP présentent une L-II au cours de laquelle l'expression de BHRF1 n'est pas documentée. Une seule étude rapporte l'expression de BHRF1 dans un cas de lymphome T/NK extraganglionnaire particulièrement agressif (Xu *et al.*, 2001).

L'expression de BHRF1 est régulée positivement par les miRs-*BHRF1*. En effet, l'infection de lymphocytes B par un virus dépourvu des trois miRs-*BHRF1* entraîne un défaut d'expression de BHRF1, associé à une sensibilité accrue à l'apoptose (Bernhardt *et al.*, 2016).

### III. 4 Fonctions connues et putatives de BHRF1

#### III. 4. A BHRF1 est une protéine anti-apoptotique

BHRF1 est connue depuis de nombreuses années pour sa capacité à bloquer l'apoptose dans divers modèles cellulaires. Cette capacité fut initialement décrite dans des lymphocytes B dérivés de LB, dans lesquels la transfection de BHRF1 prévient l'apoptose induite par un traitement à l'ionomycine (Henderson *et al.*, 1993). Cette protection vis-à-vis de l'apoptose fut par la suite confirmée après une exposition à divers inducteurs de la voie intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. En effet, BHRF1 inhibe l'apoptose induite par des molécules causant des dommages à l'ADN, par l'infection par le virus Sindbis, par des irradiations ou encore par des traitements anti-cancéreux (Cheng *et al.*, 1997; Foghsgaard & Jäättelä, 1997; McCarthy *et al.*, 1996; Tarodi *et al.*, 1994). L'activité anti-apoptotique de BHRF1 permet également au virus de contourner l'immunité cellulaire (Williams *et al.*, 2016). En effet, lors de la réactivation, l'expression de ZEBRA stimule l'activité cytotoxique des lymphocytes NK. Cependant, à cette étape, l'expression conjointe de BHRF1 permet de prévenir la mort des cellules EBV<sup>+</sup> en bloquant l'apoptose induite par les enzymes relarguées lors de la dégranulation des lymphocytes NK (Williams *et al.*, 2016).

L'analyse par spectrométrie de masse de la structure de BHRF1 montre des similitudes avec BCL-2, néanmoins une différence majeure s'observe avec l'absence du sillon hydrophobe nécessaire à la liaison aux protéines pro-apoptotiques (Huang *et al.*, 2003). Malgré tout, BHRF1 est capable de se lier à des protéines pro-apoptotiques comme l'a montré une étude postérieure (Desbien *et al.*, 2009). En effet, après cristallisation de BHRF1 il a été montré qu'elle possède des hélices  $\alpha$ 2-5 lui offrant une surface hydrophobe nécessaire à la fixation aux domaines BH3 des protéines BIM, BID, PUMA et BAK (Kvansakul *et al.*, 2010) (Figures 27.A et B). Les premières études mécanistiques tendaient à attribuer l'activité anti-apoptotique de BHRF1 uniquement à sa liaison avec BIM (Desbien *et al.*, 2009; Flanagan & Letai, 2008). Cependant, il a été montré récemment que l'activité de BHRF1 était conservée dans des cellules humaines déficientes pour BIM (Fitzsimmons *et al.*, 2020). L'activité est également conservée en absence d'autres partenaires de BHRF1, démontrant que l'inhibition de l'apoptose par BHRF1 peut se faire via la séquestration de différentes protéines pro-apoptotiques (Fitzsimmons *et al.*, 2020). Ce mécanisme est similaire à celui de BCL-2, malgré une organisation structurale de BHRF1 légèrement différente, qui au final est plus proche de celle de BCL-X<sub>L</sub> (Figure 27.C). Afin de bloquer l'apoptose, il a été montré que BHRF1 peut également se lier à VRK2 (*human Vaccinia virus B1R Kinase-related kinase 2*) (Li *et al.*, 2006). À l'inverse, certaines protéines cellulaires interagissent avec BHRF1 pour bloquer son activité anti-apoptotique, ce qui est le cas de hPRA1 (human Prenylated Rab Acceptor 1) (Li *et al.*, 2001).

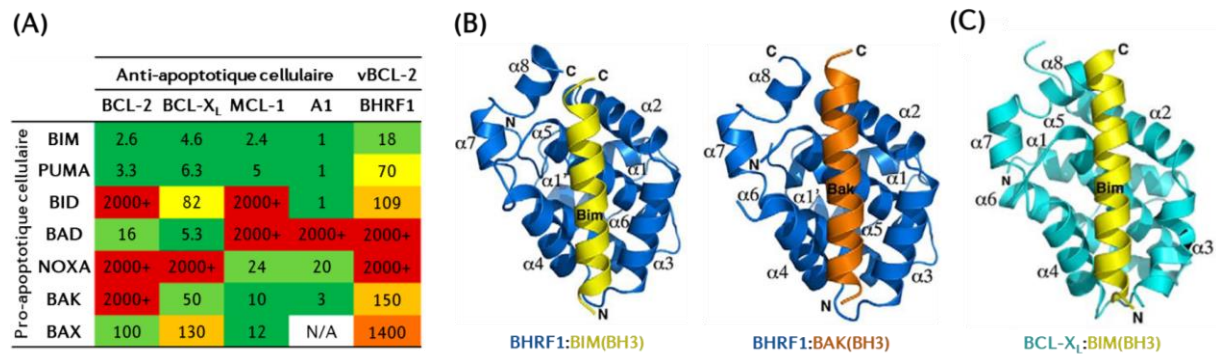


Figure 27 | Fixation de BHRF1 aux membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2

(A) Affinité des interactions entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille BCL-2 exprimée par la valeur de  $K_d$  en nM. L'affinité d'interaction de BHRF1 avec les membres pro-apoptotique est également indiquée. Le code couleur a été défini comme suit : vert 1-10 nM, vert clair 11-50 nM, jaune 51-100 nM, orange clair 101-1000 nM, orange foncé 1001-2000 nM, rouge 2000-100 000 nM. (B) Représentations structurales de la fixation de BHRF1 (bleu) aux domaines BH3 de BIM (jaune) et BAK (orange). (C) Représentation structurale de la fixation de BCL-XL (cyan) au domaine BH3 de BIM (jaune), montrant des interactions similaires à celles observées pour BHRF1 au niveau de ses hélices  $\alpha 2-5$ . Adaptée de (Fitzsimmons & Kelly, 2017) et (Kvansakul *et al.*, 2010).

### III. 4. B Impact de BHRF1 sur l'autophagie/mitophagie

Les protéines de la famille BCL-2 sont connues pour moduler l'autophagie. Les trois vBCL-2 de l'EBV peuvent également impacter ce processus cellulaire. Il a récemment été démontré que BALF0 et BALF1 stimulent l'autophagie (Shao *et al.*, 2019). Concernant BHRF1, des données au laboratoire démontrent également une activité pro-autophagique, notion qui sera développée plus en détail dans la partie résultats de ce manuscrit (§ V). De plus, l'examen des photos de microscopie de l'étude de Hickish *et al.*, montrant la colocalisation de BHRF1 avec les mitochondries (Figure 26) permet d'observer une altération du réseau mitochondrial. Bien que les auteurs ne l'aient pas commenté, les mitochondries forment des agrégats, possiblement dans la région périnucléaire, qui pourraient être pris en charge par autophagie sélective comme il fut précédemment décrit (Geisler *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Strappazzon *et al.*, 2015). Ces résultats suggéraient donc que BHRF1 pouvait induire la mitophagie, ce qui sera décrit précisément dans la partie relative aux résultats (§ V).

### III. 4. C BHRF1, survie cellulaire et tumorigenèse

Au cours de la primo-infection, l'expression rapide de BHRF1 et BALF1 permet de prévenir la mort par apoptose des cellules infectées et, de fait, facilite l'entrée du virus en latence (Altmann & Hammerschmidt, 2005). L'expression de ces deux vBCL-2 est également importante pour la transformation cellulaire (Altmann & Hammerschmidt, 2005). En effet, l'infection de lymphocytes B par un virus n'exprimant pas BHRF1 ou BALF1 est capable d'induire la transformation cellulaire, comme un virus sauvage, ce qui n'est pas le cas du virus double mutant, suggérant le rôle redondant de ces protéines dans le processus (Altmann & Hammerschmidt, 2005). Dans un modèle de cellules dérivées

de LB où l'EBV est en L-Wp, il fut suggéré dès 2007 puis démontré par la suite que BHRF1 est essentielle à la survie de ces cellules (Leao *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2010). Au cours de ce type de latence virale, BHRF1 jouerait même un rôle dans la lymphomagenèse (Kelly *et al.*, 2009) et dans la résistance à la mort des cellules de LB. En effet, la chimiorésistance a été attribuée à l'expression de BHRF1 qui bloque différentes protéines pro-apoptotiques (Fitzsimmons *et al.*, 2020). De plus, les auteurs de cette dernière étude ont montré que BHRF1 accélère la lymphomagenèse dans un modèle de LB murin, confirmant les résultats de Kelly *et al.* (Fitzsimmons *et al.*, 2020). Une autre étude suggère aussi l'implication de BHRF1 dans la tumorigenèse des CNP (Song *et al.*, 2020). Elle serait due à la localisation mitochondriale de BHRF1 qui induirait la perméabilité de l'organite et la libération de ROSmt (Song *et al.*, 2020). L'ensemble de ces données suggère que BHRF1 pourrait constituer une cible thérapeutique dans le traitement des cancers liés à l'EBV et plus particulièrement pour les LB agressifs. L'intérêt de cette approche a été démontré par la mise au point *in silico* d'un peptide antagoniste, BINDI (*BHRF1-INhibiting Design acting Intracellularly*), ciblant spécifiquement BHRF1 (Procko *et al.*, 2014). BINDI se lie avec une très grande affinité à BHRF1 et sensibilise des cellules de LB à l'apoptose. Son administration ciblée grâce à des micelles recouvertes d'anticorps permet de supprimer la progression tumorale et d'améliorer la survie des animaux dans un modèle de xénogreffe de LB humain chez la souris (Procko *et al.*, 2014).

## IV Les mitochondries, des organites dynamiques de l'immunité antivirale

### IV. 1 Généralités sur les mitochondries

#### IV. 1. A Fonctions et structure des mitochondries

Les mitochondries sont des organites accomplissant de nombreuses fonctions essentielles à la cellule. Elles participent à des processus métaboliques tels que la production d'énergie, la biosynthèse et transport des phospholipides, la signalisation calcique ou encore l'homéostasie du fer (Spinelli & Haigis, 2018). Elles agissent également en tant que plateforme de signalisation leur permettant d'influencer le devenir de la cellule en régulant l'apoptose (Wang & Youle, 2009) et, comme nous le verrons dans la suite de ce manuscrit (§ IV. 2), en participant à l'immunité innée (West *et al.*, 2011).

Ce rôle bivalent, d'usine cellulaire et de plateforme de signalisation, s'explique par l'organisation structurale des mitochondries. En effet, ce sont des organites à double membrane, qui contiennent une membrane interne (MMI) et une membrane externe (MME). La MMI délimite la matrice, qui présente des crêtes permettant d'augmenter la surface d'échange et porte la machinerie impliquée dans la respiration. À l'inverse, la MME est perméable et comporte à sa surface de nombreuses protéines transmembranaires, offrant à la cellule une surface d'échange complexe. De plus, la MME interagit avec de nombreuses membranes provenant de divers organites comme le RE, les peroxysomes ou encore les lysosomes. Ces zones de contact sont de plus en plus étudiées, notamment celles avec le RE, qui constituent les MAMs (*Mitochondria-Associated Membranes*) (Missiroli *et al.*, 2018).

#### IV. 1. B La dynamique mitochondriale

Les fonctions mitochondriales sont intimement liées à la morphologie et l'organisation qu'adoptent les mitochondries les unes par rapport aux autres. Dans le cytoplasme les mitochondries peuvent parfois se trouver isolées, mais plus généralement elles forment un réseau. De plus, leur distribution varie en raison de leur capacité à se mouvoir vers des régions où la demande énergétique est importante (Collins *et al.*, 2002). Cette plasticité du réseau mitochondrial est regroupée sous la notion de dynamique mitochondriale (Giacomello *et al.*, 2020), qui englobe les mécanismes de fusion et de fission (Figure 28).

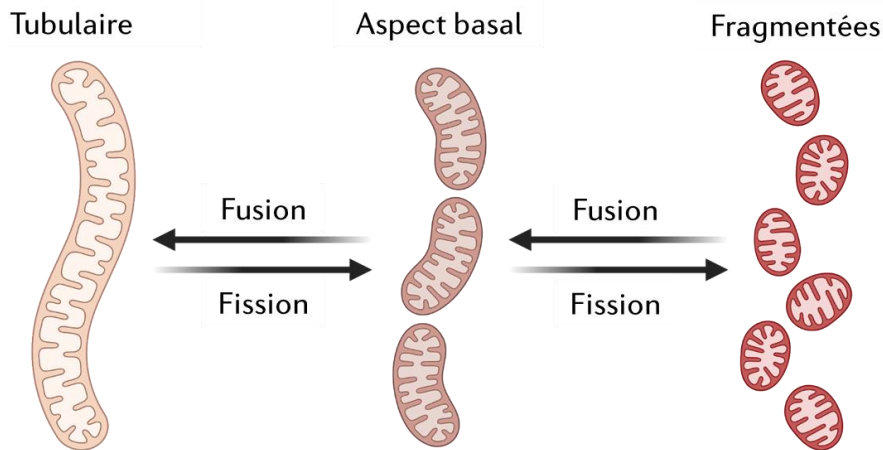


Figure 28 | **Balance entre fusion et fission mitochondriale**

Le réseau mitochondrial est une structure dynamique placée sous la dépendance des processus de fusion et de fission. La balance entre ces deux processus permet de réguler la longueur et le nombre de mitochondries dans le cytoplasme. La fusion accroît la longueur des mitochondries et diminue leur nombre, tandis qu'à l'inverse la fission démultiplie le nombre de mitochondries mais diminue leur taille. *Created with BioRender.com.*

#### IV. 1. B. (a) La fusion mitochondriale

La fusion mitochondriale contribue à l'élongation du réseau et intervient pour faciliter les échanges entre mitochondries (métabolites, protéines membranaires ou encore ADNmt [ADN mitochondrial]). Ce processus est régulé par les protéines MFN1 (MitoFusiNe 1) et OPA1 (*OPTic Atrophy type 1*). Une MFN2 existe, mais son rôle dans la fusion n'est pas clairement établi puisqu'elle serait plutôt impliquée dans les contacts mitochondriaux, notamment au niveau des MAMs (De Brito & Scorrano, 2008). Le mécanisme de fusion se décompose en deux étapes : tout d'abord la fusion des MME suivie de la fusion des MMI (Figure 29.A). Pour parvenir à fusionner, les mitochondries se rapprochent grâce à l'interaction de leurs MFN1 respectives (Qi *et al.*, 2016). MFN1 est une GTPase et sa liaison au GTP (Guanosine Tri-Phosphate) induit une modification conformationnelle permettant la fusion des MME (Cao *et al.*, 2017). OPA1 est une protéine résidente de la MMI se présentant sous deux formes : les formes longues (l-OPA1), immatures, interagissent entre-elles et permettent de rapprocher les MMI ; tandis que les formes courtes (s-OPA1), issues d'un clivage protéolytique, favorisent la fusion des MMI (Ge *et al.*, 2020).

#### IV. 1. B. (b) La fission mitochondriale

La fission intervient lors de dommages mitochondriaux, en permettant de séparer, tout ou partie d'une mitochondrie endommagée du pool de mitochondries saines. L'effecteur permettant la scission est DNM1L/DRP1 (*Dynamain-Related Protein 1*) (Smirnova *et al.*, 2001). L'activité de cette protéine est régulée par phosphorylation (Giacomello *et al.*, 2020) et son activation aboutit à sa relocalisation du cytoplasme vers la MME (Figure 29.B). La fixation de DRP1 à la surface mitochondriale se fait grâce à



l'interaction avec l'un de ses récepteurs : MFF (*Mitochondrial Fission Factor*), FIS1 (*mitochondrial FISsion 1 protein*), MID49 (*Mitochondrial Dynamics protein of 49kDa*) ou encore MID51 (Losón *et al.*, 2013). DRP1 s'oligomérisent autour de la mitochondrie, formant l'appareil de scission. La mise en place de ce dernier requiert l'intervention du RE (Friedman *et al.*, 2011) et des filaments d'actine (Ji *et al.*, 2015). En effet, la fission se produit dans une région où le RE se contracte autour de la mitochondrie.

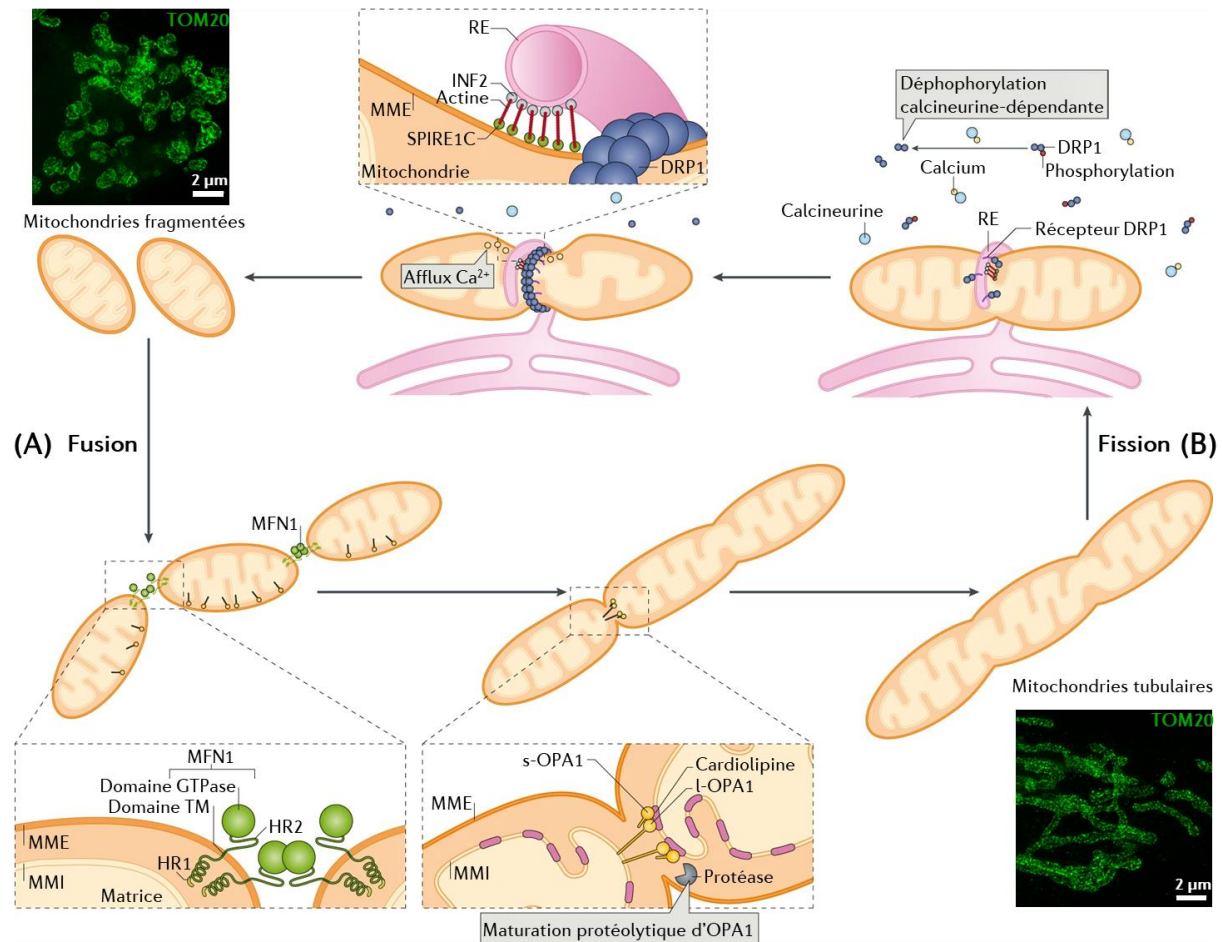


Figure 29 | Mécanismes de fusion et de fission mitochondriale

**(A)** La fusion mitochondriale implique deux GTPases de la MME et MMI : MFN1 et OPA1, respectivement. Le processus est initié par la dimérisation de deux MFN1 provenant de deux mitochondries (via les domaines HR2 ou GTPases). L'association induit un changement conformationnel compatible avec l'hydrolyse de GTP, qui permet la fusion des MME. Au niveau de la MMI, la forme immature d'OPA1 (l-OPA1) interagit avec la cardiolipine. Cette interaction est rendue possible par la présence d'une forme clivée d'OPA1 (s-OPA1). L'interaction d'OPA1 avec les lipides permet la fusion des MMI et le mélange des matrices. Après fusion, l'observation par microscopie à super-résolution (STED pour *Stimulated Emission Depletion*) montre des mitochondries (TOM20) tubulaires qui forment un réseau. **(B)** La fission mitochondriale est principalement orchestrée par la protéine DRP1, dont l'activité est régulée par phosphorylation. Par exemple, la protéine kinase A phosphoryle DRP1 sur son résidu Ser-637 la maintenant inactive dans le cytoplasme. Lorsque DRP1 est déphosphorylée par la calcineurine, elle se fixe aux mitochondries, grâce à son récepteur dédié, puis s'oligomérisent. Ce phénomène est concomitant avec le repliement du RE autour de la mitochondrie à séparer. L'activité de DRP1 est renforcée par la polymérisation locale d'actine via les protéines INF2 et SPIRE1C. En effet, les filaments d'actine favoriseraient la constriction mitochondriale et la polymérisation de DRP1. La scission de la MMI est due à l'accumulation de  $Ca^{2+}$  dans la matrice, tandis que la scission de la MME est due à l'activité GTPase de DRP1. Après fission, l'observation par microscopie à super résolution STED montre de petites mitochondries (TOM20) fragmentées et isolées. Adaptée de (Giacomello *et al.*, 2020).

À cette interface, la protéine du RE IFN2 (*Inverted Formin 2*), induit la polymérisation locale d'actine via la protéine mitochondriale SPIRE1C (Manor *et al.*, 2015) (Figure 29.B). Le cytosquelette joue un rôle essentiel dans la fission en exerçant une tension sur la surface mitochondriale (Mahecic *et al.*, 2021). Plus précisément, la polymérisation d'actine présente une double fonction. Premièrement, elle favorise l'oligomérisation de DRP1 autour de la mitochondrie (Manor *et al.*, 2015). Deuxièmement, elle accroît les contacts mitochondries-RE ce qui entraîne l'accumulation de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), en provenance du RE, dans la matrice mitochondriale (Chakrabarti *et al.*, 2018). Cet afflux de  $\text{Ca}^{2+}$  entraîne la constriction de la MMI et sa fission. S'en suit la scission de la MME où l'activité GTPase de DRP1 forme un anneau contractile autour de la MME (Ingelman *et al.*, 2005) entraînant sa division, potentiellement sous l'action de la Dyn2 (*dynamain-2*) (Lee *et al.*, 2016). L'intervention de Dyn2 lors de l'étape terminale de la division reste controversée (Fonseca *et al.*, 2019).

Le processus de fission participe également à la biogenèse de nouvelles mitochondries, nécessaires lors de la division cellulaire, en permettant de multiplier leur nombre (Giacomello *et al.*, 2020). De plus, le point de scission n'intervient pas au même endroit de la mitochondrie suivant que la fission soit induite dans le but d'éliminer une partie de mitochondrie endommagée ou à des fins de biogenèse. En effet, une récente étude démontre que lorsque la fission intervient au centre de la mitochondrie, la ségrégation de l'ADNmt se fait à part égale permettant l'obtention de deux mitochondries fonctionnelles (Kleele *et al.*, 2021). En revanche, lorsqu'il s'agit d'éliminer une partie endommagée de la mitochondrie, le point de scission s'observe en périphérie de celle-ci. Ainsi, la partie de mitochondrie à éliminer se trouve dépourvue de nucléoles, la rendant non-fonctionnelle, et son devenir passera par la mitophagie (Kleele *et al.*, 2021).

#### IV. 1. B. (c) Rôle du cytosquelette dans la motilité des mitochondries

La notion de dynamique mitochondriale englobe également la capacité des mitochondries à se déplacer dans la cellule, notamment pour répondre à un besoin énergétique. Afin d'assurer leurs mouvements, les mitochondries utilisent le cytosquelette (Kruppa & Buss, 2021). Ce dernier correspond à un groupement de biopolymères dynamiques, qui se compose :

- des microfilaments d'actine. Il s'agit du composant le plus dynamique. Les microfilaments sont composés d'actine G (globulaire) monomérique, qui est capable de se polymériser pour former les filaments d'actine (F-actine). La polymérisation nécessite l'hydrolyse d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) et permet de distinguer une extrémité (+), à croissance rapide, et une extrémité (-), à faible croissance ou en cours de dépolymérisation (Hohmann & Dehghani, 2019) ;
- des microtubules (MTs), qui sont des tubes creux formés par l'association d'hétérodimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ . Ces hétérodimères s'assemblent en protofilaments et l'association de treize

protofilaments forme la paroi d'un MT. Cette structure rayonne dans la cellule à partir du MTOC (*MT Organizing Center*), qui correspond au siège de la polymérisation des MTs. En effet, les hétérodimères de tubuline ( $\alpha$ - $\beta$ ) s'assemblent à partir du MTOC par hydrolyse du GTP. Les MTs sont donc polarisés dans la mesure où l'on distingue une extrémité (+) et (-) (Hohmann & Dehghani, 2019) ;

- des filaments intermédiaires qui correspondent aux composants les moins dynamiques du cytosquelette puisqu'ils constituent l'armature de la cellule en permettant le maintien de sa structure. On distingue une grande diversité de filaments intermédiaires, selon leur composition, cependant l'organisation structurale reste la même pour tous. En effet, ils s'assemblent par oligomérisation. Tout d'abord, il y aura dimérisation, puis ces dimères vont s'agréger pour former des tétramères. Huit de ces tétramères forment le filament intermédiaire. Il s'agit d'une structure non polarisée et dont l'assemblage ne requiert pas l'utilisation d'ATP ou de GTP (Hohmann & Dehghani, 2019).

Chez les mammifères, le mouvement des mitochondries est dépendant de moteurs moléculaires et d'adaptateurs faisant le lien entre la mitochondrie et la structure lui servant de rail. Le plus souvent, ce rail est le réseau de MT qui assure les mouvements de longue distance, mais les microfilaments d'actine peuvent aussi être impliqués (Figure 30).

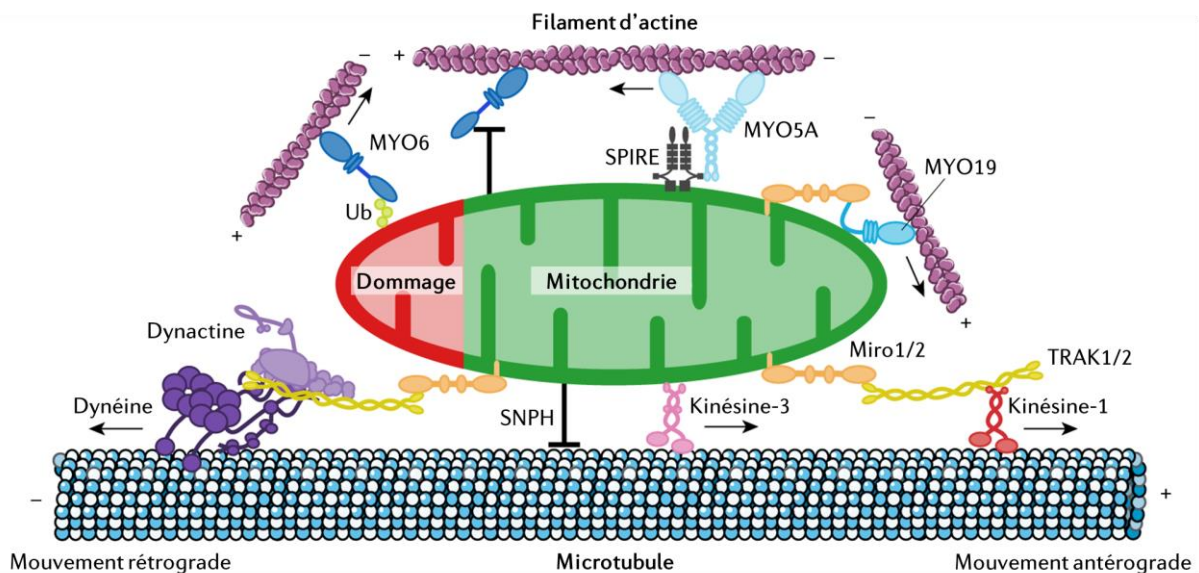


Figure 30 | **Les mouvements mitochondriaux dépendent du cytosquelette**

Schématisation des différents moteurs moléculaires impliqués dans la distribution des mitochondries dans la cellule. La kinésine-1 et le complexe dynéine-dynactine sont reliés à la mitochondrie via la protéine adaptatrice TRAK1/2 qui interagit avec Miro1/2, ancrée à la MME. MYO19 s'attache directement à la mitochondrie via son interaction avec Miro1/2. La kinésine-3 pourrait également avoir un rôle dans le mouvement antérograde mais le mécanisme de fixation aux mitochondries n'est pas connu. La MYO5A se fixe aux mitochondries via les protéines SPIRE. La syntaphiline (SNPH) se localise à la MME et interagit directement avec les MTs et de manière indirecte avec l'actine (via MYO6). Au cours de la mitophagie dépendante du couple PINK1/PARKIN (Figure 31), MYO6A est recrutée aux mitochondries endommagées via l'Ub. Adaptée de (Kruppa & Buss, 2021).

Le long des MTs sont associées diverses protéines appelées les MAPs (*Microtubules-Associated Proteins*). Parmi ces MAPs, on retrouve deux moteurs moléculaires : les kinésines et les dynéines. Les kinésines transportent leur cargo vers la périphérie cellulaire (mouvement antérograde) tandis que les dynéines les acheminent vers le centre (mouvement rétrograde) (Hancock, 2014). Certaines protéines permettant d'accrocher les mitochondries à ces moteurs moléculaires ont été identifiées. Elles forment un complexe impliquant TRAK1/2 (*TRAfficking Kinase protein 1 and 2*), une protéine capable de faire le lien avec le moteur (Van Spronsen *et al.*, 2013) et Miro1/2, une protéine de la MME (Tang, 2018) (Figure 30).

Les MTs subissent de nombreuses MPT (acétylation, détyrosination, méthylation, phosphorylation ...) qui régulent directement leur stabilité ainsi que leurs fonctions (Janke & Magiera, 2020). La plupart des MPT sont retrouvées sur la surface externe des polymères de MT, mise à part l'acétylation qui intervient sur la Lys-40 de la tubuline  $\alpha$ , un résidu exposé dans la lumière des MTs (LeDizet & Piperno, 1987; L'Hernault & Rosenbaum, 1985). De plus, l'acétylation est uniquement observée sur des sous-unités de tubuline  $\alpha$  incorporées dans les MTs, et non sur les hétérodimères de tubuline cytoplasmiques (Maruta *et al.*, 1986; Piperno *et al.*, 1987), suggérant que l'enzyme catalysant l'acétylation puisse pénétrer dans le creux des MTs. Cette particularité explique pourquoi le phénomène d'acétylation des MTs a beaucoup intrigué les scientifiques au cours des trente dernières années. Cependant, les difficultés quant à l'identification de l'enzyme responsable de l'acétylation ont limité les connaissances sur le rôle de cette MPT. En effet, ça n'est qu'en 2010 que fut identifié ATAT1 (*Alpha Tubulin Acetyltransferase 1*), l'enzyme catalysant l'acétylation (Akella *et al.*, 2010; Shida *et al.*, 2010). Plus précisément, l'acétylation de la tubuline  $\alpha$  résulte d'une balance finement régulée entre l'activité d'ATAT1 et de deux déacétylases, HDAC6 et SIRT2 (*SIRTuin 2*) (Castro-Castro *et al.*, 2012). Lors d'un stress cellulaire, l'équilibre de cette balance peut être perdu et conduire à de l'hyperacétylation. Du point de vue fonctionnalité, l'acétylation de la tubuline  $\alpha$  est régulièrement associée à une plus grande stabilité des MTs et à leur résistance aux stress mécaniques (Janke & Montagnac, 2017). De plus, le transport de cargos le long des MTs est plus efficace lorsque les MTs sont acétylés, car les moteurs moléculaires ont plus d'affinité pour cette population de MTs (Dompierre *et al.*, 2007; Reed *et al.*, 2006). Ainsi au niveau de l'impact sur les mitochondries, l'hyperacétylation est connue pour moduler les mouvements mitochondriaux (Friedman *et al.*, 2010), ou encore pour induire la production de ROSmt (Mackeh *et al.*, 2014). Les MTs sont aussi impliqués au cours de l'autophagie en participant notamment à la formation des autophagosomes (Mackeh *et al.*, 2013). Ces dernières années, il fut exploré l'implication potentielle de l'acétylation des MTs sur l'autophagie. Il a par exemple été montré que la carence nutritive augmente l'acétylation des MTs, ce qui accroît la phosphorylation de JNK et permet de stimuler l'autophagie (Geeraert *et al.*, 2010). L'acétylation des

microtubules participe aux mouvements intracellulaires des vésicules autophagiques (Esteves *et al.*, 2019; Nowosad *et al.*, 2021), mais également à la fusion autophagosome-lysosome (Köchl *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2010). Ces données concernant le rôle du niveau d'acétylation des MTs sur les mouvements mitochondriaux et l'autophagie ouvrent la perspective d'un rôle potentiel de ce type de MPT au cours de la mitophagie.

Les microfilaments d'actine sont essentiels au cours de divers processus régulant la structure et les fonctions du réseau mitochondrial, comme par exemple lors de la fission (Figure 29.B). L'implication de l'actine pour les mouvements mitochondriaux est connue depuis longtemps chez la levure (Simon *et al.*, 1995). Chez les mammifères, cette capacité fut démontrée plus récemment avec l'identification de la myosine de classe XIX (MYO19), un moteur moléculaire utilisant l'actine en tant que rail (Figure 30). Cette protéine est capable de se lier directement à la MME afin d'induire le mouvement des mitochondries vers les extrémités (+) des microfilaments (Quintero *et al.*, 2009). Plus récemment, il a été montré que la localisation mitochondriale de MYO19 est due à son association avec Miro1/2, suggérant le rôle fondamental de cette dernière dans les mouvements mitochondriaux dépendants des réseaux d'actine et de tubuline (López-Doménech *et al.*, 2018).

Lorsque la mitochondrie n'a plus nécessité de se déplacer, elle entre dans un état stationnaire. Deux possibilités existent pour réduire sa motilité : soit la mitochondrie se dissocie de ses moteurs moléculaires (Chung *et al.*, 2016), soit elle s'ancre aux réseaux d'actine ou de MT. Sa dissociation d'avec la kinésine-1 implique Miro1/2 et dépend de la teneur en  $Ca^{2+}$ . En effet, dans des cellules neuronales, la fixation de  $Ca^{2+}$  sur Miro1/2 modifie sa conformation, ce qui déstabilise son association avec l'adaptateur TRAK1/2 (Wang & Schwarz, 2009). La perte de mobilité des mitochondries fait également intervenir la synthaphiline (SNPH), une protéine ancrée à la MME et qui interagit directement avec les MTs (Kang *et al.*, 2008) (Figure 30). La SNPH permet aussi l'ancrage des mitochondries à l'actine puisque l'interaction directe entre SNPH et MYO6 a été montrée (Li *et al.*, 2020b). La MYO6 aurait également un rôle lors de la mitophagie, comme nous le verrons après, en étant recrutée à proximité des mitochondries endommagées (Figure 30). Enfin, comme le montre une étude en *preprint*, la myosine de classe V (MYO5A) est aussi capable d'immobiliser les mitochondries sur le réseau d'actine en interagissant avec la protéine mitochondriale SPIRE (Straub *et al.*, 2020).

#### IV. 1. C La mitophagie dans le contrôle qualité des mitochondries

##### IV. 1. C. (a) Généralités

La mitochondrie est le siège de la chaîne respiratoire permettant la production d'énergie sous forme d'ATP. Au cours de ce processus, des électrons peuvent être perdus et captés par les molécules d'O<sub>2</sub>

conduisant à la formation de ROSmt (Wong *et al.*, 2017). Les dommages mitochondriaux sont d'origines multifactorielles et se manifestent par la production excessive de ROSmt, délétères pour l'homéostasie cellulaire. En conséquence, la cellule dispose d'une machinerie sophistiquée assurant le contrôle qualité des mitochondries (Vigié & Camougrand, 2017). Ce contrôle s'effectue à différents niveaux, que ce soit au niveau moléculaire par le biais de protéines, ou au niveau de l'organe entier par la mitophagie (Pickles *et al.*, 2018; Scheibye-Knudsen *et al.*, 2015). La mitophagie est un processus conservé de la levure à l'être humain, qui permet à la cellule d'éliminer les mitochondries endommagées ou surnuméraires à travers une voie sélective d'autophagie, ce qui contribue au maintien de l'homéostasie mitochondriale. En effet, il est montré qu'un défaut de mitophagie induit l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles et est associé au développement de diverses pathologies comme des cancers ou des neurodégénération (Springer & Macleod, 2016). La régulation de la mitophagie est directement liée à la dynamique des mitochondries. En effet, la fission est décrite comme précédant et facilitant la mitophagie (Burman *et al.*, 2017; Twig & Shirihai, 2011). À l'inverse, en carence nutritive, la fusion mitochondriale protège les mitochondries de la dégradation autophagosomale (Gomes *et al.*, 2011; Rambold *et al.*, 2011).

Le terme « mitophagie » fut employé pour la première fois en 2005 (Lemasters, 2005) et les recherches sur ce mécanisme ont permis l'identification d'effecteurs impliqués chez la levure (Okamoto *et al.*, 2009) et chez les mammifères (Narendra *et al.*, 2008). Dans ce paragraphe, nous ne nous intéresserons qu'aux mécanismes de mitophagie retrouvés chez les mammifères. À ce jour, deux types de mitophagie sont décrites : la voie dépendante du couple PINK1/PARKIN et la voie indépendante, régie par les récepteurs de l'autophagie sélective.

#### IV. 1. C. (b) La voie dépendante de PINK1/PARKIN

Les découvertes sur la mitophagie furent intimement liées aux recherches sur la maladie de Parkinson. Les gènes *PINK1* et *PARKIN* présentent effectivement des mutations dans certaines formes de la maladie et sont également impliqués dans le métabolisme mitochondrial (Lynch-Day *et al.*, 2012). À l'heure actuelle, la mitophagie dépendante du couple PINK1/PARKIN est celle dont le mécanisme est le mieux documenté. Cette voie est généralement induite à la suite d'une dépolarisation des mitochondries (Georgakopoulos *et al.*, 2017), conduisant à l'ubiquitinylation des protéines de la surface mitochondriale. Ce type d'autophagie sélective s'intègre donc dans les voies dépendantes de l'Ub (Figure 17.A). PINK1 est une sérine/thréonine kinase possédant une séquence d'adressage aux complexes TOM (*Translocase of the Outer Membrane*) et sert de signal inducteur de la mitophagie (Okatsu *et al.*, 2015). Lorsque la mitochondrie est saine, PINK1 est transportée vers la MMI où elle sera clivée par diverses protéases, entraînant sa dégradation par le protéasome (Sekine & Youle, 2018). En

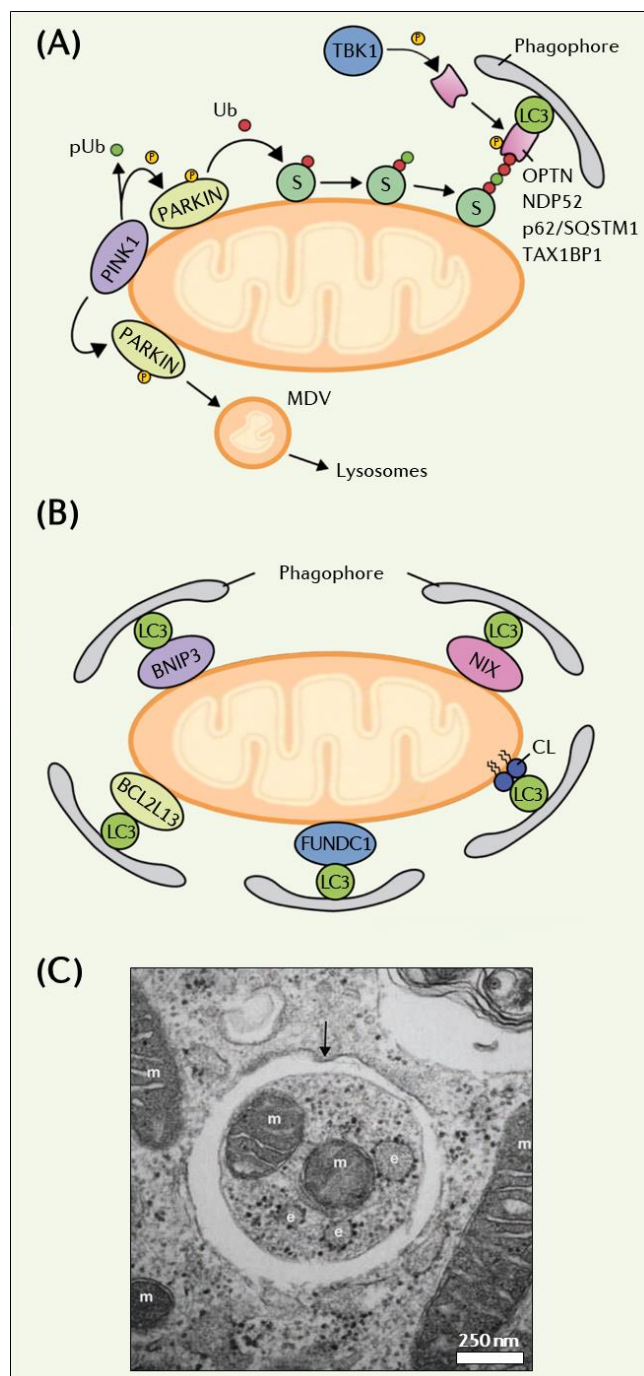


revanche, lors d'un dommage altérant le  $\Delta\Psi_m$ , le système d'import des protéines est impacté. Ainsi, PINK1 ne peut plus être dégradée et s'accumule à la MME, où elle s'active par autophosphorylation (Sekine & Youle, 2018). Elle phosphoryle à la fois l'Ub et la protéine PARKIN, une E3 Ub ligase, afin de l'activer (Harper *et al.*, 2018). Ainsi, PARKIN ubiquitinye diverses protéines de la MME. Ces protéines pourront soit être dégradées par le protéasome, soit reconnues par des récepteurs autophagiques ayant une affinité pour l'Ub (Tableau 2). La fixation de ces récepteurs permet la capture de la mitochondrie et son adressage vers les autophagosomes où elle sera dégradée (Figures 31.A et C). Le réseau d'actine jouerait un rôle important dans les étapes initiales de la mitophagie en permettant d'isoler les mitochondries endommagées. PARKIN permet en effet le recrutement de MYO6, conduisant à la polymérisation d'une « cage » d'actine autour de la mitochondrie afin de l'isoler et de prévenir sa fusion avec une mitochondrie saine (Kruppa *et al.*, 2018). Il a été montré que la mitophagie pouvait aussi être uniquement dépendante de PINK1 (Richter *et al.*, 2016). Dans cette étude, les dommages mitochondriaux, induits par un traitement mélangeant antimycine A et oligomycine, activent TBK1 (*TANK-Binding Kinase 1*) qui phosphoryle les récepteurs autophagiques (OPTN, p62/SQSTM1, NDP52 et TAX1BP1). TBK1 interagirait avec OPTN pour augmenter son affinité pour l'Ub phosphorylée par PINK1 (Figure 31.A). Dans ces conditions, la boucle est suffisante pour induire la mitophagie et l'addition de PARKIN n'aurait qu'un rôle amplificateur (Richter *et al.*, 2016).

#### IV. 1. C. (c) La voie indépendante de PARKIN, médiée par les récepteurs autophagiques

La mitophagie peut aussi être indépendante de l'Ub. Pour cela, divers récepteurs de la MME sont capables d'interagir avec LC3/GABARAP via leurs motifs LIR (Tableau 2), entraînant la séquestration des mitochondries au sein d'autophagosomes (Gatica *et al.*, 2018) (Figures 31.B et C). À ce jour, chez les mammifères, quatre récepteurs protéiques localisés à la MME, ont été identifiés : NIX, BNIP3, FUNDC1 et BCL2L13 (Palikaras *et al.*, 2018). Ces formes de mitophagie sont régulées par diverses MPT intervenant au niveau des récepteurs, notamment pour FUNDC1 et NIX dont l'activité est régulée par phosphorylation. En condition de stress, la phosphorylation du domaine LIR de NIX augmente sa liaison à LC3 (Rogov *et al.*, 2017). Le récepteur FUNDC1 est maintenu inactif en condition basale, via la phosphorylation de son motif LIR par les kinases Src et CK2 (Chen *et al.*, 2014). En revanche, en condition d'hypoxie, la phosphatase PGAM5 (PhosphoGlycérAte Mutase 5) lève cette inhibition, entraînant la liaison de FUNDC1 à LC3 (Chen *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2012b). Outre son rôle dans l'induction de la mitophagie, PGAM5 serait également impliquée dans le contrôle de l'apoptose en déphosphorylant BCL-X<sub>L</sub> (Ma *et al.*, 2020). Tout comme NIX, BNIP3 est un membre de la famille BCL2 (Figure 20) impactant diverses fonctions mitochondriales, en particulier l'apoptose (Gao *et al.*, 2020). En tant que récepteur mitophagique, BNIP3 permet l'élimination des mitochondries endommagées

afin de limiter la production de ROSmt (Gao *et al.*, 2020). Enfin, BCL2L13 est l'orthologue de d'ATG32 chez la levure, une protéine nécessaire pour l'induction de la mitophagie. Dans des cellules de mammifères, ce récepteur induit la mitophagie indépendamment de DRP1 et PARKIN. De plus, l'expression orthologue de BCL2L13 chez une levure déficiente pour ATG32 restaure ses capacités mitophagiques (Otsu *et al.*, 2015). La protéine AMBRA1, qui est impliquée dans l'initiation de l'autophagie, notamment via son interaction avec BECN1 (Maria Fimia *et al.*, 2007), pourrait avoir un rôle de récepteur spécifique de la mitophagie. En effet, un pool d'AMBRA1 se localise dans les mitochondries et interagit avec LC3 permettant de promouvoir une mitophagie dépendante ou indépendante de PARKIN (Strappazon *et al.*, 2015).



**Figure 31 | Les différentes voies de la mitophagie**  
**(A)** La mitophagie peut dépendre du couple de protéines PINK1/PARKIN (Ub-dépendant). Suite à un stress mitochondrial, PINK1 se trouve stabilisé et s'accumule à la MME ce qui entraîne le recrutement de PARKIN. PINK1 active PARKIN par phosphorylation (P), lui permettant d'ubiquitinyler différents substrats de la MME. Les chaînes d'Ub sont ensuite phosphorylées par PINK1 (pUb), leur permettant d'être reconnues par les récepteurs autophagiques (p62/SQSTM1, OPTN, NDP52 ou TAX1BP1). Ces protéines adaptatrices interagissent avec la protéine LC3, ancrée dans les membranes du phagophore en formation. TBK1 phosphoryle OPTN, permettant d'accroître sa fixation aux chaînes d'Ub. La mitochondrie finira par être séquestrée dans un autophagosome afin d'être dégradée. Au-delà de son rôle dans la mitophagie le couple PINK1/PARKIN permet la formation de MDVs permettant la dégradation de constituants mitochondriaux par le biais de vésicules qui fusionneront avec les lysosomes. **(B)** La mitophagie peut aussi être indépendante de PARKIN, on parle alors de mitophagie médiée par les récepteurs (Ub-indépendante). LC3 est en effet capable d'interagir directement avec des récepteurs spécifiques, localisés au niveau de la MME. Ces récepteurs peuvent être protéiques (BNIP3, NIX, FUNDC1 et BCL2L13) ou lipidiques (Cardiolipine [CL]). L'interaction de LC3 avec ces récepteurs permet d'adresser la mitochondrie vers la lumière du phagophore. Adaptée de (Vigié & Camougrand, 2017) **(C)** Photo de microscopie électronique à transmission de cellules MEF placées en carence nutritive, issue de (Mizushima & Levine, 2010). On peut observer de la mitophagie avec la présence de mitochondries (m) au sein d'un autophagosome (flèche).



Alors que la plupart des récepteurs de la mitophagie sont des protéines, une étude montre que la mitophagie pourrait aussi impliquer des récepteurs lipidiques (Chu *et al.*, 2013). En condition normale, la cardiolipine est un lipide uniquement présent dans la MMI. Lors d'un dommage, la cardiolipine est redistribuée dans le feuillet externe de la MME, lui permettant d'interagir directement avec LC3. De plus, une étude a décrit que l'inhibition de la synthèse des cardiolipines dans des cellules neuronales prévient la mitophagie (Chu *et al.*, 2013).

#### IV. 1. C. (d) La dégradation de matériel par des vésicules dérivées des mitochondries

De manière complémentaire à la mitophagie, le contrôle qualité des mitochondries fait intervenir des vésicules dérivées de mitochondries appelées les MDVs (*Mitochondrial Derived Vesicles*) (Picca *et al.*, 2020). Les mitochondries sont en effet en mesure d'envoyer vers le lysosome des vésicules à double membrane contenant du matériel matriciel à éliminer (Figure 31.A). La voie d'induction de ce mécanisme reste incertaine, mais serait indépendante de la dépolarisation des mitochondries, de l'autophagie ou encore de la fission mitochondriale (Soubannier *et al.*, 2012). Il est admis que le couple PINK1/PARKIN serait impliqué dans la mise en place des MDVs (Sugiura *et al.*, 2014). L'hypothèse avancée serait que lors d'un défaut affectant les mécanismes d'imports mitochondriaux, dû à un excès d'agrégats protéiques par exemple, PINK1 ne serait plus dégradée par le protéasome. Cela induirait le recrutement de PARKIN qui pourrait ubiquitinyler différentes protéines de la MME, une activité nécessaire à la formation des MDVs (Sugiura *et al.*, 2014). Le mécanisme conduisant au bourgeonnement des MDVs n'est en revanche pas connu, mais il pourrait être dû à l'accumulation d'un lipide dans la MME. En effet, le blocage des imports mitochondriaux entraîne l'oxydation de la cardiolipine, formant de l'acide phosphatidique, un lipide impliqué dans les courbures membranaires (Sugiura *et al.*, 2014). Après bourgeonnement, les MDVs s'intègrent dans la voie de trafic des vésicules intracellulaires puisqu'elles sont en mesure de fusionner avec les endosomes tardifs ou les lysosomes grâce à la STX17 (McLelland *et al.*, 2016). Les sites de contact mitochondries-lysosomes permettent donc de réguler le devenir mitochondrial, que ce soit via la mitophagie ou la voie des MDVs. Cette dernière stratégie constituerait une première ligne de défense, en permettant d'éliminer un excès de composants mitochondriaux endommagés, sans pour autant éliminer tout ou partie de l'organite (McLelland *et al.*, 2014).

## IV. 2 Rôle des mitochondries dans l'immunité innée antivirale

### IV. 2. A Généralités sur l'immunité innée antivirale

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense contre les virus. Elle inclut tous les mécanismes permettant d'éliminer, inhiber ou ralentir une infection, et se caractérise par des processus peu spécifiques et ne générant pas de mémoire durable. Chez les mammifères, les défenses immunitaires innées comprennent des mécanismes variés impliquant des cellules immunitaires phagocytaires et cytolytiques, le système du complément, l'inflammasome, l'autophagie, l'apoptose ou encore la production de cytokines (Chaplin, 2010). Ces dernières années, de nombreuses études ont montré que les mitochondries participent à un large éventail de voies immunitaires innées et fonctionnent en tant que plateformes de signalisation contribuant aux réponses effectrices (Arnoult *et al.*, 2011; West *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011). Dans ce paragraphe, nous nous concentrerons donc sur l'implication des mitochondries dans l'immunité innée antivirale, puis nous verrons de quelles stratégies disposent les virus pour contourner ces systèmes de défense.

#### IV. 2. A. (a) Détection et reconnaissance d'une infection

Lors d'une infection, l'étape initiale permettant l'induction de l'immunité innée consiste en la détection du pathogène par la reconnaissance de motifs moléculaires lui étant associés (PAMPs pour *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), ou bien étant associés aux dégâts (DAMPs pour *Damage-Associated Molecular Patterns*) causés par sa présence. Cette étape est critique car le système immunitaire doit pouvoir distinguer les éléments du soi des éléments du non-soi. Si cette tolérance vis-à-vis des éléments du soi est perdue, elle peut conduire au développement de maladies auto-immunes (Waldner, 2009).

Les PAMPs et les DAMPs sont de natures variées. Il peut s'agir d'acides nucléiques, de protéines ou encore de lipides (Thompson *et al.*, 2011). Leur reconnaissance fait intervenir plusieurs familles de senseurs moléculaires appelés les PRRs (*Pattern-Recognition Receptors*) (Cao, 2016). Parmi ces familles (Figure 32), on distingue : les TLRs (*Toll-Like Receptors*), les RLRs (*RIG-I-Like Receptors*), les NLRs (*NOD-Like Receptors*), les senseurs d'ADN cytosoliques (Akira & Takeda, 2004; Bhat & Fitzgerald, 2014; Fritz *et al.*, 2006; Rehwinkel & Gack, 2020). Les TLRs sont des récepteurs membranaires qui détectent des motifs moléculaires extracellulaires ou intraluminaux, tandis que les NLRs, RLRs et senseurs à ADN détectent uniquement des motifs moléculaires au sein du cytosol. Il a aussi été proposé que les récepteurs de l'autophagie sélective pouvaient agir comme des PRRs, constituant ainsi une nouvelle classe appelée les SLRs (*Sequestosome 1/p62-Like Receptors*) (Deretic *et al.*, 2013).

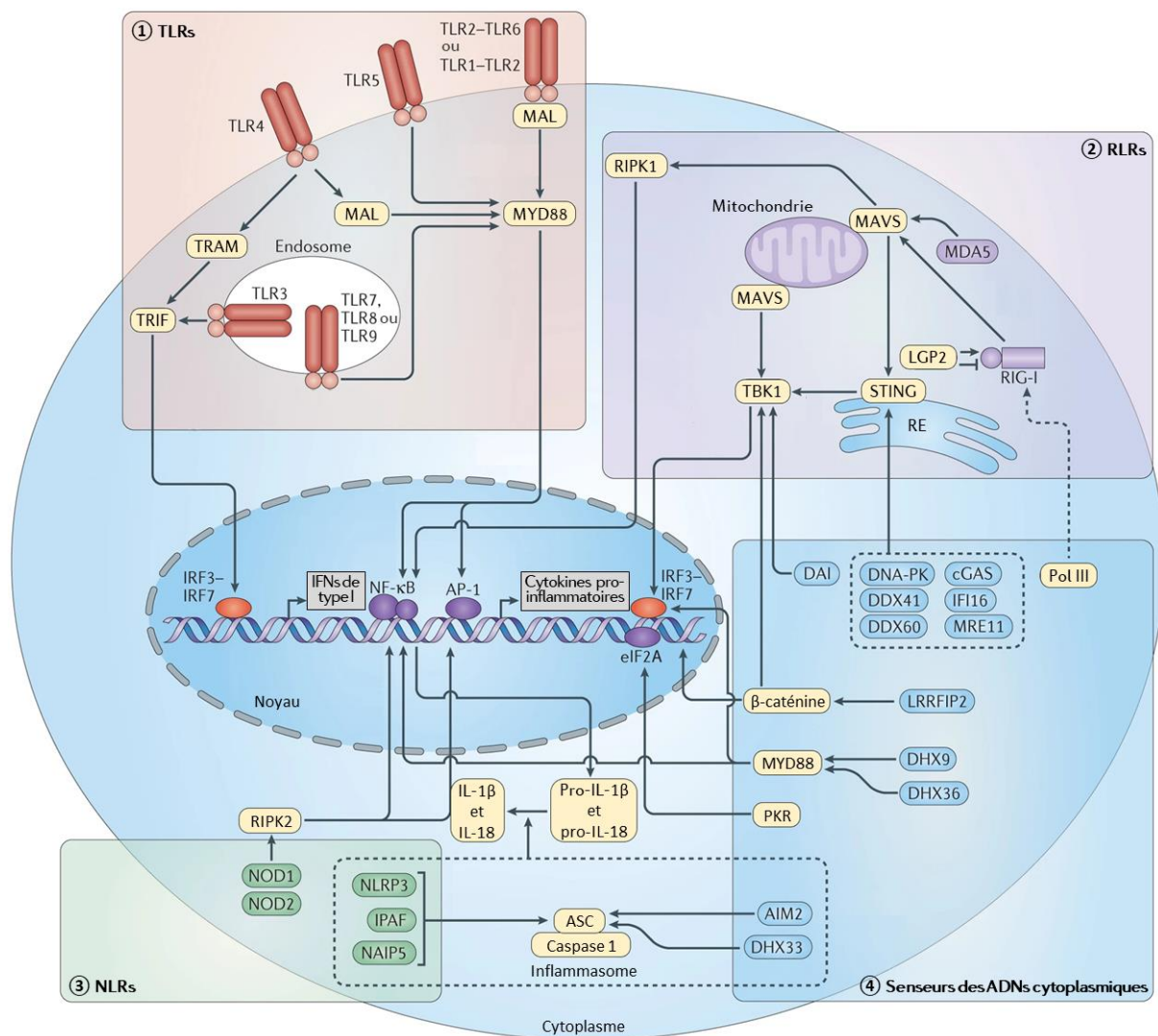


Figure 32 | Les différentes familles de PRRs

Les PRRs activent des voies de signalisation impliquées dans la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFNs de type I. ① Tous les TLRs, exceptés TLR3, interagissent avec MYD88 pour induire l'activation des MAPKs et de NF-κB, qui activent à leur tour le facteur de transcription AP-1 nécessaire à l'expression des cytokines pro-inflammatoires. La protéine TRIF est impliquée dans la signalisation dépendante des TLR4 et 6 où elle active des facteurs de transcription, IRF3-IRF7, nécessaires à la production d'IFNs de type I. ② Parmi les RLRs, RIG-I et MDA5 interagissent tout d'abord avec MAVS puis induisent une cascade de signalisation impliquant STING et TBK1, conduisant à l'expression d'IFNs de type I. LGP2 régule l'activité de RIG-I et MDA5. La signalisation dépendante de MAVS peut également induire RIPK1 qui active AP-1. ③ De nombreux senseurs des ADN cytosoliques tels que cGAS, IFI16 ou encore DAI, induisent une voie de signalisation passant par l'axe STING-TBK1 et convergeant vers la production d'IFNs de type I et de cytokines pro-inflammatoires. L'activation d'AIM2 conduit à l'induction de l'inflammasome. ④ Les NLRs sont activés suite à un stress ou une infection et activent la signalisation RIPK2-NF-κB. Certains NLRs induisent la formation de l'inflammasome contenant la protéine ASC qui recrute la caspase 1 nécessaire à la maturation de l'IL-1β. Adaptée de (Cao, 2016).

AP-1, Activator Protein-1 ; IL-1β, interleukine-1β ; MAL, MYD88-Adaptor-Like ; MAVS, Mitochondrial AntiViral Signaling ; MYD88, MYeloid Differentiation primary response 88 ; NLRP3, NOD LRR and Pyrin domain-containing protein 3 ; PKR, Protein Kinase-RNA activated ; RIPK1/2, Receptor-Interacting serine/threonine Protein Kinase 1/2 ; STING, STimulator of INterferon Genes ; TRIF, TIR-domain-containing adapter-inducing IFN-β.

### La famille des TLRs

Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires appartenant à la vaste famille des récepteurs à l'interleukine (IL). Leur structure comprend un domaine riche en leucine à l'extrémité N-terminale, puis un domaine de fixation au ligand, suivi d'un domaine transmembranaire unique et enfin une extrémité C-terminale intracellulaire portant le domaine impliqué dans la signalisation. Certains TLRs sont situés dans la membrane cytoplasmique (TLR1, 2, 4, 5 et 6) et sont principalement impliqués dans la détection de PAMPs bactériens (Akira & Takeda, 2004). D'autres TLRs sont associés aux membranes endosomales (TLR3, 7, 8 et 9) et sont impliqués dans la reconnaissance d'acides nucléiques bactériens et viraux (Akira & Takeda, 2004).

### La famille des NLRs

Les NLRs sont des récepteurs cytosoliques, comprenant plus d'une vingtaine de membres chez les mammifères, dont la structure générale est conservée entre eux. On retrouve à l'extrémité C-terminale un domaine riche en leucine, puis un domaine central de fixation des nucléotides et enfin, à l'extrémité N-terminale, un domaine permettant les interactions protéines-protéines nécessaires pour la signalisation (Fritz *et al.*, 2006). Selon les membres, ce dernier domaine peut-être un domaine CARD (*Caspase Recruitment Domain*), un domaine pyrine (PYD pour *PYrin Domain*) ou encore un domaine BIR. Les NLRs sont principalement impliqués dans la détection de PAMPs bactériens ou de DAMPs produits consécutivement à une infection bactérienne. L'activation des NLRs engage un processus pro-inflammatoire (Fritz *et al.*, 2006).

### La famille des RLRs

Les RLRs sont des senseurs à ARN localisés dans le cytoplasme (Goubau *et al.*, 2013). Cette famille de récepteurs est composée de trois membres : RIG-I, MDA5 (*Melanoma Differentiation-Associated gene 5*) et LGP2 (*Laboratory of Genetics and Physiology 2*). D'un point de vue structural (Figure 33), les RLRs contiennent tous un domaine hélicase central ainsi qu'un domaine répresseur à l'extrémité C-terminale (CTD pour *C-Terminal Domain*). Ces deux domaines assurent la reconnaissance d'ARN exogènes. RIG-I et MDA5 possèdent en plus deux domaines CARD, à l'extrémité N-terminale, impliqués dans la signalisation. LGP2, qui est dépourvue de domaine CARD, aurait un rôle régulateur (positif et négatif) de RIG-I et MDA5 (Rodriguez *et al.*, 2014). En réponse à une infection virale, les RLRs induisent la production de cytokines pro-inflammatoires et antivirales, les IFNs de type I. De plus, il est clairement démontré que cette famille de récepteurs est impliquée dans la reconnaissance de nombreuses familles virales (Tableau 3).

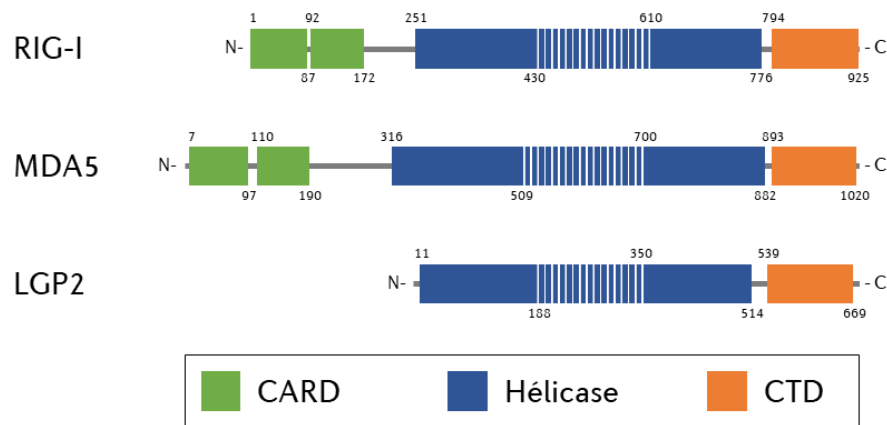


Figure 33 | Organisation structurale des différents RLRs

Représentation schématique de la structure de RIG-I, MDA5 et LGP2. Les positions de chaque domaine d'intérêt sont indiquées. Ces trois RLRs partagent un domaine central à activité hélicase, comprenant une partie N-terminale et une partie C-terminale impliquées respectivement dans la fixation de l'ARN et dans l'hydrolyse de l'ATP. Le CTD de chaque protéine est impliqué dans la reconnaissance de l'ARN cible. RIG-I et MDA5 possèdent, à l'extrémité N-terminale, deux domaines CARD en tandem qui sont impliqués dans la signalisation.

| Classification de Baltimore | Famille                 | Virus              | RLR(s)        |
|-----------------------------|-------------------------|--------------------|---------------|
| I - ADNdb                   | <i>Herpesviridae</i>    | HSV-1, KSHV et EBV | RIG-I et MDA5 |
|                             | <i>Poxviridae</i>       | VACV               | RIG-I et MDA5 |
|                             | <i>Adenoviridae</i>     | AdV                | RIG-I         |
| II - ADNsb                  |                         |                    |               |
| III - ARNdb                 | <i>Reoviridae</i>       | Rotavirus          | RIG-I et MDA5 |
| IV - ARNsb (+)              | <i>Picornaviridae</i>   | HRV et CBV         | RIG-I et MDA5 |
|                             | <i>Flaviviridae</i>     | ZIKV, WNV et HCV   | RIG-I et MDA5 |
|                             | <i>Coronaviridae</i>    | SARS-CoV-1 et 2    | RIG-I et MDA5 |
| V - ARNsb (-)               | <i>Orthomyxoviridae</i> | IAV                | RIG-I         |
|                             | <i>Paramyxoviridae</i>  | MV                 | RIG-I et MDA5 |
|                             | <i>Filoviridae</i>      | EBOV et MARV       | RIG-I et MDA5 |
| VI - ARNsb (TI)             | <i>Retroviridae</i>     | HIV-1              | RIG-I et MDA5 |
| VII - ADNdb (TI)            | <i>Hepadnaviridae</i>   | HBV                | RIG-I et MDA5 |

Tableau 3 | Exemples d'infections virales détectées par les RLRs

Les RLRs sont impliqués dans la détection d'une multitude d'infections virales, cependant aucun exemple de détection par les RLRs n'est connu à l'heure actuelle pour les virus de la classe II (selon la classification de Baltimore). Adapté de (Rehwinkel & Gack, 2020).

AdV, AdénoVirus ; CBV, *Coxsackie B Virus* ; db, double brin ; EBOV, *EBOla Virus* ; HBV, *Hepatitis B Virus* ; HCV, *Hepatitis C Virus* ; HRV, *Human RhinoVirus* ; IAV, *Influenza A Virus* ; MARV, *MARburg Virus* ; MS, *Measles Virus* ; SARS-CoV, *Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus* ; sb, simple brin ; TI, transcription inverse ; VACV, *VACcinia Virus* ; WNV ; *West Nile Virus* ; ZIKV, *ZIKa Virus*.

### 🌀 La famille des senseurs à ADN

Chez les eucaryotes, l'ADN se trouve normalement dans le noyau ou bien dans les mitochondries. Ainsi, la présence d'ADN dans le cytoplasme est un signal de danger, perçu par des récepteurs spécialisés dans leur détection (Bhat & Fitzgerald, 2014). Parmi eux, on distingue AIM2 (*Absent In Melanoma 2*),

DAI (*DNA-dependent Activator of IRF*), IFI16 (*InterFeron Gamma-Inducible protein 16*) ou encore cGAS (*cGAMP synthase*). Ce dernier fut identifié en 2013 comme étant un senseur majeur et ubiquitaire des ADN cytosoliques double brin, quelles que soient leurs séquences (Sun *et al.*, 2013).

### La famille des SLRs

L'autophagie sélective, et plus particulièrement la xénophagie, est impliquée au cours de l'immunité innée en contribuant au contrôle d'une infection microbienne intracellulaire. L'initiation de ce processus implique la reconnaissance du pathogène par des récepteurs autophagiques, qui correspondent donc à des PRRs. La famille des SLRs comprend : p62/SQSTM1, NDP52, TAX1BP1 et l'OPTN (Deretic *et al.*, 2015). Contrairement aux autres classes de PRRs, les SLRs n'induisent pas de cascade de signalisation puisqu'ils permettent l'élimination directe du pathogène par voie autophagique (Deretic *et al.*, 2015).

#### IV. 2. A. (b) Les phases effectrices de l'immunité innée antivirale

L'activation des PRRs induit diverses cascades de signalisation conduisant à l'activation de facteurs tels que NF- $\kappa$ B, les MAPKs et les IRFs, qui assurent la régulation de deux voies fondamentales de l'immunité antivirale : la réponse IFN (Figure 34) et la réponse inflammatoire (Figure 35).

### La réponse interféron

Lors d'une infection virale, les cellules sécrètent des IFNs dans le milieu extracellulaire. En se fixant sur leurs récepteurs cibles, portés par les cellules avoisinantes, ces cytokines permettent d'induire une réponse antivirale limitant la propagation du virus au sein de l'organisme. Selon le type cellulaire, les mammifères sécrètent trois types d'IFN (McNab *et al.*, 2015) :

- les IFNs de type I constituent une grande famille multigénique de cytokines comprenant treize sous-types d'IFN- $\alpha$ , un seul type d'IFN- $\beta$  et différents produits d'un gène mal défini (IFN- $\epsilon$ , IFN- $\tau$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\delta$  et IFN- $\zeta$ ) ;
- les IFNs de type II sont définis par un produit de gène unique, l'IFN- $\gamma$ , qui est principalement produit par les lymphocytes T et les NK ;
- les IFNs de type III comprennent 4 produits, l'IFN- $\lambda$ 1, l'IFN- $\lambda$ 2, l'IFN- $\lambda$ 3 et l'IFN- $\lambda$ 4. Leurs fonctions sont similaires aux IFNs de type I, mais restreintes aux cellules épithéliales car les récepteurs de ces cytokines sont principalement exprimés par ce type cellulaire.

Les IFNs de type I sont des cytokines qui accomplissent plusieurs fonctions, notamment dans le contrôle des infections, dans le traitement des cancers ou encore dans le développement des maladies auto-immunes (Crow & Manel, 2015; McNab *et al.*, 2015; Zitvogel *et al.*, 2015). Leur fonction la plus documentée réside dans les propriétés antivirales qu'ils confèrent (McNab *et al.*, 2015; Yan & Chen,



2012). Pour cela, les IFNs de type I agissent aussi bien au cours de l'immunité innée qu'adaptative en induisant l'expression de centaines de gènes (ISG pour *Interferon-Stimulated Genes*), permettant l'établissement d'un état antiviral (Schneider *et al.*, 2014) (Figure 34.A).

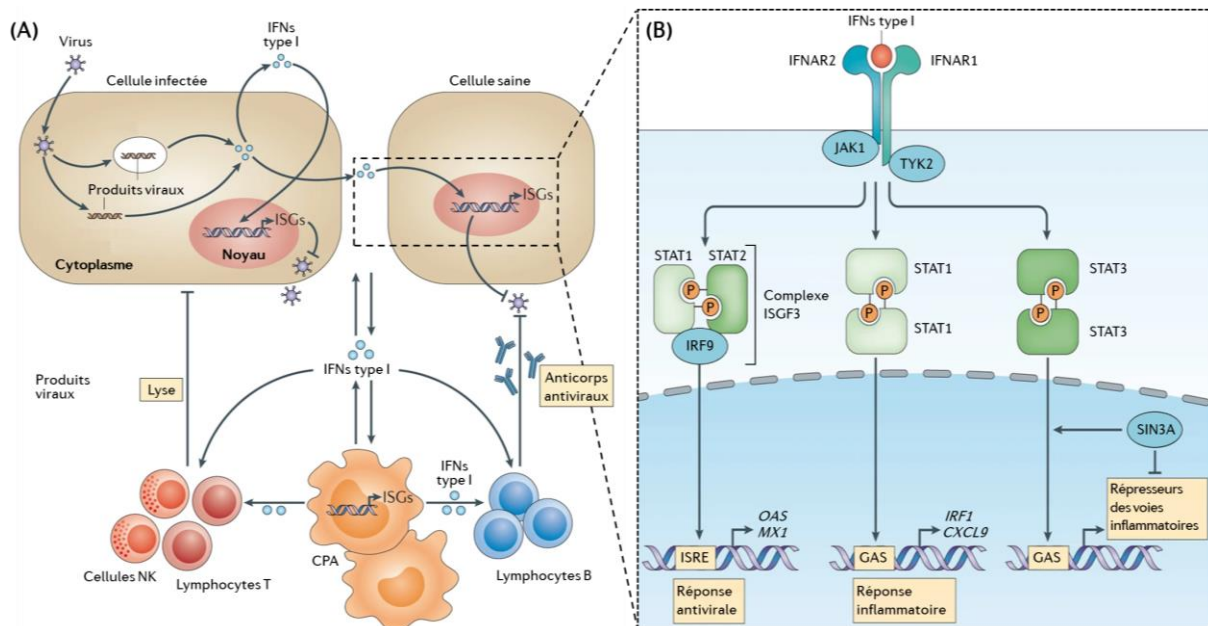


Figure 34 | Rôle des IFNs de type I au cours de l'infection virale

**(A)** En réponse à l'infection par un virus sont produites des cytokines antivirales, appelées les IFNs de type I, qui sont sécrétées dans le milieu extracellulaire. Ces cytokines agissent de manière autocrine (sur la cellule infectée) ou paracrine (sur une cellule voisine saine) afin d'induire les gènes de réponse à l'IFN (ISGs pour *IFN-Stimulated Genes*) dont la fonction principale est d'inhiber la réplication virale. Les IFNs de type I peuvent également être produits et agir au niveau des cellules de l'immunité innée telles que les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). L'action des IFNs de type I sur les CPA permet d'augmenter leur capacité de présentation des antigènes. De plus, les IFNs de type I améliorent également les capacités antivirales des cellules de l'immunité adaptative, via la production d'anticorps (lymphocytes B) ou via leurs fonctions cytotoxiques sur les cellules infectées (lymphocytes T et NK). Adaptée de (McNab *et al.*, 2015). **(B)** L'engagement du récepteur IFNAR active JAK1 et TYK2 conduisant à l'activation des facteurs de transcription STAT par phosphorylation et dimérisation. Le complexe ISGF3 se lie à la séquence ISRE pour activer des gènes antiviraux. Les homodimères STAT1 se lient à la séquence GAS et induisent des gènes pro-inflammatoires. Les homodimères STAT3 inhibent indirectement les gènes pro-inflammatoires, probablement en activant des répresseurs transcriptionnels. SIN3A se lie à STAT3 ce qui inhibe ses fonctions. Adaptée de (Ivashkiv & Donlin, 2014).

Les IFNs de type I sont sécrétés dans le milieu extracellulaire où ils agissent de manière paracrine ou autocrine. La plupart des cellules humaines expriment à leur surface des récepteurs aux IFNs de type I. Il s'agit de récepteurs hétérodimériques composés d'une sous-unité IFNAR1 (*IFN-Alpha/Beta Receptor 1*) et d'une sous-unité IFNAR2 (Ivashkiv & Donlin, 2014). La fixation de l'IFN à son récepteur active les kinases associées à celui-ci du côté intracellulaire, à savoir JAK1 (*Janus Kinase 1*) et TYK2 (*Tyrosine Kinase 2*). Dans le cytoplasme, ces kinases phosphorylent les facteurs de transcription STAT1, 2 et 3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). STAT1 et STAT2 se dimérisent et s'assemblent avec IRF9 pour former l'ISGF3 (*ISG Factor 3*) (Figure 34.B). Ce complexe va dans le noyau et se lie aux séquences ISREs (*IFN-Stimulated Response Elements*) de l'ADN, induisant la transcription des ISGs. Des

homodimères de STAT1 ou de STAT3 se forment également et vont dans le noyau où ils se fixent aux séquences GAS (*Gamma-Activated Sequences*) (Figure 34.B). STAT1 induit l'expression de gènes pro-inflammatoires, tandis qu'à l'inverse STAT3 les réprime. Au total, les IFNs de type I induisent l'expression d'une centaine d'ISGs, opérant de nombreuses fonctions à visée antivirale (MacMicking, 2012).

### La réponse inflammatoire via l'assemblage d'inflammasomes

L'induction de la réponse inflammatoire est conditionnée par la formation rapide de structures intracellulaires, appelées les inflammasomes. Ces derniers correspondent à des plateformes de signalisation multiprotéiques qui s'assemblent à la suite de la stimulation de PRRs. La dénomination des divers inflammasomes décrits dépend du type de PRRs impliqués lors de l'étape d'activation. La mise en jeu de ces inflammasomes conduit à l'activation de la caspase 1, une caspase inflammatoire (Figure 19). Celle-ci présente une double fonction : elle déclenche la maturation de pro-cytokines inflammatoires (les IL-1 $\beta$  et IL-18), qui seront sécrétées dans le milieu extracellulaire (Dinarello, 2009) ; et induit une mort cellulaire hyper-inflammatoire appelée la pyroptose (Shi *et al.*, 2015).

À l'heure actuelle, de nombreux inflammasomes ont été identifiés (Broz & Dixit, 2016). Le plus documenté étant celui impliquant le récepteur NLRP3 (*NLR family Pyrin domain containing 3*) dont la dérégulation est à l'origine du développement de diverses pathologies humaines à composante inflammatoire, comme par exemple la néphropathie diabétique (Tang & Yiu, 2020). L'activation de l'inflammasome NLRP3 nécessite la conjonction de deux signaux, dits d'amorçage (signal ①) et d'activation (signal ②) (Figure 35).

Le premier signal résulte le plus souvent de l'engagement d'un TLR (Figure 35). Ce signal conduit à l'activation de NF- $\kappa$ B permettant d'accroître la transcription des gènes codants NLRP3 ainsi que les pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 (Bauernfeind *et al.*, 2009). À cette étape, NLRP3 est compétent pour être activé, mais en absence d'un second signal, il se trouve maintenu dans un état inactif par de nombreuses MPT (Swanson *et al.*, 2019). Le second signal, qualifié d'activateur de l'assemblage (Figure 35), est induit en réponse à la détection de divers signaux de danger traduisant des altérations structurales et/ou métaboliques de la cellule. Par exemple, lors d'une lyse cellulaire, l'ATP libéré de la cellule peut agir en tant que DAMP au niveau des cellules avoisinantes, entraînant l'ouverture de canaux protéiques. Ceci altère l'homéostasie ionique pouvant ainsi induire l'efflux d'ions potassium (K<sup>+</sup>) et/ou l'influx d'ions calcium (Ca<sup>2+</sup>) qui sont des événements connus pour activer NLRP3 (Pétrilli *et al.*, 2007). Comme nous le verrons ensuite (§ IV. 2. B), les mitochondries semblent aussi être au carrefour de nombreux stimuli activant NLRP3, puisque leur endommagement entraîne le relargage de DAMPs (Tableau 4) permettant l'activation de NLRP3 (Zhou *et al.*, 2011). NLRP3, ainsi activé, induit l'assemblage de



l'inflammasome via le recrutement de la protéine adaptatrice ASC (*Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*). Il s'agit d'une protéine contenant un domaine PYD, lui permettant d'interagir avec NLRP3, ainsi qu'un domaine CARD lui permettant d'interagir avec la pro-caspase 1. Au sein du complexe, le rapprochement de deux pro-caspases 1 entraîne leur auto activation par clivage. Sous cette forme activée, la caspase 1 entraîne la maturation puis la sécrétion des IL-1 $\beta$  et IL-18, qui sont des cytokines inductrices de la réponse inflammatoire (Dinarello, 2009). Outre cette fonction, la caspase 1 permet également d'engager la cellule dans une mort par pyroptose. Pour cela, elle induit le clivage d'une protéine cytosolique, la Gasdermine-D (GSDMD), dont la partie N-terminale s'oligomérisse pour former des pores au niveau de la membrane plasmique (Shi *et al.*, 2015). Ce processus de mort est rapide et se caractérise par une lyse osmotique de la cellule relarguant des composants inflammatoires dans le milieu extracellulaire (Shi *et al.*, 2015).

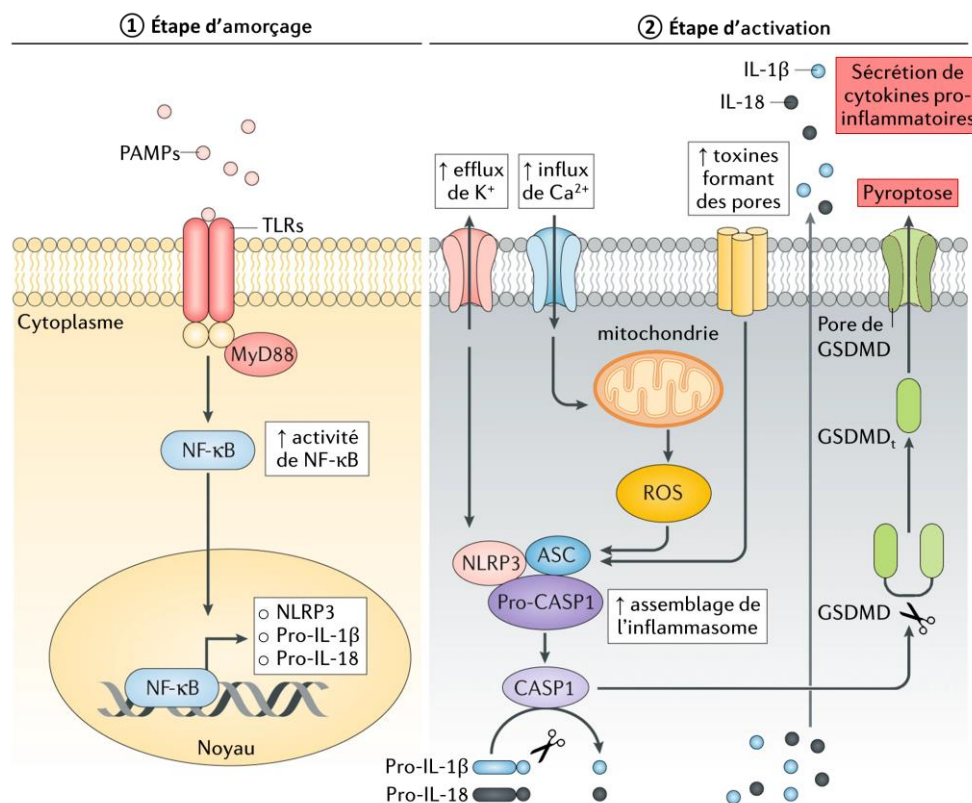


Figure 35 | Mise en place de l'inflammasome NLRP3

L'activation de l'inflammasome NLRP3 est un processus en deux étapes. ① La première étape implique la stimulation d'un PRR (un TLR ici) par un PAMP ou un DAMP. Ceci conduit à l'activation, dépendante de MYD88, du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Sa présence dans le noyau permet la synthèse de NLRP3 ainsi que des pro-IL-1 $\beta$  et 18. ② La seconde étape permet l'assemblage du complexe inflammasome. Cette étape implique divers mécanismes moléculaires tels qu'une augmentation de l'efflux de K<sup>+</sup> et de l'influx de Ca<sup>2+</sup>, l'action de toxines formant des pores à la membrane plasmique ou encore la production de ROSmt par des mitochondries endommagées. Ces mécanismes induisent le recrutement d'ASC qui se lie à NLRP3. La pro-caspase 1 se lie au complexe préformé, créant l'inflammasome. Au sein du complexe la pro-caspase 1 se voit clivée en caspase 1 (CASP1). Cette dernière permet à son tour le clivage des pro-IL-1 $\beta$  et 18, donnant les cytokines pro-inflammatoires qui seront sécrétées par la cellule. En parallèle, la caspase 1 clive également la GSDMD dont la partie N-terminale (GSDMD<sub>t</sub>) s'insère dans la membrane plasmique formant des pores, précurseurs de la mort cellulaire par pyroptose. Adaptée de (Tang & Yiu, 2020).

| DAMP                     | Récepteur       | Localisation    | Activité inflammatoire  |
|--------------------------|-----------------|-----------------|---|
| ADNmt                    | TLR9            | Endosomale      | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Activation des monocytes et macrophages</li> <li>○ Mobilisation des neutrophiles Ca<sup>2+</sup>, dégranulation et chimiotactisme</li> <li>○ Sécrétion de cytokines</li> <li>○ Développement d'arthrite</li> <li>○ Inflammation systémique des poumons et du foie</li> </ul> |
|                          | AIM2 et cGAS    | Intracellulaire | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Activation de la caspase 1</li> <li>○ Sécrétion de cytokines</li> </ul>  |
| Peptides <i>N-formyl</i> | FPR1            | Extracellulaire | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Activation des monocytes</li> <li>○ Mobilisation des neutrophiles Ca<sup>2+</sup>, dégranulation, explosion oxydative et chimiotactisme</li> <li>○ Sécrétion de cytokines</li> <li>○ Inflammation systémique des poumons et du foie</li> </ul>                               |
| TFAM                     | Non caractérisé | Extracellulaire | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Activation des monocytes</li> <li>○ Sécrétion de cytokines</li> </ul>  |
| ATP                      | P2RX7 et NLRP3  | Extracellulaire | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Activation de la caspase 1</li> <li>○ Sécrétion de cytokines</li> <li>○ Migration des neutrophiles</li> </ul>  |
| ROSmt                    | NLRP3           | Intracellulaire | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Activation de la caspase 1</li> <li>○ Sécrétion de cytokines</li> </ul>  |

Tableau 4 | Les DAMPs d'origine mitochondriale et leurs impacts sur la réponse inflammatoire

D'après les données de (West *et al.*, 2011).TFAM, *Mitochondrial Transcription Factor A* ; FPR1, *formyl-peptide receptor 1* ; P2RX7, *P2X purinoceptor 7*.

#### IV. 2. B La mitochondrie : carrefour de l'immunité innée antivirale

En 2005, une nouvelle molécule adaptatrice de la signalisation des RLRs fut découverte par quatre laboratoires indépendants (Kawai *et al.*, 2005; Meylan *et al.*, 2005; Seth *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005). Cette protéine aujourd'hui désignée sous le nom de MAVS (*Mitochondrial AntiViral Signaling*) se localise à la MME et confère aux mitochondries une place centrale dans l'induction des réponses immunitaires antivirales (Seth *et al.*, 2005).

##### IV. 2. B. (a) MAVS, un adaptateur de la cascade de signalisation antivirale

###### Présentation générale de MAVS

MAVS est une protéine adaptatrice de 540 acides aminés comprenant trois domaines fonctionnels (Figure 36). À l'extrémité N-terminale on retrouve un domaine CARD, puis une région riche en proline (RRP), suivie d'un domaine transmembranaire à l'extrémité C-terminale (Vazquez & Horner, 2015). MAVS contient également trois domaines TIMs (TRAF-Interacting Motifs), localisés dans la RRP et à proximité du domaine transmembranaire. Ce dernier domaine assure à la protéine son ancrage à divers organites tels que les peroxisomes, le RE (via les MAMs) et les mitochondries (Horner *et al.*, 2011). Le transcrit *MAVS* est un ARNm bicistronique possédant deux sites d'initiation de la traduction (Figure 36), codant ainsi pour deux formes de la protéine : FL-MAVS (*Full Length-MAVS*) et s-MAVS

(*short-MAVS*). Au cours d'une infection virale, l'expression de FL-MAVS diminue tandis que la forme tronquée, dépourvue de domaine CARD, reste constante (Brubaker *et al.*, 2014; Castanier *et al.*, 2012). Ces variations dans l'expression de MAVS sont associées à l'induction d'effecteurs de la réponse antivirale (Castanier *et al.*, 2012).

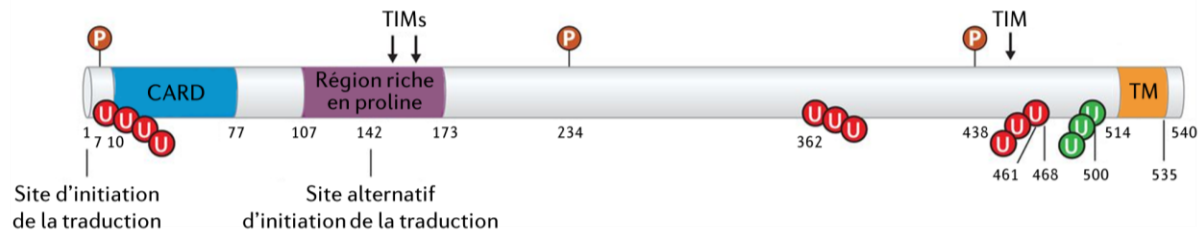


Figure 36 | **Organisation structurale de MAVS**

MAVS est une protéine de 540 acides aminés contenant un domaine CARD, une région riche en proline, trois domaines TIMs (aux positions 143 à 147, 153 à 158 et 455 à 460) ainsi qu'un domaine transmembranaire (TM). La traduction est initiée par deux sites distincts : au niveau de la méthionine en position 1 et au niveau de ce même résidu en position 142. L'activité de MAVS est régulée par des MPT telles que des phosphorylations (régulation positive pour les positions S442 et Y9 ; régulation négative pour la position T234) et des polyubiquitinylation (les chaînes en K63 sont représentées en vert et les chaînes K48 en rouge). Adaptée de (Vazquez & Horner, 2015).

#### 🌀 Signalisations dépendantes de MAVS

Lors d'une infection virale, la fonction principale de MAVS est d'induire l'activation des facteurs de transcription (IRF3, IRF7 et NF- $\kappa$ B) nécessaires à la synthèse des IFNs de types I et des cytokines pro-inflammatoires (Figure 37.A). Cette signalisation antivirale est initiée suite à la détection de PAMPs par les RLRs. Les PAMPs reconnus par RIG-I sont des ARN double brin possédant à leur extrémité 5' un groupement soit bi-phosphate soit tri-phosphate, ou bien de courts ARN simple brin (Rehwinkel & Gack, 2020). MDA5 reconnaît de longs ARN double brin (Rehwinkel & Gack, 2020) puis s'oligomérisent, formant des filaments autour de son ligand (Wu *et al.*, 2013). L'activation de RIG-I requiert ensuite l'action d'une E3 Ub ligase, appelée TRIM25 (*TRIPartite Motif-containing protein 25*), qui catalyse l'ajout de chaîne K63 d'Ub. Ceci permet la formation d'un complexe avec la protéine chaperon 14-3-3 $\epsilon$ , appelé le translocon, qui permet son adressage aux MAMs (Liu *et al.*, 2012a). L'activation des RLRs modifie leur conformation, libérant leurs domaines CARDS qui peuvent ainsi interagir avec le domaine CARD de MAVS. Cette interaction est essentielle pour l'activation de MAVS (Seth *et al.*, 2005).

Une fois activée MAVS s'oligomérisent, ce qui constitue un processus nécessaire pour la suite de la signalisation, car cela permet la fixation de protéines accessoires telles que les TRAFs (*TNF Receptor-Associated Factors*) afin de former un signalosome (Hou *et al.*, 2011; Tang & Wang, 2009). Ainsi, MAVS interagit avec TRADD et recrute TRAF2/3 et TANK (TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator). Ceci permet d'activer un premier complexe de kinases cytosoliques, formé de TBK1 et IKK $\epsilon$  (*I $\kappa$ B Kinase- $\epsilon$* ). Pour y parvenir, TBK1 est placée à proximité du signalosome via son interaction avec HSP90, une

protéine chaperon interagissant avec TOM70. De plus, TOM70 interagit avec MAVS (Liu *et al.*, 2010). Le complexe TBK1-IKK $\epsilon$  phosphoryle les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 qui se dimérisent puis se dirigent vers le noyau afin d'induire l'expression d'IFNs de type I (Figure 37.A).

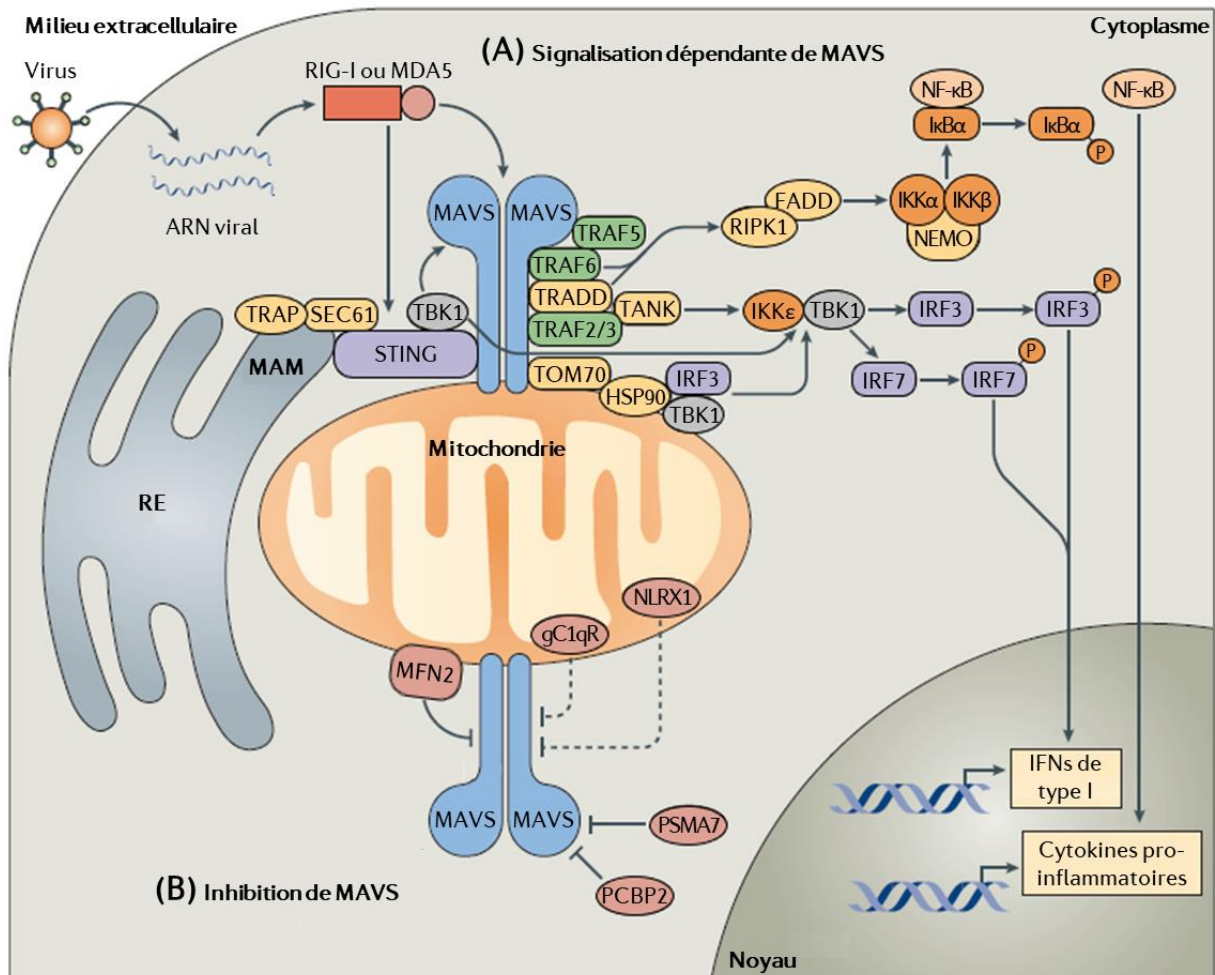


Figure 37 | Voies de signalisation dépendantes de MAVS

**(A)** Les ARN cytosoliques sont détectés par RIG-I et MDA5, qui activent MAVS via une interaction CARD-CARD. MAVS se dimérise à la surface mitochondriale puis recrute plusieurs partenaires impliqués dans la signalisation. TRAF6 et TRADD induisent la voie canonique d'activation de NF- $\kappa$ B par le biais de FADD et RIPK1. Le complexe formé d'IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et NEMO permet de lever l'inhibition exercée sur NF- $\kappa$ B qui va dans le noyau pour stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires. Grâce à ses interactions avec TRAF2/3, TRADD et TANK, MAVS active un complexe kinase (IKK $\epsilon$ -TBK1) induisant la phosphorylation d'IRF3/7. Ceci permet leur transport vers le noyau où ils stimulent l'expression des gènes codants les IFNs de type I. MAVS interagit également avec STING, une protéine résidente des MAMs, qui permet, via son interaction avec TRAP et le translocon SEC61, d'induire TBK1 et donc d'activer les IRF3/7. MAVS interagit avec TOM70 qui, elle-même en interaction avec HSP90, permet de rapprocher TBK1 et IRF3 du signalosome. **(B)** Plusieurs inhibiteurs cellulaires de cette voie de signalisation sont documentés. Ils peuvent induire la dégradation de MAVS lors d'une infections virale, comme PCBP2 et PSMA7. Les protéines mitochondriales MFN2, gC1qR et NLRX1 établiraient des interactions antagonistes avec MAVS. Adaptée de (West *et al.*, 2011).

gC1qR, Receptor for *globular head domain of Complement component 1q* ; NLRX1, *NLR family member X1* ; PCBP2, *Poly (rC)-Binding Protein 2* ; TRAP, *TRanslocon-Associated Protein*.

Dans le même temps, l'interaction entre MAVS et TRADD conduit au recrutement de FADD et RIPK1 (*Receptor-Interacting Protein Kinase 1*) permettant d'induire la signalisation canonique de NF- $\kappa$ B

(Michallet *et al.*, 2008). En effet, en condition basale, les dimères NF- $\kappa$ B sont maintenus dans le cytoplasme à un état inactif en raison de leur interaction avec l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$ . Le signalosome de MAVS, via FADD-RIPK1, permet l'activation du complexe IKK (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et NEMO [*NF- $\kappa$ B Essential MOdulator*]), qui phosphoryle I $\kappa$ B $\alpha$ , entraînant la dégradation protéasomale de ce dernier. Ainsi, NF- $\kappa$ B est libéré ce qui lui permet d'aller dans le noyau où il initie l'expression de gènes pro-inflammatoires (Figure 37.A).

#### Régulation de l'inflammasome par MAVS

Dans la mesure où MAVS induit la voie canonique de NF- $\kappa$ B, la signalisation dépendante de MAVS peut être considérée comme un premier signal d'induction de l'inflammasome. Une étude suggère que MAVS pourrait aussi agir en tant que senseur des ROSmt (Park *et al.*, 2013). En effet, en présence de ROSmt il est montré que MAVS s'associe à NLRP3, permettant son oligomérisation ainsi que l'activation de la caspase 1 (Park *et al.*, 2013). De plus, une étude postérieure a montré que MAVS s'oligomérisait à la surface mitochondriale en présence de ROSmt et de manière indépendante des RLRs (Buskiewicz *et al.*, 2016). Ainsi, au-delà de son rôle dans la production d'IFNs, MAVS contribue aussi à l'immunité innée inflammatoire en recrutant NLRP3 aux mitochondries endommagées afin de faciliter l'assemblage de l'inflammasome.

#### IV. 2. B. (b) La dynamique mitochondriale régule l'immunité innée

L'organisation du réseau de mitochondries est impliquée dans la régulation de la signalisation dépendante des RLRs. Il a été montré que le rôle de MFN1 sur la dynamique mitochondriale impacte directement les réponses antivirales de la cellule. MAVS interagit avec MFN1 et la fusion mitochondriale est essentielle pour une transduction efficace du signal dépendant des RLRs (Castanier *et al.*, 2010; Onoguchi *et al.*, 2010). En d'autres termes, la fragmentation du réseau mitochondrial, induite par les déplétions de MFN1 ou OPA1, se caractérise par une diminution significative de l'activation de NF- $\kappa$ B et d'IRF3 dans un contexte viral. Le cheminement inverse confirme ces observations puisque les déplétions de DRP1 ou FIS1, qui entraînent l'élongation des mitochondries, augmente la signalisation RLR (Castanier *et al.*, 2010). Il est également montré que MFN2 établit une interaction antagoniste avec MAVS en prévenant son oligomérisation (Figure 37.B) (Horner *et al.*, 2011; Yasukawa *et al.*, 2009). La surexpression de MFN2 bloque en effet l'activation de NF- $\kappa$ B et d'IRF3, alors que l'infection virale dans des cellules dépourvues de MFN2 montre une induction d'IFN- $\beta$  supérieure (Yasukawa *et al.*, 2009).



## IV. 2. B. (c) Importance des contacts entre les mitochondries et le RE

Les zones de contact des mitochondries avec le RE, appelées les MERCs (*Mitochondria-Endoplasmic Reticulum Contact sites*) sont importantes pour les fonctions mitochondriales, notamment dans les réponses innées de la cellule. Le RE est aussi impliqué dans les réponses antivirales de la cellule grâce à la protéine STING (*STimulatory INterferon Genes*) qui fut identifiée en 2008 (Zhong *et al.*, 2008). Il s'agit d'une protéine possédant quatre domaines TM lui permettant de s'ancrer à la membrane externe du RE où elle sert d'adaptateur pour l'activation d'IRF3 et de NF- $\kappa$ B (Figure 38) (Chen *et al.*, 2016).

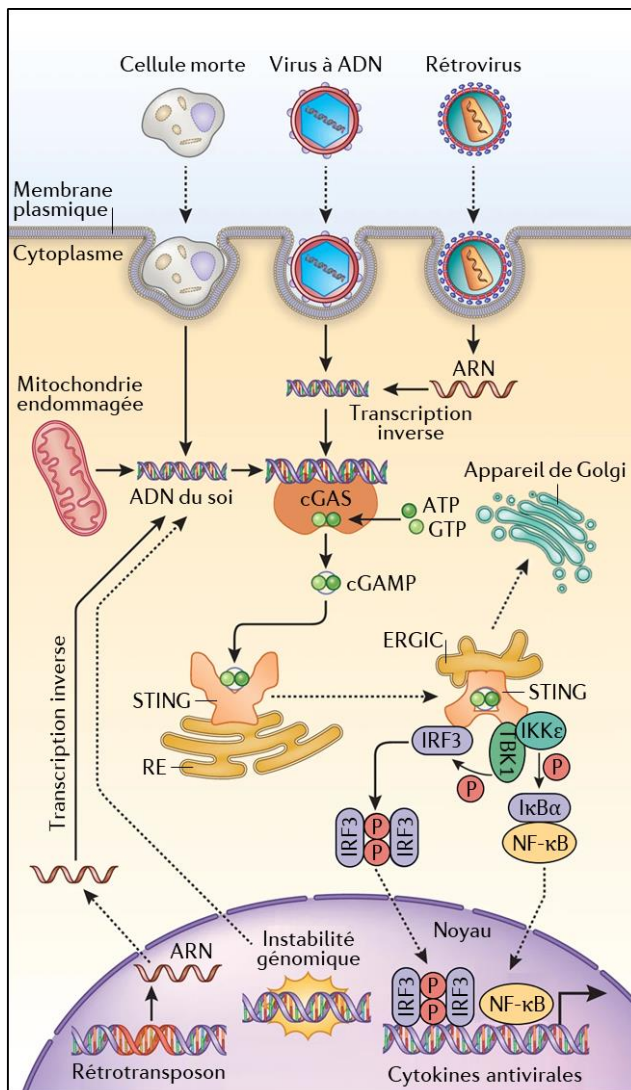


Figure 38 | Voies de signalisation dépendantes de STING

La présence d'ADN dans le cytoplasme est perçue comme un PAMP lorsqu'il provient d'une infection virale (ou d'un rétro transposon) ou comme un DAMP lorsqu'il est relargué dans le cytoplasme en provenance de mitochondries endommagées, d'instabilité génomique ou encore de cellules mortes. Ces ADN sont détectés par cGAS, qui catalyse la synthèse de cGAMP à partir d'ATP et de GTP. Le cGAMP produit se fixe à STING au niveau du RE, entraînant le transport de STING vers l'appareil de Golgi et l'ERGIC. STING active les kinases TBK1 et IKK $\epsilon$  qui permettent respectivement l'activation d'IRF3 et de NF- $\kappa$ B. Ces facteurs de transcription vont dans le noyau où ils induisent l'expression d'IFNs de type I et de cytokines pro-inflammatoires. Adaptée de (Chen *et al.*, 2016).

L'activation de STING dépend principalement de la détection d'ADN dans le cytoplasme par le senseur cGAS (Figure 32). La fixation d'ADN induit un changement de conformation du site actif de cGAS, catalysant la synthèse de cGAMP (*cyclic GMP-AMP*) à partir de GTP et d'ATP (Zhang *et al.*, 2014). Le cGAMP produit agit en tant que second messager en se fixant à STING, ce qui induit son activation par un changement de conformation (Zhang *et al.*, 2014). STING arrive au niveau d'une structure

intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi appelée l'ERGIC (*Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment*). Au cours de ce transport, l'extrémité C-terminale de STING fixe et active TBK1, qui en retour phosphoryle IRF3 (Chen *et al.*, 2016). STING stimule également la voie canonique de NF- $\kappa$ B (Chen *et al.*, 2016). Ainsi, les facteurs de transcription IRF3 et NF- $\kappa$ B gagnent le noyau où ils induisent l'expression de cytokines antivirales et pro-inflammatoires (Figure 38).

Au vu de la localisation dans le RE de STING, ainsi que des protéines impliquées dans la voie de signalisation qu'elle induit, il fut envisagé puis démontré que STING et MAVS communiquent ensemble au niveau des MAMs lors d'une infection virale. Premièrement, il a été montré que STING pouvait spécifiquement améliorer la réponse antivirale dépendante de RIG-I (Ishikawa & Barber, 2008). En effet, STING interagit directement avec RIG-I, MAVS et TBK1, permettant d'activer IRF3 (Zhong *et al.*, 2008). De plus, comme vu juste avant, lors d'une infection virale l'élongation des mitochondries potentialise la signalisation RLR, et une étude démontre que cet effet est dû à l'augmentation des sites de contacts au niveau des MAMs, grâce à l'association de MAVS avec STING (Castanier *et al.*, 2010). Le pool de MFN2 localisé aux mitochondries interagit avec le pool de MFN2 présent au RE permettant de rapprocher les structures, où MAVS et STING peuvent ainsi entrer en interaction. Par conséquent au niveau des MAMs, MAVS et STING, qui sont aussi actifs indépendamment l'un de l'autre, peuvent agir de concert afin d'améliorer les réponses antivirales de la cellule. Deuxièmement, STING est présente dans les MAMs puisqu'elle interagit avec les membres du complexe translocon du RE, TRAP (*Translocon-Associated Protein*) et SEC61 (Figure 37.A), des interactions connues pour être essentielles aux activités antivirales de STING (Ishikawa & Barber, 2008).

Avant la mise en place de l'inflammasome, le récepteur NLRP3 est initialement associé au RE. La production de ROS par les mitochondries constitue le second messager permettant la relocalisation de NLRP3 aux MERCs, où s'assemble l'inflammasome (Zhou *et al.*, 2011). Les stress du RE s'observent dans de nombreuses pathologies humaines et sont souvent associés à l'inflammation (Mohanty *et al.*, 2019). Une étude rapporte qu'une infection bactérienne inductrice de stress du RE, permettait d'engager NLRP3 au niveau des mitochondries. Cette action induit une boucle d'amplification qui accroît la libération d'éléments mitochondriaux pro-inflammatoires, augmentant l'activation de NLRP3 (Bronner *et al.*, 2015). Par conséquent, les stress au niveau du RE pourraient impacter les mitochondries et favoriser l'activation de l'inflammasome. L'ensemble de ces données rend compte de l'importante coopération existant entre les mitochondries et le RE quant à l'induction des réponses immunitaires innées.

### IV. 3 Stratégies d'échappement à l'immunité mitochondriale par les virus

Dans ce dernier paragraphe nous verrons, à travers une liste non-exhaustive d'exemples, quelques mécanismes développés par les virus afin de contourner l'immunité innée dépendante des mitochondries (Tableau 5). Les mécanismes qui seront présentés ici se concentreront uniquement sur l'altération de la morphodynamique des mitochondries, ainsi que sur la dégradation autophagique d'acteurs mitochondriaux de l'immunité innée. Enfin, ce paragraphe se conclura sur une brève revue des stratégies d'échappement connues chez l'EBV (Tableau 6 - Figure 39).

#### IV. 3. A Altération de la morphodynamique mitochondriale

La dynamique mitochondriale est un processus sensible aux changements physiologiques de la cellule et qui est rapidement régulée afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. À titre d'exemple, une infection virale constitue un stress pouvant impacter la dynamique mitochondriale. Certains virus ont développé des stratégies leur permettant de moduler la morphologie du réseau mitochondrial à leur profit, notamment en permettant de diminuer l'immunité innée pour favoriser leur réplication (Tableau 5).

Au cours de l'infection par le HCMV, la protéine virale vMIA induit la fission mitochondriale, ayant pour conséquence de réduire les contacts entre les mitochondries et le RE. Ainsi, vMIA interrompt l'interaction entre MAVS et STING conduisant à l'inhibition de la signalisation dépendante de MAVS (Castanier *et al.*, 2010). Une récente étude rapporte qu'une autre protéine du HCMV, la protéine du tégument US9, altère les mitochondries. En effet, US9 s'accumule aux mitochondries et réduit le  $\Delta\Psi_m$ , entraînant la délocalisation de MAVS vers le cytoplasme. Cette perte de localisation mitochondriale de MAVS se traduit par l'inhibition de l'expression d'IFNs de type I (Choi *et al.*, 2018). Les auteurs de cette étude ne discutent pas de l'impact d'US9 sur la morphodynamique mitochondriale, mais les images de microscopie semblent indiquer que la protéine virale induit, outre la perte du  $\Delta\Psi_m$ , de la fission. Le phénomène de fission est également observé lors de l'infection par le virus de la grippe A (IAV pour *Influenza A Virus*), un virus à ARN de polarité (-). Après l'infection par IAV, la protéine virale PB1-F2 rejoint l'espace intermembranaire des mitochondries via les canaux formés de TOM40, entraînant la perte du  $\Delta\Psi_m$ . À ce niveau, PB1-F2 induit la fragmentation du réseau mitochondrial en induisant la dégradation de I-OPA1, une protéine impliquée dans la fusion mitochondriale (Yoshizumi *et al.*, 2014). Ces altérations mitochondriales sont corrélées à la diminution de la réponse IFN de type I, ainsi qu'à l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 (Yoshizumi *et al.*, 2014). Comme nous le reverrons plus tard, les infections par HBV (*Hepatitis B Virus*) ou HCV (*Hepatitis C Virus*) induisent aussi une augmentation de la fission mitochondriale, qui est favorable à la réplication virale (Kim *et al.*, 2013, 2014). Ces deux



études montrent que l'induction de la fission mitochondriale réduit les réponses antivirales, ce qui suggère que la fusion est importante pour une transduction efficace des signaux régissant l'immunité antivirale.

| Stratégie                              | Cible(s)   | Virus (Protéine)             | Mécanisme(s) impacté(s)  | Référence(s)  |  |
|--|--|------------------------------|--|---|--|
| Altération au niveau des mitochondries | $\Delta\Psi_m$   | HCMV (US9)                   | <ul style="list-style-type: none"> <li><math>\searrow</math> du <math>\Delta\Psi_m</math> entraînant la délocalisation de MAVS vers le cytoplasme</li> <li>Perte d'activité de MAVS et STING inhibant l'induction de la réponse IFN de type I</li> </ul>   | (Choi <i>et al.</i> , 2018)   |  |
|  |  | IAV (PB1-F2)                 | <ul style="list-style-type: none"> <li><math>\searrow</math> du <math>\Delta\Psi_m</math> et altération de la machinerie de fusion mitochondriale (<math>\nearrow</math> fission)</li> <li>Inhibition de l'immunité innée (<math>\searrow</math> IFN-<math>\beta</math>, NF-<math>\kappa</math>B et inflammasome NLRP3)</li> </ul> | (Yoshizumi <i>et al.</i> , 2014)  |  |
|  | $\nearrow$ Fission                                     | HCMV (vMIA)                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Induction de la fission mitochondriale et <math>\searrow</math> des MERCs</li> <li>Perte de l'interaction MAVS-STING altérant les réponses antivirales</li> </ul>   | (Castanier <i>et al.</i> , 2010)  |  |
|  |  | HCV                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>Activation de la fission dépendante de DRP1 (<math>\nearrow</math> phosphorylation Ser-616)</li> <li>Induction de la mitophagie (voir plus bas)</li> </ul>  | (Kim <i>et al.</i> , 2014)  |  |
|  |  | HBV (HBx)                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>Translocation de DRP1 aux mitochondries après sa phosphorylation (Ser-616)</li> <li>Induction de la fission puis de la mitophagie (voir plus bas)</li> </ul>  | (Kim <i>et al.</i> , 2013)  |  |
|  | $\nearrow$ Fusion                                      | IAV et IBV                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Induction de l'élongation mitochondriale réduisant les MERCs au niveau des MAMs</li> <li><math>\searrow</math> de l'expression des ARNm <i>IFN-<math>\beta</math></i> et <i>IFN-<math>\lambda</math>1</i></li> </ul>  | (Pila-Castellanos <i>et al.</i> , 2021)   |  |
|  |  | DENV (NS4B)                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Induction de l'élongation mitochondriale par déphosphorylation de DRP1 (Ser-616)</li> <li><math>\searrow</math> des MERCs et blocage de l'expression d'IFN-<math>\beta</math></li> </ul>  | (Chatel-Chaix <i>et al.</i> , 2016 ; Barbier <i>et al.</i> , 2017)  |  |
|  |  | SARS-CoV-1 (ORF-9b)          | <ul style="list-style-type: none"> <li>ORF-9b induit l'élongation mitochondriale par dégradation protéasomale de DRP1</li> <li>Interaction avec et dégradation de MAVS, inhibant la voie RLR-MAVS</li> </ul>   | (Shi <i>et al.</i> , 2014)  |  |
|  | Dégradation autophagique d'acteurs de l'immunité innée | cGAS                         | DENV (NS2B)  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Stimulation de l'autophagie entraînant la dégradation lysosomale de cGAS</li> <li>Inhibition de la voie cGAS-STING (<math>\searrow</math> IFN-<math>\beta</math>)</li> </ul>   | (Aguirre <i>et al.</i> , 2017)                           |
|  |  |                              | STING  | <ul style="list-style-type: none"> <li>HPV-16 (E7) <ul style="list-style-type: none"> <li>E7 interagit avec NLRX1 induisant la dégradation de STING dépendante de NLRX1</li> <li>Inhibition de la voie cGAS-STING (<math>\searrow</math> ARNm <i>IFN-<math>\beta</math></i>)</li> </ul> </li> <li>HSV-1 <ul style="list-style-type: none"> <li>Induction autophagique par STING induisant sa propre dégradation</li> <li>Inhibition de la voie cGAS-STING (<math>\searrow</math> ARNm <i>IFN-<math>\beta</math></i>)</li> </ul> </li> </ul> | (Luo <i>et al.</i> , 2020)<br>(Liu <i>et al.</i> , 2019) |
| Mitochondrie et/ou MAVS                |  | HPIV3 (M)                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>M interagit avec TUFM et LC3 pour induire la mitophagie</li> <li>La séquestration mitochondriale inhibe l'expression des ARNm <i>IFN-<math>\beta</math></i></li> </ul>  | (Ding <i>et al.</i> , 2017)   |  |
|  |  | KSHV (vIRF-1)                | <ul style="list-style-type: none"> <li>vIRF-1 interagit avec MAVS et NIX induisant la mitophagie</li> <li>Dégradation de MAVS inhibant sa signalisation (<math>\searrow</math> IFN-<math>\beta</math>)</li> </ul>  | (Hwang & Choi, 2015 ; Vo <i>et al.</i> , 2019)  |  |
|  |  | MV-Edm                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>Induction d'une mitophagie dépendante de p62/SQSTM1. Perte d'activité de MAVS</li> <li>Diminution de l'activité de la voie RLR-MAVS (<math>\searrow</math> ARNm <i>IFN-<math>\beta</math></i>)</li> </ul>   | (Xia <i>et al.</i> , 2014)  |  |
|  |  | BKPyV (Agno)                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Induction de la mitophagie dépendante de p62/SQSTM1. Perte d'activité de MAVS</li> <li>Inhibition de la réponse IFN (translocation nucléaire d'IRF3 et expression d'IFN-<math>\beta</math>)</li> </ul>  | (Manzetti <i>et al.</i> , 2020)   |  |
|  |  | HTNV (Gn)                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>Gn interagit avec TUFM et LC3 pour induire la mitophagie</li> <li>Dégradation de MAVS inhibant l'induction de la réponse IFN de type I</li> </ul>   | (Wang <i>et al.</i> 2019)   |  |
|  |  | IAV (PB1-F2)                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>PB1-F2 interagit avec TUFM et LC3 pour induire la mitophagie</li> <li>Dégradation de MAVS inhibant l'induction de la réponse IFN de type I</li> </ul>   | (Wang <i>et al.</i> , 2020b)  |  |
|  |  | HIV-1                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>Induction de la fission mitochondriale et de la mitophagie lors de l'infection productive</li> <li>Inhibition de l'inflammasome NLRP3 protégeant les cellules de la mort</li> </ul>   | (Ojeda <i>et al.</i> , 2018)  |  |
|  |  | HCV                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>Induction de la fission mitochondriale précède l'induction de la mitophagie</li> <li>Inhibition de l'apoptose améliorant la propagation virale</li> </ul>   | (Kim <i>et al.</i> , 2014)  |  |
|  |  | HBV (HBx)                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>HBx induit de la fission et un mito-agrèsome conduisant à la mitophagie</li> <li>Inhibition de l'apoptose améliorant la persistance virale</li> </ul>   | (Kim <i>et al.</i> , 2013)  |  |
|  |  | CSFV, VEEV, PRRSV, NDV, TGEV | <ul style="list-style-type: none"> <li>Induction de la mitophagie (par différents mécanismes suivant le virus)</li> <li>Inhibition de l'apoptose améliorant la réplication virale</li> </ul>   | (Gou <i>et al.</i> , 2017 ; Keck <i>et al.</i> , 2017 ; Li <i>et al.</i> , 2016 ; Meng <i>et al.</i> , 2014 ; Zhu <i>et al.</i> , 2016)   |  |

Tableau 5 | Exemple d'échappement à l'immunité innée par les virus

Liste non-exhaustive de différentes stratégies virales pour contourner les mécanismes de l'immunité innée.  $\Delta\Psi_m$ , potentiel de membrane mitochondriale ; BKPyV, *BK PolyomaVirus* ; CSFV, *Classical Swine Fever Virus* ; DENV, *Dengue Virus* ; Gn, Glycoprotéine ; HPIV3, *Human Parainfluenza Virus 3* ; HPV-16, *Human Papillomavirus subtype-16* ; HTNV, *HanTaan Virus* ; MV-Edm, *Measles Virus Edmonston strain* ; NDV, *Newcastle Disease Virus* ; NS, *Non-Structural protein* ; NLRX1, *NOD-Like Receptor member X1* ; PRRSV, *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* ; TGEV, *Transmissible GastroEnteritis Virus* ; TUFM, *Tu translation elongation Factor Mitochondrial* ; VEEV, *Venezuelan Equine Encephalitis Virus* ; vIRF-1, *viral Interferon Regulatory Factor-1*.

Cependant, au cours de certaines infections virales, une diminution de la réponse immunitaire antivirale peut également être associée à l'élongation des mitochondries. Une récente étude

démontre en effet que l'infection par le virus de la grippe B (IBV pour *Influenza B Virus*), ou par les sous-types H1N1 et H3N2 d'IAV, augmente la fusion des mitochondries, un phénomène associé à la perte des MERCs bloquant ainsi l'immunité innée (Pila-Castellanos *et al.*, 2021). Cette observation peut paraître surprenante car, comme mentionné plus haut, la protéine PB1-F2 d'IAV induit la fission et bloque la réponse IFN. Cependant, il faut savoir que PB1-F2 ne s'exprime pas chez IBV et que la forme complète de la protéine n'est retrouvée que chez 11 % des souches de sous-type H1N1 (Kamal *et al.*, 2017; Pila-Castellanos *et al.*, 2021). La protéine virale responsable de l'élongation des mitochondries n'a pas été identifiée pour le moment. Le traitement des cellules infectées par une drogue inductrice de la fission, le Mito-C, restaure la morphologie des mitochondries et réduit la réplication d'IAV ou d'IBV, démontrant l'importance de l'élongation mitochondriale dans l'échappement à l'immunité innée (Pila-Castellanos *et al.*, 2021). L'élongation des mitochondries est également observée dans le contexte de l'infection par le virus de la Dengue (DENV), un autre virus à ARN. En effet, la protéine virale NS4B entraîne la déphosphorylation de DRP1 en position Ser-616, réduisant l'activité de cette dernière et conduisant à l'élongation des mitochondries (Barbier *et al.*, 2017; Chatel-Chaix *et al.*, 2016). Ces mitochondries allongées interagissent physiquement avec les usines de réplication virale, ce qui en retour altère les contacts mitochondries-RE nécessaires à la signalisation RLR (Chatel-Chaix *et al.*, 2016). Ainsi, l'élongation mitochondriale, associée à l'infection par le DENV, inhibe l'expression d'IFNs et favorise la réplication virale (Chatel-Chaix *et al.*, 2016). L'expression de la protéine ORF-9b du SARS-CoV-1 (*Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 1*) induit également l'élongation du réseau mitochondrial en interagissant avec DRP1 afin de faciliter sa dégradation protéasomale. ORF-9b interagit également avec MAVS entraînant son ubiquitinylation et sa dégradation conduisant à inhiber la production d'IFNs (Shi *et al.*, 2014).

De nombreuses études montrent aujourd'hui comment les virus modulent la dynamique mitochondriale afin d'assurer leur réplication. Ce champ de recherche pourrait à l'avenir permettre d'identifier de nouvelles molécules thérapeutiques (Cervantes-Silva *et al.*, 2021), ciblant la morphodynamique mitochondriale, dans le traitement de certaines infections virales.

### IV. 3. B La dégradation autophagique et la mitophagie

Bien que l'autophagie constitue une barrière efficace contre la réplication virale (Deretic *et al.*, 2013), l'évolution a permis aux virus d'acquérir des éléments leur permettant de détourner la machinerie autophagique à leur profit. Il n'est donc pas étonnant de voir certaines protéines virales induire la dégradation autophagique de facteurs cellulaires afin de diminuer l'immunité innée et ainsi améliorer la réplication virale (Tableau 5). Parmi les protéines cellulaires dégradées, nous allons notamment trouver cGAS, STING et MAVS.

L'infection par le DENV, outre le fait d'altérer la dynamique mitochondriale (Chatel-Chaix *et al.*, 2016), induit des dommages mitochondriaux conduisant au relargage d'ADNmt pouvant être détecté par cGAS (Aguirre *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017). Afin d'éviter la mise en place d'une réponse antivirale, NS2B, le cofacteur de la protéase NS3 du DENV, stimule l'autophagie et induit la dégradation lysosomale de cGAS, bloquant ainsi la signalisation de l'axe cGAS-STING (Aguirre *et al.*, 2017). La protéine E7 de HPV-16 (*Human PapillomaVirus subtype-16*) inhibe également la signalisation dépendante de STING, par le biais de NLRX1 (Luo *et al.*, 2020). NLRX1 est une protéine mitochondriale qui, en interaction avec TUFM (*Tu translation elongation Factor Mitochondrial*), assure le recrutement de protéines autophagiques, telles que BECN1 et ATG5-ATG12, afin de stimuler l'autophagie (Lei *et al.*, 2016). Via son interaction avec NLRX1, la protéine virale E7 de HPV-16 induit la dégradation autophagique de STING (Luo *et al.*, 2020). Cet échappement à l'immunité, induit par la protéine E7, participe à la progression des cancers causés par le génotype 16 de HPV (Luo *et al.*, 2020). Cela n'est pas la première fois que NLRX1 est impliquée dans la régulation de l'immunité innée via son impact sur l'autophagie. En effet, au cours de l'infection par le VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*) NLRX1 stimule l'autophagie tout en atténuant la signalisation dépendante des RLRs (Lei *et al.*, 2012). Lors d'une infection par HSV-1, STING interagit avec LC3 puis est dégradée par autophagie. En effet, l'activation de STING induit une autophagie non-canonique dépendante d'ATG5 et conduisant, après activation de TBK1, à sa propre dégradation autophagique afin de réguler les réponses immunitaires innées (Liu *et al.*, 2019).

#### IV. 3. B. (a) Implication de la mitophagie dans l'inhibition de la réponse IFN

Lors d'une infection virale, l'activité de MAVS joue un rôle fondamental dans la mise en place de la réponse antivirale (Figure 37). Au vu de la localisation de MAVS à la MME, les virus ont développé des stratégies altérant les fonctions de cette protéine au niveau de l'organite. En effet, plusieurs études montrent que certains virus induisent de la mitophagie pour atténuer la réponse IFN et améliorer leur réplication (Tableau 5).

Il a récemment été montré que la protéine de matrice (M) du HPIV3 (*Human ParaInfluenza Virus type 3*) stimule une mitophagie indépendante de PARKIN (Ding *et al.*, 2017). Les auteurs ont observé que M interagit avec LC3 et TUFM, faisant de M la première protéine virale à agir comme un récepteur autophagique (Ding *et al.*, 2017). Cependant, en contexte infectieux cette mitophagie semble être incomplète, c'est-à-dire qu'elle n'aboutirait pas à la dégradation des mitochondries, puisque les auteurs ont montré dans leur précédente étude que la phosphoprotéine (P) de HPIV3 bloque la fusion autophagosome-lysosome (Ding *et al.*, 2014). Néanmoins, la séquestration des mitochondries dans les autophagosomes, médiée par la protéine M, est suffisante pour inhiber la production d'IFNs de type I

(Ding *et al.*, 2017). Dans cette étude, Ding *et al.* ne se sont pas intéressés à l'impact de M au niveau de MAVS, mais il est probable que la séquestration des mitochondries limite l'accès de MAVS à ses partenaires en aval de la voie de signalisation. De manière générale, l'induction d'une mitophagie complète peut entraîner la dégradation de MAVS, une stratégie dont bénéficient certains virus en leur permettant d'inhiber la réponse IFN. C'est le cas pour KSHV dont la protéine vIRF-1 (*viral Interferon Regulatory Factor-1*) interagit avec MAVS. Il a été initialement montré que cette interaction est antagoniste puisqu'elle inhibe l'oligomérisation et la signalisation dépendante de MAVS (Hwang & Choi, 2015). De plus, lors de la réactivation du virus, l'expression de vIRF-1 est associée à une diminution d'expression de MAVS (Hwang & Choi, 2015). En 2019, le même laboratoire publia une seconde étude éclairant le mécanisme d'action de vIRF-1 (Vo *et al.*, 2019). Il fut observé une diminution de marqueurs mitochondriaux (TOM20, MAVS, ADNmt) au cours de la réplication virale, suggérant une dégradation des mitochondries. En effet, vIRF-1 interagit via son extrémité N-terminale avec le récepteur mitophagique NIX afin d'induire la dégradation autophagique des mitochondries (Vo *et al.*, 2019). L'inhibition pharmacologique de la mitophagie induite par vIRF-1 inhibe la réplication de KSHV, confirmant l'importance de cette mitophagie dans le contrôle des réponses antivirales (Hwang & Choi, 2015; Vo *et al.*, 2019). La souche vaccinale atténuée du virus de la rougeole (MV-Edm pour *Measles Virus Edmonston strain*) et la protéine Agno du BKPyV (*BK-PolyomaVirus*) adoptent une stratégie similaire d'échappement à l'immunité innée. Ces deux virus induisent en effet une mitophagie dépendante de p62/SQSTM1, entraînant la perte d'activité de MAVS (Manzetti *et al.*, 2020; Xia *et al.*, 2014). L'extinction de p62/SQSTM1 dans les cellules infectées par le virus MV-Edm inhibe la mitophagie et restaure l'expression de MAVS, confirmant la dégradation mitophagique de MAVS (Xia *et al.*, 2014). La glycoprotéine (Gn) et la nucléocapside (NP) de l'Hantavirus (HTNV pour *HanTaaN Virus*) modulent respectivement la mitophagie et l'autophagie (Wang *et al.*, 2019). Aux étapes précoces de l'infection, la Gn stimule la mitophagie en interagissant avec TUFM et LC3 (Wang *et al.*, 2019) comme un récepteur autophagique, à l'instar de la protéine M du HPIV3 (Ding *et al.*, 2017). Cette mitophagie complète restreint l'immunité innée en permettant la dégradation de MAVS (Wang *et al.*, 2019). Aux étapes tardives de l'infection, l'autophagie induite par HTNV est incomplète (Wang *et al.*, 2019). En effet, la NP entre en compétition avec Gn pour l'interaction avec LC3 et interagit avec SNAP29 pour inhiber la fusion autophagosome-lysosome (Wang *et al.*, 2019). Cette inhibition de l'autophagie met fin à la dégradation de Gn et permet son incorporation dans les futurs virions. Cette étude met en lumière comment HTNV régule différemment l'autophagie suivant les étapes de son cycle afin d'optimiser sa réplication. Comme discuté plus haut, la protéine PB1-F2 d'IAV est connue pour induire la fission mitochondriale et bloquer la production d'IFNs (Yoshizumi *et al.*, 2014). Une récente étude apporte de nouveaux éléments sur ce mécanisme inhibiteur en montrant que PB1-F2 est associée aux mitochondries via son interaction avec TUFM (Wang *et al.*, 2020b). Dans cette étude, il est une nouvelle

fois montré qu'une protéine virale sert de récepteur autophagique puisque PB1-F2 interagit également avec LC3 pour stimuler la mitophagie (Wang *et al.*, 2020b). Les auteurs montrent que le domaine LIR de PB1-F2, situé en C-terminal, est essentiel pour la dégradation mitophagique de MAVS (Wang *et al.*, 2020b).

On s'aperçoit que de nombreux virus sont capables d'induire une mitophagie provirale. Ces dernières années, plusieurs études ont même mis en évidence que cette induction de la mitophagie pouvait intervenir directement via des protéines virales, qui agissent comme des récepteurs mitophagiques. En effet, les protéines M de HPIV3, Gn de HTNV et PB1-F2 de IAV possèdent chacune un domaine LIR leur permettant de connecter TUFM et LC3 afin d'adresser les mitochondries aux phagophores. Il serait intéressant de rechercher si pour d'autres virus, il peut être identifié des facteurs viraux agissant de manière analogue, car ils pourraient constituer de nouvelles cibles dans la recherche de thérapies antivirales.

#### IV. 3. B. (b) Atténuation de l'inflammasome par induction de la mitophagie

En réduisant la libération d'ADNmt et la production de ROSmt, certaines études ont montré que la mitophagie constitue un moyen de contrôler l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 (Mishra *et al.*, 2021; Zhong *et al.*, 2016). Dans un contexte viral, ce lien a été démontré lors de l'infection par le VIH-1 dans un modèle d'astrocytes humains (Ojeda *et al.*, 2018). L'infection par le VIH-1 peut donner lieu à une infection abortive ou productive. Dans le premier cas, les astrocytes meurent par pyroptose en raison d'une activation exacerbée de l'inflammasome NLRP3. En revanche, l'infection productive module la dynamique mitochondriale jusqu'à induire la mitophagie, prévenant l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 et protégeant les cellules de la mort (Ojeda *et al.*, 2018). Concernant l'IAV, la protéine PB1-F2 était précédemment associée à un blocage de l'inflammasome NLRP3 (Yoshizumi *et al.*, 2014). Il est envisageable que l'activité pro-mitophagique de PB1-F2 explique cet impact sur l'inflammasome (Wang *et al.*, 2020b). En effet, Lupfer *et al.* ont montré en 2013 qu'au cours de l'infection par IAV, la mitophagie permet d'éliminer les mitochondries endommagées productrices de ROSmt et de réduire l'initiation de la réponse inflammatoire (Lupfer *et al.*, 2013).

Pour l'heure, encore peu d'études démontrent l'influence de la mitophagie viro-induite sur l'atténuation des inflammasomes. Ces recherches devraient être approfondies car elles ouvrent de nouvelles perspectives quant à la compréhension des mécanismes d'échappement à l'immunité innée.

#### IV. 3. B. (c) Atténuation de l'apoptose antivirale par induction de la mitophagie

Dans le cadre d'une infection virale, la suppression de l'apoptose va généralement avoir un effet délétère chez l'hôte tout en conférant un avantage pour les virus (Kennedy, 2015). Comme nous

l'avons vu précédemment (§ II. 3), la mitophagie permet de contrôler l'apoptose en éliminant certaines sources de stress (Figure 23). Plusieurs études montrent qu'en induisant la mitophagie certains virus inhibent l'apoptose et améliorent leur réplication (Tableau 5).

Les virus responsables d'hépatites en sont un bon exemple. Le HCV augmente la fission mitochondriale, permettant d'initier la mitophagie (Kim *et al.*, 2014). Cette mitophagie prévient l'entrée en apoptose puisque l'inhibition génétique de la mitophagie augmente l'activité de la caspase 3 et la mort cellulaire (Kim *et al.*, 2014). La même stratégie est adoptée par HBV qui induit la fission mitochondriale ainsi que la formation d'un mito-agrèsome permettant de stimuler la mitophagie (Kim *et al.*, 2013). La protéine HBx fut identifiée comme à l'origine des altérations du phénotype mitochondrial (Kim *et al.*, 2013). De plus, l'inhibition de la mitophagie induit de l'apoptose, réduisant la réplication d'HBV (Kim *et al.*, 2013). De nombreuses autres études rapportent ce lien entre la mitophagie et l'apoptose dans le cadre d'infection par des virus animaux tels que CSFV (*Classical Swine Fever Virus*), VEEV (*Venezuelan Equine Encephalitis Virus*), PRRSV (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*), NDV (*Newcastle Disease Virus*) et TGEV (*Transmissible GastroEnteritis Virus*) (Gou *et al.*, 2017; Keck *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2016; Meng *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2016). Ces virus partagent la même stratégie à savoir que premièrement ils induisent, par différents mécanismes, la mitophagie et deuxièmement que cette mitophagie atténue l'apoptose pour permettre la réplication virale. Concernant le NDV, il s'agit d'un virus aviaire étudié pour ses propriétés oncolytiques dans le traitement des cancers humains, notamment certaines formes de cancers du poumon. Meng *et al.* ont observé que le traitement par la 3-MA (3-MéthylAdénine), un inhibiteur de l'autophagie, augmente la lyse des cellules tumorales après infection par le NDV (Meng *et al.*, 2014). Ce travail démontre l'importance de cibler l'autophagie dans un contexte de virothérapie anti-cancéreuse.

Les études sur les interactions entre mitophagie, apoptose et virus offrent d'importantes perspectives thérapeutiques. Notamment, elles pourraient permettre de mieux comprendre l'oncogénèse associée à certains virus, comme par exemple l'EBV.

#### IV. 3. C L'échappement à l'immunité innée : exemple de l'EBV

Les *Herpesviridae* possèdent de grands génomes leur permettant de coder pour de nombreuses protéines antagonistes des défenses immunitaires de la cellule. C'est en particulier le cas de l'EBV pour lequel plusieurs stratégies d'échappement à l'immunité innée sont aujourd'hui décrites (Tableau 6 - Figure 39). Dans ce paragraphe, j'ai choisi de m'attarder sur les stratégies permettant à l'EBV d'interférer avec les voies de signalisation conduisant à la synthèse de cytokines antivirales.

| Cible(s)                          | Protéines / ARNs d'EBV | Mécanisme(s) impacté(s)  | Référence(s)  |
|-----------------------------------|------------------------|--|---|
| cGAS                              | BLRF2                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Interaction antagoniste de BLRF2 avec cGAS bloquant la production de cGAMP</li> <li>○ Blocage de la signalisation dépendante de STING</li> </ul>  | (Gram <i>et al.</i> , 2017)                             |
| TRIM29                            | -                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ L'infection induit la surexpression de TRIM29 conduisant à la dégradation de STING</li> <li>○ Inhibition de la production d'IFN-<math>\alpha</math>4 et d'IFN-<math>\beta</math></li> </ul>       | (Xing <i>et al.</i> , 2017)                             |
| <i>RIG-I</i> (ARNm)               | miR- <i>BART6-3p</i>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Le miR-<i>BART6-3p</i> cible et induit la dégradation de l'ARNm <i>RIG-I</i></li> <li>○ Inhibition de la signalisation dépendante de RIG-I</li> </ul>   | (Lu <i>et al.</i> , 2017)                               |
| RIG-I                             | LMP-1                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ LMP-1 recrute l'E3 Ub ligase CHIP sur RIG-I induisant sa dégradation</li> <li>○ Inhibition de la signalisation dépendante de RIG-I</li> </ul>   | (Xu <i>et al.</i> , 2018)                               |
|                                   | BPLF1                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Formation d'un complexe ternaire entre BPLF1, TRIM25 et 14-3-3<math>\epsilon</math></li> <li>○ Déubiquitinylation et inhibition de RIG-I</li> </ul>   | (Gupta <i>et al.</i> , 2018)                            |
| TRAF6                             | BPLF1                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Interaction de BPLF1 avec et déubiquitinylation de TRAF6</li> <li>○ Blocage de l'activation de NF-<math>\kappa</math>B et de sa signalisation</li> </ul>  | (Saito <i>et al.</i> , 2013)                            |
| IKK $\epsilon$                    | BFRF1                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Interaction antagoniste de BFRF1 avec IKK<math>\epsilon</math></li> <li>○ Blocage de l'activation d'IRF3 et de l'expression des ARNm <i>IFN-<math>\beta</math></i> et <i>ISG54</i></li> </ul>     | (Wang <i>et al.</i> 2020a)                              |
| IRF3                              | BGLF4                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ BGLF4 se fixe et phosphoryle IRF3 prévenant les complexes stables IRF3/ADN</li> <li>○ Diminution d'expression des ARNm <i>IFN-<math>\beta</math></i> et de la phosphorylation de STAT1</li> </ul> | (Wang <i>et al.</i> , 2009)                             |
| NF- $\kappa$ B                    |                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ BGLF4 phosphoryle le co-activateur, UXT, de NF-<math>\kappa</math>B</li> <li>○ Diminution de la capacité de transactivation de NF-<math>\kappa</math>B</li> </ul>                                 | (Chang <i>et al.</i> , 2012)                            |
| <i>IRF3</i> et <i>IRF7</i> (ARNm) | RTA                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ RTA induit un facteur de transcription diminuant la synthèse des ARNm <i>IRF3</i> et <i>IRF7</i></li> <li>○ Inhibition de l'activité du promoteur <i>IFN-<math>\beta</math></i></li> </ul>        | (Bentz <i>et al.</i> , 2010 ; Zhu <i>et al.</i> , 2014) |
| IRF7                              | ZEBRA                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Interaction de ZEBRA avec IRF7 bloquant l'activité transactivatrice d'IRF7</li> <li>○ Inhibition de la production d'IFN-<math>\alpha</math>4 et d'IFN-<math>\beta</math></li> </ul>               | (Hahn <i>et al.</i> , 2005)                             |
|                                   | LF2                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Interaction antagoniste de LF2 avec IRF7 bloquant sa dimérisation</li> <li>○ Inhibition de la production d'IFN-<math>\alpha</math> et de la réponse aux IFNs de type I</li> </ul>                 | (Wu <i>et al.</i> , 2009)                               |

Tableau 6 | **Échappement à l'immunité innée par l'EBV**

Liste non-exhaustive de différentes stratégies développées par l'EBV pour interférer avec les voies de signalisation de l'immunité innée.

#### IV. 3. C. (a) Action sur les senseurs de l'infection virale

La reconnaissance de l'infection virale par la cellule implique différents PRRs. Bien que les virus soient souvent reconnus par les TLRs, lors de leur entrée dans les cellules cibles, nous ne nous intéresserons ici qu'à la détection par les senseurs cytoplasmiques de génomes viraux.

Il est admis que l'infection par les *Herpesviridae*, des virus à ADN, active la signalisation cGAS-STING (Burdette & Vance, 2013; Chen *et al.*, 2016). Pour se prémunir des systèmes de défense induits par l'infection, l'EBV peut interférer directement avec cGAS. En effet, la protéine du tégument BLRF2 (Figure 39), tout comme son homologue ORF52 chez KSHV, interagit avec cGAS restreignant sa capacité à fixer de l'ADN viral (Gram *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2015). Des études *in vitro* montrent que BLRF2 bloque ainsi la synthèse de cGAMP par cGAS (Gram *et al.*, 2017). Il a également été montré que STING pouvait être dégradée suite à l'infection par l'EBV. Au sein de cellules épithéliales, l'EBV induit l'expression de TRIM29 (Figure 39), une E3 Ub ligase, qui interagit avec et ubiquitinylyle STING permettant d'induire sa dégradation protéasomale (Xing *et al.*, 2017). Ainsi, TRIM29 est à l'origine d'une diminution locale de l'immunité innée, ce qui jouerait un rôle important pour promouvoir l'infection par l'EBV et pour l'établissement des CNP (Xing *et al.*, 2017).



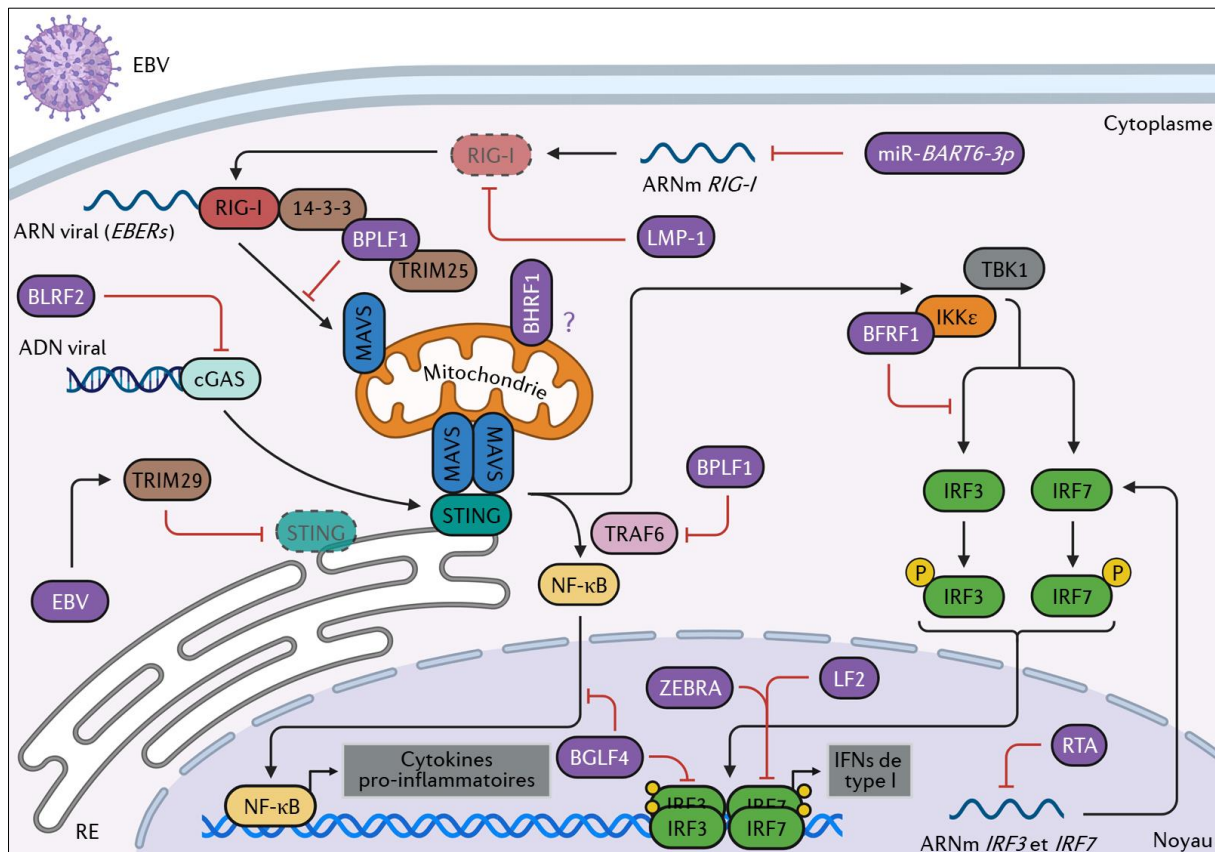


Figure 39 | **Stratégies d'échappement à l'immunité innée développées par l'EBV**

Différentes protéines et ARN de l'EBV (en violet) sont en mesure d'inhiber à la fois la voie dépendante des RLRs et la voie dépendante de l'axe cGAS-STING. L'expression de ces protéines et ARN viraux conduit à l'inhibition de synthèse des cytokines pro-inflammatoires et antivirales (IFN). *Created with BioRender.com.*

L'infection par l'EBV peut également être détectée par le biais des RLRs, les senseurs d'ARN, notamment via RIG-I. En effet, RIG-I reconnaît particulièrement les *EBERs*, des ARN non-codants associés à la latence virale (Ablasser *et al.*, 2009; Samanta *et al.*, 2006). Durant cette phase l'EBV exprime aussi de nombreux miRs (Figure 10) et une étude rapporte que le miR-BART6-3p (Figure 39) cible la région 3'UTR de l'ARNm *RIG-I* (Lu *et al.*, 2017). Cette interaction réduit l'expression de RIG-I et par conséquent son activité (Lu *et al.*, 2017). Une autre étude montre que la protéine de latence LMP-1 (Figure 39) impacte négativement la stabilité de RIG-I (Xu *et al.*, 2018). En effet, LMP-1 interagit avec CHIP (*Coiled-coil domain-containing protein*), une E3 Ub ligase, connue pour induire la dégradation de RIG-I (Xu *et al.*, 2018). La seule expression de LMP-1 dans des cellules EBV<sup>-</sup> induit la dégradation protéasomale de RIG-I (Xu *et al.*, 2018). De plus, dans un modèle de cellules de CNP EBV<sup>+</sup>, les auteurs observent également une faible expression de RIG-I, suggérant que ce contrôle de l'immunité innée existe en contexte infectieux (Xu *et al.*, 2018). La protéine du téguement BPLF1 de l'EBV (Figure 39), qui possède une activité déubiquitinyllase, interagit avec TRIM25, une E3 Ub ligase (Gupta *et al.*, 2018). En condition basale, TRIM25 est impliquée dans l'activation Ub-dépendante de RIG-I, permettant son interaction avec MAVS (Liu *et al.*, 2012a). Lorsque BPLF1 s'exprime dans les



cellules elle forme un complexe avec TRIM25 et la protéine chaperon 14-3-3 $\epsilon$ . Ce complexe diminue l'ubiquitinylation de RIG-I et par conséquent inhibe son activation (Gupta *et al.*, 2018).

#### IV. 3. C. (b) Action sur les effecteurs des voies d'induction des cytokines antivirales

L'activation des PRRs aboutit à l'activation de facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B et IRF3/7. Ces facteurs, ainsi que les protéines ayant permis leur activation constituent des cibles pour les protéines virales de l'EBV (Tableau 6).

Les IRFs sont les principaux facteurs de transcription activant la production d'IFNs (West *et al.*, 2011). Leur inhibition permet la progression du cycle de multiplication de l'EBV. L'activation des IRFs implique qu'ils soient phosphorylés dans le cytoplasme par des kinases. IKK $\epsilon$  fait partie de ces kinases et est la cible de BFRF1 (Figure 39), une protéine du cycle productif impliquée dans la maturation du virion. BFRF1 interagit avec IKK $\epsilon$ , bloquant son activité avec pour conséquence de bloquer l'activation d'IRF3 (Wang *et al.*, 2020a). Durant le cycle productif, IRF3 est ciblé par deux autres protéines virales : BGLF4 et RTA (Figure 39). BGLF4 est une kinase qui interagit directement avec et phosphoryle IRF3 limitant sa fixation à l'ADN et donc son activité transactivatrice (Wang *et al.*, 2009). La protéine transactivatrice RTA joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle d'*IRF3*. En effet, l'expression de RTA dans des cellules HeLa induit le facteur de transcription E2F1 qui se lie au promoteur du gène *IRF3*, diminuant son activité (Zhu *et al.*, 2014). Il semble que RTA réduit à la fois l'expression d'IRF3 et d'IRF7 afin de favoriser la réplication virale (Bentz *et al.*, 2010). L'activité d'IRF7 est également inhibée par deux autres protéines de l'EBV, le transactivateur ZEBRA, ainsi que la protéine du tégument LF2 (Figure 39). Ces dernières interagissent avec IRF7, bloquant sa dimérisation mais pas sa phosphorylation et son transport dans le noyau (Hahn *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2009).

NF- $\kappa$ B joue un rôle fondamental dans les processus immunitaires et inflammatoires de l'hôte (West *et al.*, 2011). Son impact sur l'EBV est démontré, puisque NF- $\kappa$ B inhibe le cycle productif en réprimant l'expression des transactivateurs ZEBRA et RTA (Brown *et al.*, 2003; Gutsch *et al.*, 1994). À l'inverse, LMP-1 active la voie NF- $\kappa$ B pour établir la latence, par répression du cycle productif, et pour assurer la prolifération des cellules EBV<sup>+</sup> en latence (Wang *et al.*, 2017). En résumé, l'EBV inhibe la signalisation NF- $\kappa$ B durant le cycle productif et la stimule durant la latence. Au cours du cycle productif, l'EBV dispose de deux protéines restreignant la signalisation NF- $\kappa$ B. BPLF1 (Figure 39) interagit avec et déubiquitinye TRAF6, une protéine impliquée dans l'activation de NF- $\kappa$ B (Saito *et al.*, 2013) tandis que BGLF4 (Figure 39) phosphoryle le cofacteur UXT de NF- $\kappa$ B, impactant son activation (Chang *et al.*, 2012).

#### IV. 3. C. (c) Quid de MAVS ?

La stratégie la plus répandue et la mieux documentée pour contrecarrer l'immunité antivirale consiste à cibler MAVS. Or, pour l'heure aucune publication n'a fait référence au potentiel rôle d'une protéine de l'EBV sur MAVS. Au laboratoire nous nous sommes attardés sur l'anti-apoptotique BHRF1, qui constitue un candidat intéressant pour agir au niveau du signalosome de MAVS. En effet, BHRF1 est associée aux mitochondries et, avant ce travail de thèse, le laboratoire a mis en évidence que cet homologue de BCL-2 stimule l'autophagie et altère la morphodynamique mitochondriale. Ces données suggèrent que BHRF1 pourrait induire de la mitophagie, un processus qui, comme nous l'avons vu précédemment, est intimement lié à la régulation de la signalisation MAVS (Tableau 5). Ces pistes seront donc explorées dans la partie résultats de ce manuscrit (§ V).

En conclusion de ce paragraphe, on s'aperçoit que les virus se sont parfaitement adaptés à leur hôte en développant de nombreuses protéines antagonistes de l'immunité innée. De plus, la plupart des virus ne possèdent pas une protéine unique impactant une voie bien spécifique mais plusieurs protéines interférant à différents niveaux des voies de signalisation. C'est notamment le cas pour l'EBV qui, comme nous venons de le voir, possède de nombreuses protéines inhibitrices des voies de signalisation de l'immunité innée. Cet important arsenal de protéines à propriétés provirales rend compte de l'adaptation de ce virus à l'être humain et pourrait expliquer, entre autres, le haut niveau de prévalence de l'EBV ou encore le développement de certaines pathologies viro-induites.

## Partie 2 – Résultats de thèse

## V Présentation des travaux de recherche

### V.1 Article n°1 : “BHRF1, a BCL2 viral homolog, disturbs mitochondrial dynamics and stimulates mitophagy to dampen type I IFN induction”

#### V.1.A Introduction

L'EBV est un virus ubiquitaire appartenant à la famille des *Herpesviridae*. Le premier contact avec ce virus se fait lors de l'enfance, durant laquelle l'infection est le plus souvent imperceptible. En revanche, lorsqu'elle intervient chez l'adolescent ou l'adulte le virus peut être à l'origine d'une mononucléose infectieuse. À travers le monde, il est estimé que plus de 90% de la population adulte est actuellement infectée (Kieff *et al.*, 2007). Cette importante prévalence reflète l'adaptabilité du virus à l'être humain, mais également sa capacité à établir une infection persistante. En effet, l'EBV infecte exclusivement les cellules épithéliales de l'oropharynx et les lymphocytes B, dans lesquels s'établit la latence virale lui permettant de persister à vie dans l'organisme (Babcock *et al.*, 1998; Thorley-Lawson *et al.*, 2013). Au cours de la phase de latence, seuls les gènes de latence s'expriment afin d'assurer le maintien du virus, tout en limitant sa détection par le système immunitaire (Münz, 2016). Certains programmes de latence peuvent entraîner l'immortalisation des cellules infectées (Kang & Kieff, 2015; Pope *et al.*, 1968), raison pour laquelle l'EBV est associé au développement de cancers, à savoir des carcinomes et des lymphomes (Jha *et al.*, 2016; Tavakoli *et al.*, 2020).

Le génome de l'EBV est de grande taille (172 kpb) et code pour plus d'une centaine de protéines. Parmi ces protéines, certaines sont intégrées dans la particule virale et d'autres, plus nombreuses, permettent à l'EBV de moduler le fonctionnement de la cellule infectée. Elles peuvent améliorer la survie des cellules hôtes, en bloquant l'apoptose par exemple, ou encore optimiser la production virale et faciliter la persistance du virus (Fitzsimmons & Kelly, 2017; Longnecker *et al.*, 2013). C'est notamment le cas de la protéine virale BHRF1, qui s'exprime au cours du cycle productif et durant certains programmes de latence. Cette protéine transmembranaire de 17 kDa présente une homologie structurale et fonctionnelle avec BCL-2 cellulaire (Khanim *et al.*, 1997). L'activité anti-apoptotique de BHRF1 a été largement documentée par le passé (Altmann & Hammerschmidt, 2005; Henderson *et al.*, 1993; Kvensakul *et al.*, 2010). Cependant, aucune information n'était disponible quant au rôle potentiel de BHRF1 sur l'autophagie. Sachant que BCL-2, ainsi que d'autres membres de cette famille protéique, contribue à la régulation de l'autophagie en interagissant avec BECN1 (Pattingre *et al.*, 2005), il fut suggéré que BHRF1 puisse moduler ce processus cellulaire (Cirone, 2018).

Au laboratoire nous nous intéressons particulièrement au détournement de l'autophagie par les virus de la famille des *Herpesviridae*. L'autophagie correspond à un processus cellulaire primordial permettant la dégradation et le recyclage de composants par le biais de vésicules à double membrane, appelées des autophagosomes, qui capturent et délivrent du matériel cytoplasmique dans le lumen des lysosomes (Dikic & Elazar, 2018). Ce processus peut parfois être utilisé en tant que mécanisme de défense de la cellule envers les pathogènes, en dégradant notamment des protéines virales par un mécanisme nommé xénophagie. Les virus ont donc évolué de manière à contourner la dégradation autophagique, ou bien en l'utilisant à leur profit. Concernant l'EBV, il a été montré qu'il induit et détourne l'autophagie afin d'optimiser l'enveloppement des particules virales et ainsi augmenter leur production (Cirone, 2018; Granato *et al.*, 2014; Nowag *et al.*, 2014). L'EBV possède deux orthologues de BCL-2, appelés BHRF1 et BALF0/1, et nous nous sommes intéressés à l'étude de la protéine BHRF1. En effet, avant mon arrivée au laboratoire furent obtenus des premiers résultats visant à évaluer la capacité de BHRF1 à moduler l'autophagie, des études ayant également permis d'observer que BHRF1 altère le réseau mitochondrial.

Dans cet article, nous nous sommes donc attachés à caractériser ces nouvelles fonctions de BHRF1. Au vu du rôle inhibiteur de BCL-2 sur l'autophagie, il a été surprenant d'observer et de caractériser une activité pro-autophagique de BHRF1. De plus, nous avons observé que BHRF1 altère la morphodynamique mitochondriale, en induisant la fission et l'agrégation des mitochondries pour conduire à la formation d'un mito-agrésome localisé dans la région périnucléaire. Au sein de ces structures, nous démontrons que des mitochondries sont séquestrées dans des autophagosomes afin d'être dégradées par autophagie. Compte-tenu du rôle central des mitochondries dans l'induction des réponses immunitaires innées de la cellule (Arnoult *et al.*, 2011; West *et al.*, 2011), nous avons caractérisé l'implication de BHRF1 en tant que protéine réprimant la réponse IFN de type I.

### V. 1. B Résultats

Les résultats de cette étude, où j'apparais en tant que co-premier auteur, ont été publiés en mai 2020 dans la revue *Autophagy* (Vilmen *et al.*, 2020).

## RESEARCH PAPER



## BHRF1, a BCL2 viral homolog, disturbs mitochondrial dynamics and stimulates mitophagy to dampen type I IFN induction

Géraldine Vilmen<sup>a,b,\*</sup>, Damien Glon<sup>a\*</sup>, Gabriel Siracusano<sup>b</sup>, Marion Lussignol<sup>a</sup>, Zhouwulin Shao<sup>b</sup>, Eva Hernandez<sup>a</sup>, Daniel Perdiz<sup>c</sup>, Frédérique Quignon<sup>b</sup>, Lina Mouna<sup>a</sup>, Christian Pöüs<sup>c,d</sup>, Henri Gruffat<sup>e</sup>, Vincent Maréchal<sup>b,†</sup>, and Audrey Esclatine<sup>a,†</sup>

<sup>a</sup>Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France; <sup>b</sup>CRSA, Centre de Recherche Saint-Antoine, UMRS 938, INSERM, Sorbonne Université, Paris, France; <sup>c</sup>INSERM UMR-S 1193, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France; <sup>d</sup>Biochimie-Hormonologie, APHP, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Site Antoine Béclère, Clamart, France; <sup>e</sup>CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Université Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, Lyon, France

### ABSTRACT

Mitochondria respond to many cellular functions and act as central hubs in innate immunity against viruses. This response is notably due to their role in the activation of interferon (IFN) signaling pathways through the activity of MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein) present at the mitochondrial surface. Here, we report that the BHRF1 protein, a BCL2 homolog encoded by Epstein-Barr virus (EBV), inhibits IFN $\alpha$ /IFN $\beta$  induction by targeting the mitochondria. Indeed, we have demonstrated that BHRF1 expression modifies mitochondrial dynamics and stimulates DNM1L/Drp1-mediated mitochondrial fission. Concomitantly, we have shown that BHRF1 is pro-autophagic because it stimulates the autophagic flux by interacting with BECN1/Beclin 1. In response to the BHRF1-induced mitochondrial fission and macroautophagy/autophagy stimulation, BHRF1 drives mitochondrial network reorganization to form juxtannuclear mitochondrial aggregates known as mito-aggregates. Mitophagy is a cellular process, which can specifically sequester and degrade mitochondria. Our confocal studies uncovered that numerous mitochondria are present in autophagosomes and acidic compartments using BHRF1-expressing cells. Moreover, mito-aggregate formation allows the induction of mitophagy and the accumulation of PINK1 at the mitochondria. As BHRF1 modulates the mitochondrial fate, we explored the effect of BHRF1 on innate immunity and showed that BHRF1 expression could prevent IFN $\alpha$  induction. Indeed, BHRF1 inhibits the *IFNB* promoter activation and blocks the nuclear translocation of IRF3 (interferon regulatory factor 3). Thus, we concluded that BHRF1 can counteract innate immunity activation by inducing fission of the mitochondria to facilitate their sequestration in mitophagosomes for degradation.

**Abbreviations:** 3-MA: 3-methyladenine; ACTB: actin beta; BCL2: BCL2 apoptosis regulator; CARD: caspase recruitment domain; CCCP: carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone; CI: compaction index; CQ: chloroquine; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride; DDX58/RIG-I: DEXD/H-box helicase 58; DNM1L/Drp1: dynamin 1 like; EBSS: Earle's balanced salt solution; EBV: Epstein-Barr virus; ER: endoplasmic reticulum; EV: empty vector; GFP: green fluorescent protein; HEK: human embryonic kidney; IFN: interferon; IgG: immunoglobulin G; IRF3: interferon regulatory factor 3; LDHA: lactate dehydrogenase A; MAP1LC3/LC3: microtubule associated protein 1 light chain 3; MAVS: mitochondrial antiviral signaling protein; MMP: mitochondrial membrane potential; MOM: mitochondrial outer membrane; PINK1: PTEN induced kinase 1; RFP: red fluorescent protein; ROS: reactive oxygen species; SQSTM1/p62: sequestosome 1; STING1: stimulator of interferon response cGAMP interactor 1; TOMM20: translocase of outer mitochondrial membrane 20; VDAC: voltage dependent anion channel.

### ARTICLE HISTORY

Received 26 July 2019  
Revised 13 April 2020  
Accepted 16 April 2020

### KEYWORDS

Autophagy; BCL2; BECN1; BHRF1; DNM1L; EBV; IFN; MAVS; mitochondrial dynamics; mitophagy

### Introduction


The Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous virus belonging to the herpesviruses family. Although its prevalence is high in populations worldwide, EBV primary infection is asymptomatic when occurring in children, whereas it may be responsible for infectious mononucleosis in young adults. EBV

essentially infects epithelial cells and B cells, in which it establishes a latent lifelong persistence. Several latency programs exist, corresponding to the expression of different viral proteins without the production of infectious viral particles [1,2]. Some forms of latency promote cell transformation, and EBV infection has, therefore, been associated with cancers, such as lymphomas and carcinomas [3]. It has been reported

**CONTACT** Audrey Esclatine ✉ [audrey.esclatine@u-psud.fr](mailto:audrey.esclatine@u-psud.fr) Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France

\*These authors contributed equally to this work.

†These authors share senior authorship.

 Supplemental data for this article can be accessed here.

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

that EBV can block programmed cell death, thus prolonging the lifespan of infected cells, maximizing the production of progeny viruses, and facilitating the establishment of virus persistence [4,5].

EBV has a large 172-kbp DNA genome that can encode for more than 100 different proteins together with noncoding RNAs [4]. Among these proteins, BHRF1 is expressed during the viral productive cycle but also during some latency programs, and its only known function is to protect cells against apoptosis [6], notably during primary infection [7]. BHRF1 is a 17 kDa putative transmembrane protein, which is highly conserved among different EBV isolates and shows strong functional homology with the human BCL2 [8]. This 191-amino-acid viral protein owns two motifs referred to as BCL2 homology domains 1 and 2 (BH1 and BH2). Cellular BCL2 belongs to a family of more than 20 members with anti-apoptotic properties, such as BCL2 or BCL2L1/Bcl-xL, and pro-apoptotic proteins, such as BAX, BAK1, BAD or BCL2L11/Bim [9]. BHRF1 anti-apoptotic activity may at least in part rely on its ability to interact with pro-apoptotic BH3-only proteins (especially BCL2L11) and with the executioner BAK1 [10,11]. In addition, BHRF1, like BCL2, seems to reside mainly in the mitochondrial membrane [12,13].

Mitochondria fulfill multiple cellular functions, such as energy production, maintenance of calcium homeostasis, reactive oxygen species (ROS) generation, and apoptosis initiation. In addition, mitochondria also actively participate in innate immunity in order to limit viral infections. Indeed, the innate immune signaling receptor MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein) is located at the mitochondrial outer membrane (MOM) and plays a pivotal role in signaling cascades that lead to type I interferon (IFN) and pro-inflammatory cytokine production. MAVS is activated following interaction with DDX58/RIG-I (DEXD/H-box helicase 58) or IFIH1/MDA5 (interferon induced with helicase C domain 1), two cytoplasmic pattern recognition receptors that detect viral genome during infection. Functions of mitochondria are intertwined with the morphology and the number of mitochondria. Indeed, mitochondria are dynamic and mobile organelles that constantly undergo membrane remodeling through repeated cycles of fusion and fission, and their length is determined by the balance between fission/fusion rates. Maintenance of mitochondrial homeostasis also includes the control of the number of mitochondria through the stimulation of their biogenesis, and removal of damaged mitochondria by selective autophagy, a process called mitophagy. Selective autophagy begins in the recognition of a specific cargo by a molecular receptor that links the cargo to the autophagosome membrane, leading to its sequestration into this double-membrane vesicle [14]. Macroautophagy/autophagy can also be nonselective and can randomly sequester bulk cytosol and other cytoplasmic components into the autophagosomes [15]. In both cases, the maturation of autophagosomes ends with their fusion with the lysosomes, creating the autolysosomes, leading to the digestion of their contents by proteases.

Whereas the ability of BHRF1 to block apoptosis is well documented, no information is available so far regarding its putative role on mitochondrial dynamics and autophagy.

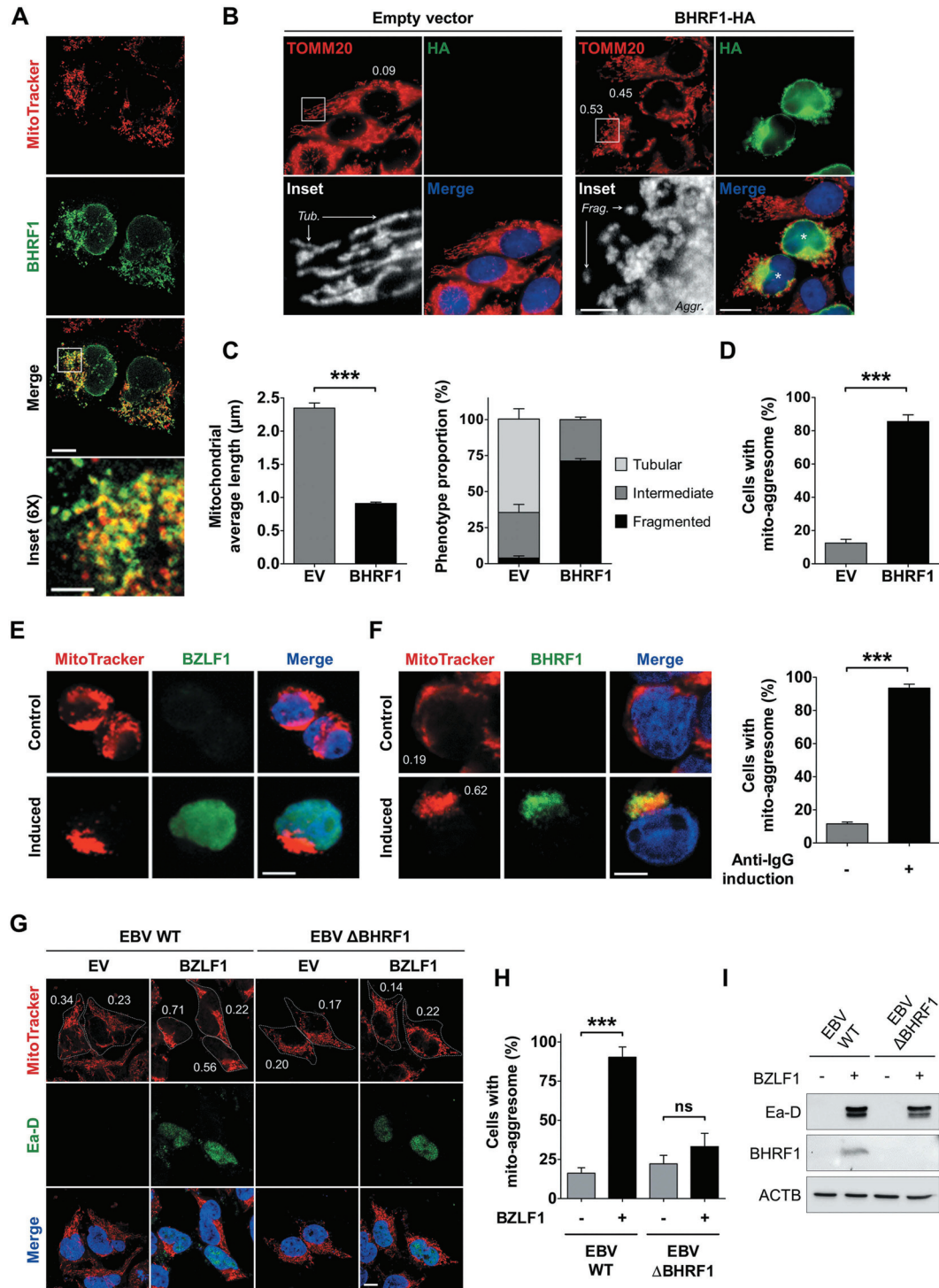
Interestingly, several studies reported that EBV could subvert autophagy to improve viral replication and the final envelopment of viral particles [16–18]. Here, we demonstrate that ectopic expression of BHRF1 leads to a DNMI1/Drp1 (dynamin related protein 1)-dependent mitochondrial fission. Subsequently, BHRF1 induces the accumulation of autophagosomes by interacting with BECN1/Beclin 1, an autophagy machinery protein, which is known to interact with BCL2. These cellular modifications result in the formation of a mito-aggresome, a perinuclear mitochondrial clustering that precedes mitophagy. Given the central role of mitochondria in innate immunity, we explored the contribution of BHRF1 in the control of innate immunity and demonstrated that BHRF1-mediated mitochondrial degradation resulted in the inhibition of type I IFN induction.

## Results

### ***BHRF1 expression induces mitochondrial fission and the formation of mito-aggresomes***

BHRF1 subcellular localization was investigated by confocal microscopy in HeLa cells following transfection with a *BHRF1-HA* expression vector for 24 h. Mitochondria were counterstained by MitoTracker Red CMXRos dye. In accordance with previous reports, we observed an important colocalization of BHRF1 with mitochondria (Figure 1A), corresponding to a perinuclear staining of BHRF1 and a mitochondrial distribution pattern similar to BCL2 [12,19]. Moreover, BHRF1 seemed to induce a modification on the shape of the nucleus. More interestingly, mitochondrial labeling with an antibody directed against the mitochondrial import receptor subunit TOMM20 confirmed that the mitochondrial network morphology was dramatically altered in BHRF1-expressing cells (Figure 1B). The mitochondrial average length was measured (Figure 1C), and it confirmed that the BHRF1 expression induced a marked reduction in mitochondrial length, which was indicative of mitochondrial fission. While the mitochondrial population exhibited a tubular network or an intermediate phenotype in the majority of control cells, BHRF1 caused fragmentation of the mitochondria, with almost 75% of them displaying a size under 1  $\mu$ m (Figure 1C). Interestingly, no change in mitochondrial membrane potential (MMP) was noted upon BHRF1 expression (Figure S1A and B). BHRF1-expressing cells also showed abnormal and juxtannuclear mitochondrial aggregates, while these organelles were homogeneously distributed as a network in the cytoplasm of control cells (Figure 1B). These rough aggregates were strongly reminiscent of structures previously described and classically called mito-aggresomes [20]. Based on a mitochondrial compaction index (CI) above 0.4 [21], used herein as the criterion for judging mitochondrion clustering, virtually 80% of BHRF1-expressing cells showed a mito-aggresome (Figures 1D and S1C). To confirm this observation in the context of native EBV infection, we first analyzed the mitochondrial morphology in EBV-positive Akata B cells during latency or following viral reactivation. The mitochondria were homogeneously distributed in the cytoplasm of latent (non-reactivated) Akata





**Figure 1.** BHRF1 induces the formation of mito-aggregates in HeLa cells and EBV-reactivated cells. (A) BHRF1 localizes to the mitochondria. Confocal images of *BHRF1-HA*-transfected HeLa cells immunostained for BHRF1 and the mitochondria (MitoTracker). Scale bars: 10 μm, and 3 μm for inset. (B-D) BHRF1 induces mitochondrial fission in HeLa cells. Cells were transfected with an empty vector (EV) or a plasmid encoding BHRF1-HA for 24 h. Cells were fixed and immunostained for TOMM20 to visualize the mitochondrial network, and HA to visualize BHRF1-expressing cells. Nuclei were subsequently stained with DAPI. (B) Representative images. Scale bars: 20 μm and 4 μm for insets. Tub., tubular mitochondria; Frag., fragmented mitochondria; Aggr., aggregated mitochondria. Values of mitochondrial compaction index (CI) are indicated on representative cells; cells indicated by a star (\*) present a mito-aggregate (CI above 0.4). For details on CI scoring, see Figure S1C. (C) Left: mitochondrial average length. Right: mitochondrial phenotype. (D) Percentage of cells presenting a mito-aggregate. (E and F) EBV reactivation in B cells induces mito-aggregate formation. EBV-reactivated Akata cells were labeled with MitoTracker to visualize the mitochondrial phenotype and reactivated cells were detected by labeling EBV antigens. Nuclei were stained with Hoechst. Scale bar: 10 μm. (E) Confocal images of MitoTracker and BZLF1 co-staining. (F) Left: confocal images of MitoTracker and BHRF1 co-staining. Values of mitochondrial CI are indicated on representative cells. Right: percentage of EBV-reactivated Akata cells presenting a mito-aggregate. (G-I) EBV reactivation in the absence of BHRF1 blocks mito-aggregate formation in epithelial cells. (G) Confocal images of MitoTracker and Ea-D viral protein co-staining of HEK293 cells without reactivation (EV) or after reactivation (BZLF1 transfection). Nuclei were stained with DAPI. Scale bar: 10 μm. CI values are indicated on representative cells. (H) Percentage of cells presenting a mito-aggregate (CI above 0.4). (I) Immunoblot analysis of Ea-D and BHRF1 after BZLF1 transfection, confirming EBV reactivation in both cell lines and the lack of BHRF1 expression with the mutant virus. ACTB was used as a loading control. Data represent the mean ± SEM of three independent experiments. ns = non-significant, \*\*\* P < 0.001 (Student's t-test).

cells (Figure 1E and F). However, after the reactivation of the viral lytic cycle by anti-IgG treatment, they formed mito-aggresomes in reactivated cells that were characterized by the expression of immediate early protein BZLF1 (Figure 1E). Although BHRF1 was not expressed in latent Akata cells, BHRF1 accumulated in reactivated cells where it colocalized with the mito-aggresomes (Figure 1F). Based on the CI scoring, more than 90% of BHRF1-positive cells displayed mito-aggresomes (Figure 1F). In order to confirm the role of BHRF1 in the mito-aggresome formation in infected cells, we assessed alterations of mitochondrial network in the HEK293/EBV<sup>+</sup> epithelial cell line. These cells contain the EBV genome of the B95-8 strain and can be reactivated by the expression of the trans-activator protein BZLF1 via transfection of an expression plasmid [22,23] (Figure 1I). We explored in parallel a similar cell line harboring the EBV genome deleted of the *BHRF1* gene ( $\Delta$ BHRF1) [7]. As observed in Figure 1G, reactivation (visualized by Ea-D viral protein expression) led to the high compaction of mitochondria in WT EBV cells. However, the lack of BHRF1 ( $\Delta$ BHRF1) dramatically reduced the percentage of cells presenting a mito-aggresome, demonstrating that BHRF1 is required for the mitochondrial alterations during reactivation (Figure 1H).

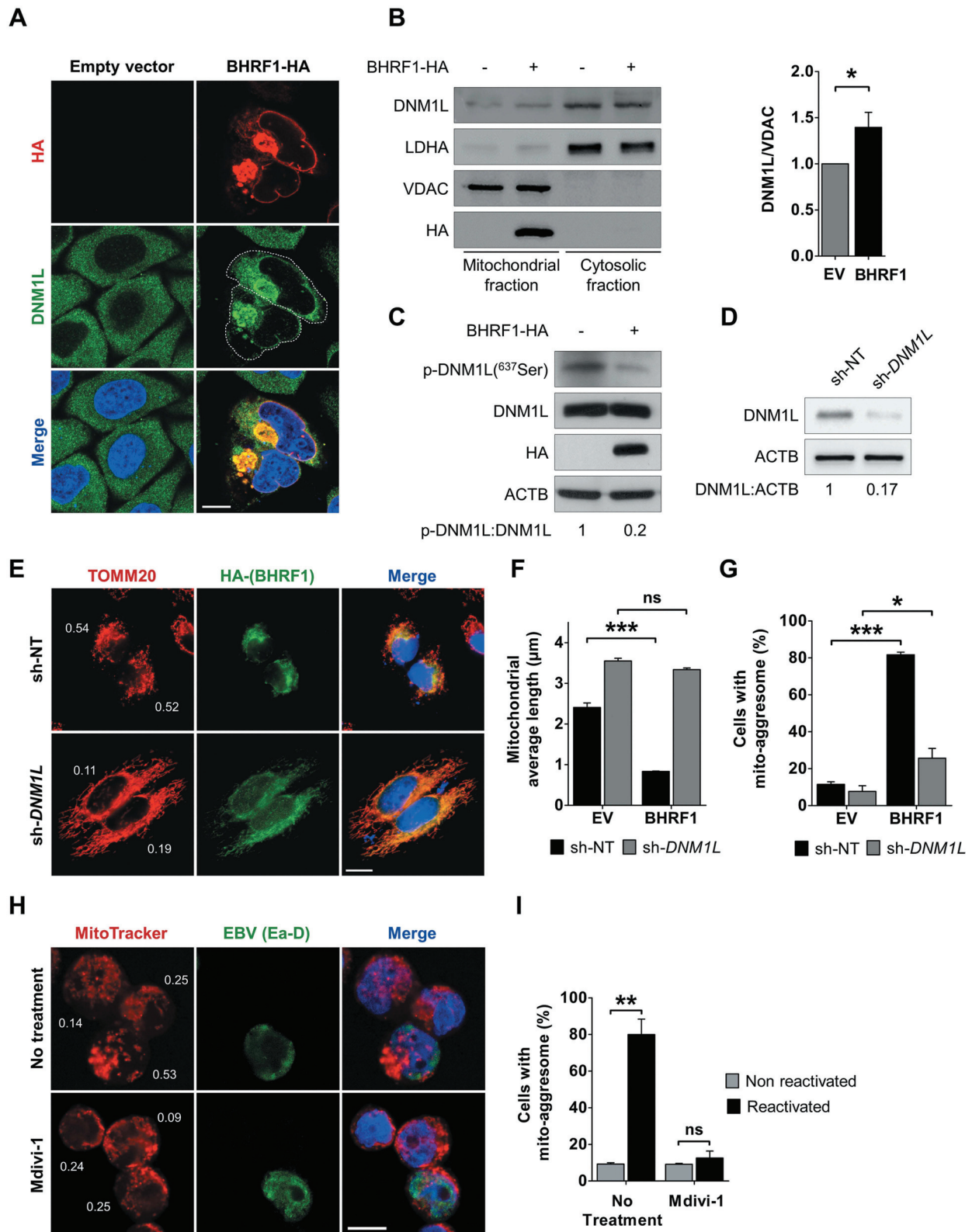
#### **DNM1L is required for BHRF1-induced mitochondrial fission and mito-aggresome formation**

Mitochondria change their overall morphology by fusion and fission in response to cellular stress. Damaged mitochondria can trigger their fission to get rid of the unhealthy parts. DNM1L is a GTPase that plays a critical role in mitochondrial fission [24]. DNM1L mostly localizes in the cytoplasm and is translocated to the MOM to regulate mitochondrial fission [25]. Since BHRF1 expression was associated with increased mitochondrial fission, we monitored DNM1L localization in BHRF1-expressing cells by confocal microscopy (Figure 2A). Whereas DNM1L was diffusely distributed in the cytoplasm in control cells, DNM1L relocated upon BHRF1 expression into BHRF1-positive mito-aggresomes. Cell fractionation experiments were performed to separate the mitochondria-associated proteins [26]. This experiment confirmed that BHRF1 is specifically present at the mitochondria and demonstrated that DNM1L was slightly more abundant in the mitochondrial fraction in BHRF1-expressing cells than in control cells (Figure 2B). Overall DNM1L accumulation increased by 40% in the mitochondrial fraction in BHRF1-expressing cells (Figure 2B). Post-translational modifications of DNM1L, such as phosphorylation, sumoylation, ubiquitination, and S-nitrosylation, regulate mitochondrial fission in response to diverse cellular stimuli [25]. We analyzed the level of phosphorylation of DNM1L in position Ser637 in BHRF1-expressing cells (Figure 2C). Indeed, this phosphorylation site depends on the cAMP-dependent PRKA (protein kinase A) activation and impedes mitochondrial fission. Conversely, dephosphorylation of DNM1L by the phosphatase calcineurin, for example, induces the translocation of DNM1L and fragmentation of the organelle [27]. Whereas no modification of the total level of DNM1L occurred in BHRF1-expressing cells

compared to control cells, a strong downregulation of DNM1L Ser637 phosphorylation was observed following BHRF1 expression (Figure 2C), which corroborates the translocation of DNM1L to the mitochondria and the mitochondrial fragmentation that was previously observed (Figures 2B and 1C). As to confirm that DNM1L was indeed required for BHRF1-mediated mitochondrial fission, we generated HeLa cells DNM1L knockdown using lentiviruses, which delivered the shRNA that specifically targets the human *DNM1L* mRNA. We characterized them in the absence of BHRF1 using known mitochondrial fission inducers (Figure S2). In HeLa cells expressing sh-*DNM1L*, mitochondria formed a highly connected network (Figure S2A) along with an 83% decrease in DNM1L protein expression (Figure 2D). Moreover, BHRF1 did not induce mitochondrial reorganization in sh-*DNM1L*-expressing cells (Figure 2E). Accordingly, the mitochondrial length was unaffected by BHRF1 expression and DNM1L deficiency mostly abrogated the BHRF1 ability to induce the formation of mito-aggresomes (Figure 2F and G). During the viral lytic cycle, DNM1L was similarly required for the formation of mito-aggresomes since the treatment of Akata cells by Mdivi-1, a chemical inhibitor of DNM1L, totally impeded the formation of mito-aggresomes (Figure 2H and I). Altogether, our results demonstrated that BHRF1 expression induces DNM1L-dependent mitochondrial fission, which is required for mitochondrial clustering.

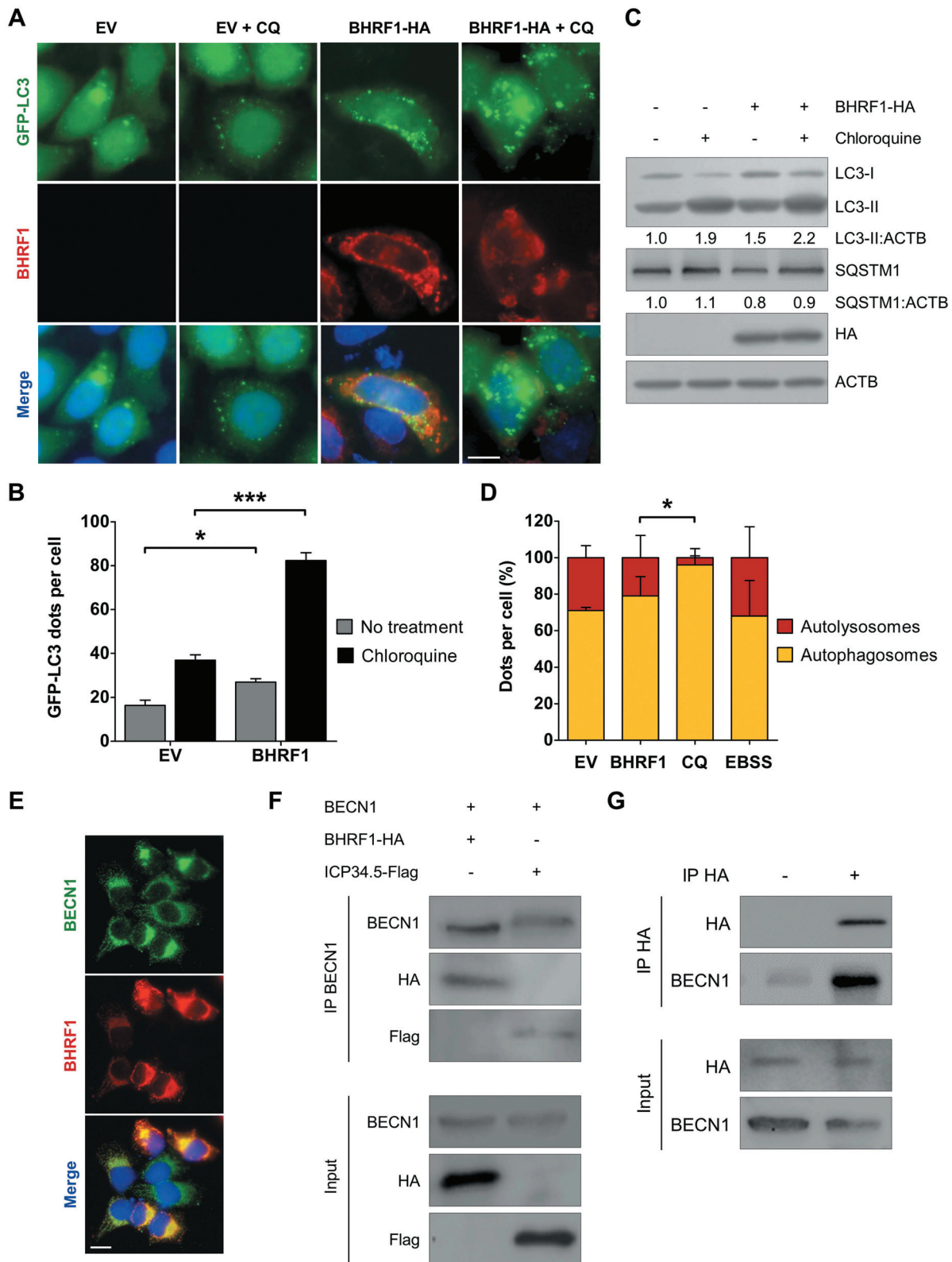
#### **BHRF1 triggers autophagy**

Cellular BCL2 is known to inhibit autophagy. Since BHRF1 shares notable homology with cellular BCL2, we wondered whether it might modulate autophagy as well [13]. To study the impact of BHRF1 on autophagy, we first used HeLa cells that stably express GFP-LC3, a classical marker of autophagosomes, and added chloroquine (CQ) 4 h before harvesting the cells [28]. CQ neutralizes the lysosomal pH and causes the accumulation of GFP-LC3-positive vesicles by inhibiting endogenous protein degradation [29]. As shown in Figure 3A and B, BHRF1-expressing cells displayed increased numbers of GFP-LC3 dots compared to control cells, with and without CQ. Because an accumulation of autophagosomes in cells can result either from an increase in the rate of their formation or a decrease in their fusion with lysosomes, we next explored the autophagic flux, which reflects the autophagic degradation activity. We, therefore, analyzed the accumulation of the lipidated LC3 (LC3-II) by immunoblotting in cells that were or were not treated with CQ. An increased level of LC3-II was observed in BHRF1-expressing cells (Figure 3B and C), which was even higher in the presence of CQ. This result led us to conclude that BHRF1 stimulates the autophagic flux. We also monitored the abundance of the autophagy substrate SQSTM1 by immunoblot and concordantly observed a decrease in SQSTM1 when BHRF1 was expressed (Figure 3C). To confirm our data, the autophagic flux was investigated using the mRFP-GFP-LC3 HeLa cells (Figures 3D and S3) [30]. Because GFP fluorescence is quenched in acidic compartments, such as autolysosomes, this probe makes it possible to differentiate between autophagosomes (GFP<sup>+</sup> RFP<sup>+</sup> or yellow dots) and autolysosomes (GFP<sup>-</sup> RFP<sup>+</sup> or red dots) [31]. As a control, cells were



**Figure 2.** BHRF1 induces DNM1L-dependent mitochondrial fission. (A) Confocal images of HeLa cells transfected with EV or *BHRF1-HA* plasmids for 24 h and immunostained for DNM1L and HA. Nuclei were stained with DAPI. Cells outline was drawn to better visualize the recruitment of DNM1L into mito-aggresome structures. Scale bar: 10  $\mu$ m. (B) Subcellular fractionation of HeLa cells transfected for 48 h with EV or *BHRF1-HA* plasmids. VDAC and LDHA were used as markers for mitochondrial and cytosolic fractions, respectively. Left: immunoblot analysis of DNM1L, LDHA, and VDAC. Right: quantification of DNM1L expression in the mitochondrial fraction. (C) Immunoblot analysis of phosphorylated (Serine 637) and total DNM1L upon BHRF1-HA expression. ACTB was used as a loading control. (D) Silencing level of DNM1L in HeLa knockdown cell line (sh-*DNM1L*), compared to the control cell line (sh-NT). ACTB was used as a loading control. See Figure S2 for deficient cell line characterization. (E-G) sh-NT and sh-*DNM1L* HeLa cells were transfected with EV or *BHRF1-HA* plasmids for 24 h and immunostained for TOMM20 and HA. Nuclei were stained with DAPI. (E) Representative images of BHRF1-HA-expressing cells. Scale bar: 10  $\mu$ m. Values of mitochondrial CI are indicated on representative cells. (F) Mitochondrial average length. (G) Percentage of cells presenting a mito-aggresome. (H) Confocal images of EBV-reactivated Akata cells treated for 1 h with DNM1L-inhibitor Mdivi-1 (50  $\mu$ M) and labeled with MitoTracker and an antibody against EBV (Ea-D). Nuclei were stained with Hoechst. Scale bar: 5  $\mu$ m. Values of mitochondrial CI are indicated on representative cells. (I) Percentage of Akata cells presenting a mito-aggresome. Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. ns = non-significant; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  (Student's t-test).





**Figure 3.** BHRF1 stimulates autophagy and interacts with BECN1. (A and B) GFP-LC3 HeLa cells were transfected with EV or *BHRF1-HA* plasmids for 48 h and fixed after CQ treatment when indicated. Nuclei were stained with DAPI. (A) Representative images. Scale bar: 20  $\mu$ m. (B) Number of GFP-LC3 dots. (C) Immunoblot analysis of LC3 and SQSTM1 expression in HeLa cells treated with CQ when indicated. ACTB was used as a loading control. (D) To study autophagic flux, mRFP-GFP-LC3 HeLa cells were transfected with *BHRF1-HA* plasmids, or treated with CQ to block the autophagic flux, or maintained in EBSS (starvation) to induce the autophagic flux. Representative images are presented in Figure S3. Results are shown as the percentage of total autophagic vesicles. (E) Representative images of *BHRF1-HA*-transfected HeLa cells immunostained for BECN1 and BHRF1. Scale bar: 20  $\mu$ m. (F) HeLa cells were transiently transfected to express BECN1 and either *BHRF1-HA* or ICP34.5-Flag vector. After immunoprecipitation with a goat polyclonal anti-BECN1 antibody, proteins were detected by immunoblotting with anti-BECN1, anti-Flag, or anti-HA antibodies. (G) In HeLa cells, *BHRF1-HA* was transiently transfected in both lanes. BHRF1-HA was immunoprecipitated in the absence of antibody (-) or with an anti-HA antibody (+). Endogenous BECN1 and BHRF1-HA proteins were detected by immunoblotting. Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*  $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  (Student's t-test).

treated with CQ to block autophagic flux or maintained in Earle's balanced salt solution (EBSS; starvation) to induce autophagy. We observed an increase in the total amount of autophagic vacuoles (autophagosomes and autolysosomes) in BHRF1-expressing cells (Figure S3B). Furthermore, BHRF1, as well as starvation, led to a significant percentage of autolysosomes over autophagosomes, whereas CQ-induced vacuoles were mainly autophagosomes (>95%) (Figures 3D and S3B). Altogether, these findings clearly indicated that BHRF1 stimulates the biosynthesis of autophagosomes and autophagic flux in HeLa cells. BECN1 is a critical component of highly regulated complexes that control the formation and maturation of autophagosomes [32,33]. Since BCL2 and several viral proteins have been described to interact with BECN1, we investigated the putative interaction between BECN1 and BHRF1 [34–36]. First, we analyzed the distribution of BHRF1 and BECN1 in HeLa cells, and we observed a partial colocalization of the two proteins in the cytoplasm (Figure 3E), which suggests an interaction. To confirm this interaction, co-immunoprecipitation experiments were performed using HeLa cells that are transiently transfected by plasmids encoding for HA-tagged BHRF1 and BECN1 (Figure 3F). Since herpes simplex virus type 1 (HSV-1) ICP34.5 has been previously reported to interact with BECN1, we used a Flag-tagged ICP34.5 plasmid as a positive control [36,37]. Immunoprecipitation of BECN1 pulled down both BHRF1 and ICP34.5. Reversely, endogenous BECN1 was co-immunoprecipitated with HA-tagged BHRF1 using an anti-HA antibody (Figure 3G). Therefore, we can conclude that BHRF1 interacted with BECN1. Altogether, these findings suggested that BHRF1 stimulated autophagy through its interaction with BECN1.

### **Interplay between BHRF1-induced autophagy and mitochondrial morphology alterations**

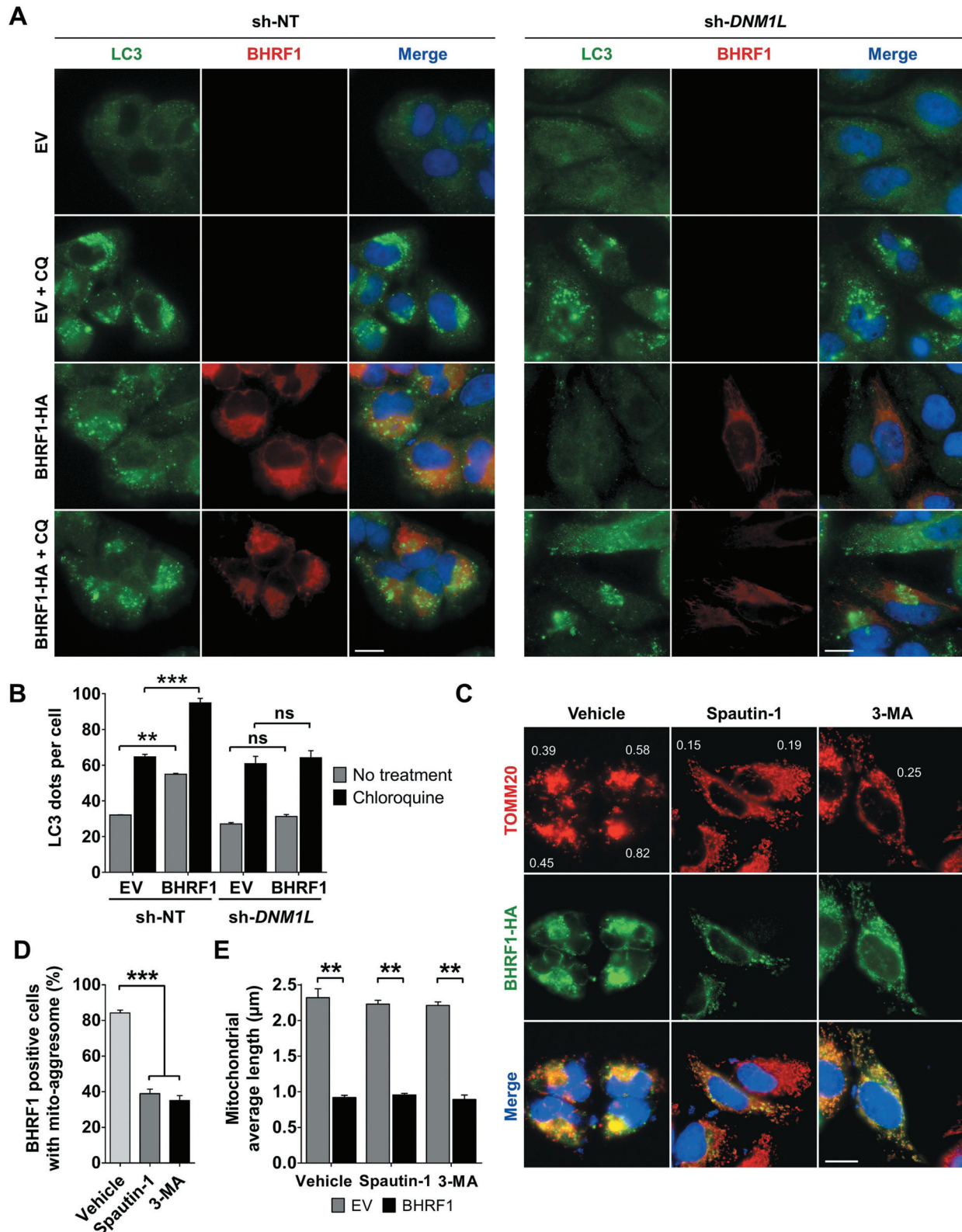
Since BHRF1 induced both mitochondrial fission and autophagy in an apparently concomitant manner, we wondered whether fission was required for the induction of autophagy. To answer this question, we monitored the level of BHRF1-induced autophagy in DNMI1-deficient cells by staining endogenous LC3 (Figure 4A). We first demonstrated that DNMI1 deficiency did not impair starvation-induced autophagy, since EBSS treatment of sh-DNMI1 cells induced LC3 dot accumulation, as well as SQSTM1 degradation (Figure S4). Then, we confirmed that BHRF1 induced the accumulation of endogenous LC3 dots in sh-NT control cells, and even more after CQ treatment (Figure 4A and B). However, BHRF1 did not promote the accumulation of LC3 dots in sh-DNMI1-treated cells, even in the presence of CQ (Figure 4B). These results demonstrated that DNMI1, and by extension, DNMI1-mediated mitochondrial fission, is required for BHRF1-induced autophagy. In order to seek whether autophagy is required to form mito-aggregates, HeLa cells expressing BHRF1 were treated with two different autophagy inhibitors, i.e., Spautin-1 and 3-methyladenine (3-MA), while immunostaining the mitochondrial network and BHRF1 (Figure 4C–E). When autophagy was blocked, mitochondria were homogeneously distributed in the cytoplasm and were not organized into mito-aggregates even in the presence of

BHRF1, as visualized by the CI values (Figure 4C). However, autophagy was not required for BHRF1 to induce mitochondrial fission since a significant reduction in the length of the mitochondria was observed in BHRF1-expressing cells both in the presence and absence of autophagy inhibitors. (Figure 4E). Altogether, these findings demonstrated that mitochondrial fission induced by BHRF1 leads to autophagy activation, which in turn promotes mito-aggregates formation.

### **BHRF1 expression induces mitophagy**

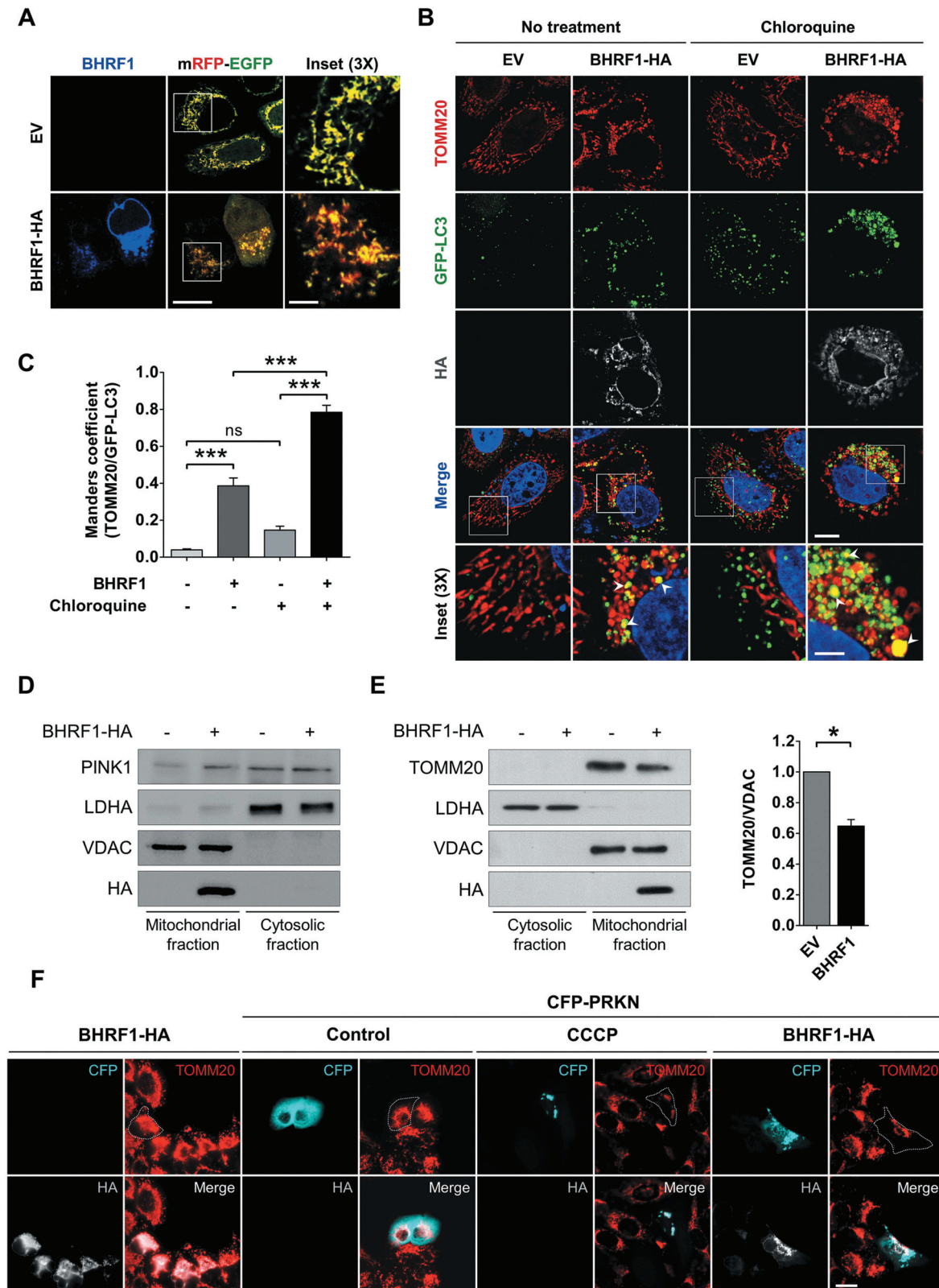
Considering that BHRF1 induces mitochondrial fission and stimulates autophagy, we wondered whether BHRF1 could induce mitophagy. Indeed, the fragmentation of mitochondria facilitates their envelopment into autophagosomes, which eventually leads to their degradation into lysosomes via mitophagy [38]. Moreover, the appearance of mito-aggregates was previously described following the depolarization of mitochondria and preceded by mitophagy in a Parkinson disease model [20]. Finally, during mitophagy, it has been observed that dysfunctional mitochondria undergo retrograde transport to the perinuclear region, where they cluster to be degraded [39]. A sensitive dual fluorescence reporter expressing mito-mRFP-EGFP, fused in-frame with a mitochondrial targeting sequence, was used to monitor the completion of the mitophagic process [40]. In the presence of BHRF1, numerous mitochondria were detected in acidic compartments (mitochondria labeled in red), suggesting that BHRF1 triggered mitophagy (Figure 5A). Confocal microscopy analysis confirmed that mitochondria (TOMM20 labeling) and autophagosomes (GFP-LC3 labeling) significantly colocalized in the presence of BHRF1 (Figure 5B). CQ treatment increased the colocalization intensity, measured by Manders' coefficient, possibly because it inhibited the autophagic degradation of sequestered mitochondria (Figure 5C). Because autophagosomes are expected to fuse with the lysosomes, we also monitored the impact of BHRF1 on the colocalization between the mitochondria and lysosomes using LAMP1 labeling as a lysosomal marker (Figure S5). In BHRF1-expressing cells, the presence of LAMP1-positive vesicles containing mitochondria could be detected both in the presence and absence of CQ (Figure S5A and B), together with increased LAMP1 expression (Figure S5C).

Mitochondria need to recruit autophagy receptor proteins for mitophagy to occur. One of the best-studied mitophagy mechanisms in mammalian cells is the PINK1 (PTEN induced kinase 1)-PRKN (parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase)-mediated mitophagy pathway [41]. PINK1 is constitutively imported into healthy mitochondria through the TOMM and TIMM membrane translocation complexes, where it is degraded by the mitochondrial inner membrane protease PARL. When mitochondria are dysfunctional, PINK1 is not imported anymore and starts to accumulate on the MOM, triggering the recruitment of PRKN/Parkin [41]. Once activated, PRKN ubiquitinates proteins on the MOM surface, and this ubiquitination initiates the engulfment of the mitochondria into autophagosomes to complete mitophagy. We thus wondered whether BHRF1 induced mitophagy through the PINK1-PRKN pathway. First, we monitored the expression of



**Figure 4.** Interplay between BHRF1-induced autophagy and mito-aggresome formation. (A and B) Mitochondrial fission is required for BHRF1-induced autophagy. sh-NT and sh-DNM1L HeLa cells were transfected with EV or BHRF1-HA plasmids for 24 h and treated with CQ when indicated. LC3-positive vesicles and BHRF1-HA-transfected cells were visualized, respectively, using anti-LC3 and anti-BHRF1 antibodies. Nuclei were stained with DAPI. See Figure S4 for deficient cell line characterization. (A) Representative images. Scale bar: 20 µm. (B) Quantification of LC3 dots. (C-E) Autophagy is necessary to BHRF1-induced mito-aggresome formation. HeLa cells were transfected with EV or BHRF1-HA plasmids for 24 h. When indicated, cells were treated with Spautin-1 or 3-MA to inhibit autophagy. After fixation, cells were immunostained for TOMM20 and HA. (C) Representative images of BHRF1-HA-expressing cells. Values of mitochondrial CI are indicated on representative cells. Scale bar: 20 µm. (D) Percentage of BHRF1-positive cells presenting a mito-aggresome. (E) Mitochondrial average length. Data represent the mean ± SEM of three independent experiments. (B and E) ns = non-significant; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001 (Student's t-test). (D) \*\*\* P < 0.001 (One-way ANOVA test).





**Figure 5.** BHRF1 induces mitophagy and recruits PRKN to the mitochondria. (A) Representative images of HeLa cells co-transfected for 24 h with the mRFP-EGFP probe targeted to the mitochondria and EV or *BHRF1-HA* plasmids. Cells were immunostained for BHRF1. Insets show part of the cytoplasm at a higher magnification. Red staining corresponds to the delivery of mitochondria to the acidic compartments. Scale bars: 20  $\mu$ m and 5  $\mu$ m for insets. (B and C) GFP-LC3 HeLa cells were transfected with EV or *BHRF1-HA* plasmids for 24 h and treated with CQ when indicated. Cells were immunostained for TOMM20 and HA. Nuclei were stained with DAPI. (B) Representative images of cells. Insets show part of the cytoplasm at a higher magnification to better visualize colocalization (see arrows) between mitochondria (TOMM20) and autophagosomes (GFP-LC3), as assessed by confocal microscopy. Scale bars: 10  $\mu$ m and 4  $\mu$ m for insets. (C) Colocalization level (Manders split coefficient) between mitochondria and autophagosomes. (D and E) Subcellular fractionation of *BHRF1-HA*- and EV-transfected HeLa cells. VDAC and LDHA were used as markers for mitochondrial and cytosolic fractions, respectively. (D) Immunoblot analysis of PINK1 showing its accumulation at the outer mitochondrial membrane. Same subcellular fractionation experiment as Figure 2B (E). Left: immunoblot analysis of TOMM20. Right: quantification of TOMM20 expression in the mitochondrial fraction showing that BHRF1 decreases the TOMM20 protein level. (F) BHRF1 recruits CFP-PRKN to the mitochondria. Representative images of HeLa cells co-transfected with *BHRF1-HA* plasmid and either EV or CFP-PRKN plasmids for 48 h and immunostained for TOMM20 and HA. Treatment with CCCP was used as a positive control of mitophagy. Cells outline was drawn to better visualize the degradation of mitochondria under BHRF1 and CFP-PRKN expression. Scale bar: 20  $\mu$ m. See Figure S5 for visualization of mitochondria inside LAMP1-positive vesicles in BHRF1-HA-expressing cells. Data represent the mean  $\pm$  SEM of two independent experiments. (C) ns = non-significant; \*\*\*  $P < 0.001$  (one-way ANOVA test). (E) \*  $P < 0.05$  (Student's t-test).



PINK1 in the cytosolic and mitochondrial fractions of BHRF1-expressing cells. As shown on Figure 5D, PINK1 was significantly translocated to the mitochondrial fraction following BHRF1 expression. Then, HeLa cells, which lack a detectable endogenous PRKN, were co-transfected with CFP-PRKN and BHRF1 plasmids for 48 h. Since treatment with the protonophore carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazide (CCCP) for 24 h leads to mitochondrial depolarization, it was herein used as a positive control for mitophagy induction. PRKN distribution was diffuse in the cytoplasm of control cells, whereas PRKN was clearly recruited to mitochondrial clusters in cells expressing CFP-PRKN following mitophagy induction (CCCP treatment) (Figure 5F). Similarly, in cells expressing both CFP-PRKN and BHRF1, CFP-PRKN was recruited to BHRF1-positive structures and mito-aggresomes (Figure 5F). Moreover, in cells expressing CFP-PRKN and BHRF1, the mitochondrial population seemed to decrease compared to the population found in the absence of CFP-PRKN (Figure 5F). These results demonstrated that CFP-PRKN expression potentiated mitochondrial degradation induced by BHRF1 in HeLa cells. However, our results suggested that BHRF1-induced mitophagy could occur independently of PRKN since we observed it in HeLa cells, which have little or no endogenous PRKN expression. Finally, we observed a clear decrease in TOMM20 accumulation in the mitochondrial fraction upon BHRF1 expression, which confirmed a partial degradation of mitochondria (Figure 5E). Altogether, these results confirmed that BHRF1 induces mitophagy.

### **BHRF1 expression blocks type I IFN induction via the MAVS-STING1 signaling pathway**

BHRF1-induced mitochondrial alterations and mitophagy suggested that BHRF1 might impact mitochondria-dependent signaling pathways, such as antiviral signaling and IFN production. Indeed, MAVS, an innate immunity adaptor, is localized at the surface of mitochondria and its interaction with STING1 (stimulator of interferon response cGAMP interactor 1), an ER-resident adaptor, plays a crucial role in the induction of type I IFN production [42]. MAVS and STING1 recruit and activate TBK1 (TANK-binding kinase 1), which phosphorylates the transcription factor IRF3 (interferon regulatory factor 3), leading to its nuclear translocation and subsequent activation of type I IFN promoter [43]. It has been previously reported that fragmentation of the mitochondrial network disrupted the interaction between MAVS and STING1, thus leading to reduced signaling by IRF3 [42]. Moreover, Ding et al. demonstrated that the sequestration of mitochondria in autophagosomes during infection with the human parainfluenza virus type 3 (HPIV3) blocked the IFN response [44].

To investigate the potential significance of BHRF1-mediated mitochondrial network alterations on innate immunity, we performed an *IFNB/IFN- $\beta$*  promoter-driven luciferase reporter assay (Figure 6) [45]. We explored the effect of BHRF1 expression on *IFNB* promoter activation in HEK293T or HeLa cells. To activate the IFN-signaling pathway in a MAVS-dependent manner, we used a dominant-

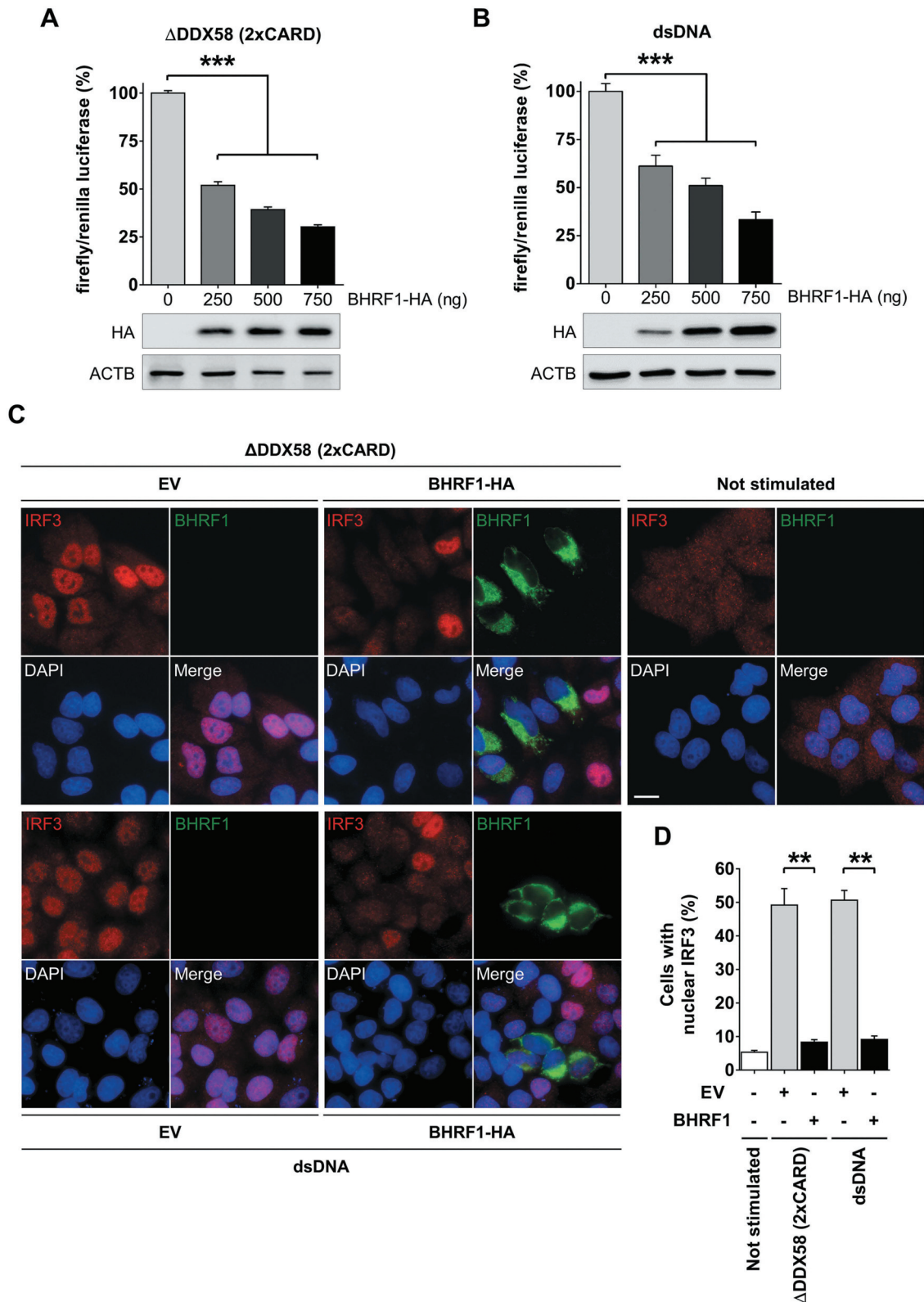
positive mutant form of DDX58/RIG-I ( $\Delta$ DDX58) (Figure 6A) that contains two CARD (caspase recruitment domains), which mimic its oligomerization but lacks the helicase domain [46]. As MAVS contains one CARD [47], it becomes constitutively activated by CARD-CARD interaction in the presence of  $\Delta$ DDX58. Transfection of the double-stranded DNA (dsDNA) was used to activate CGAS, a DNA sensor, to stimulate the STING1 signaling cascade [48] (Figure 6B). BHRF1 expression dramatically blocked the *IFNB* promoter activation by either pathway in a dose-dependent manner (Figure 6A and B). We next examined whether BHRF1 modulated the activation of the transcription factor IRF3. IRF3 staining was diffused in the cytoplasm of non-stimulated cells, but it became mainly nuclear in response to  $\Delta$ DDX58 or dsDNA transfection in cells expressing an empty control vector (Figure 6C). Conversely, IRF3 nuclear translocation was clearly abrogated in the BHRF1-expressing cells following MAVS or STING1 activation. We measured the percentage of cells that exhibited nuclear IRF3 in EV or BHRF1-expressing cells and observed a ten-fold decrease when BHRF1 was expressed (Figure 6D). Together, these observations showed that BHRF1 prevented MAVS and STING1-mediated *IFNB* pathway activation.

### **Mitochondrial fission and autophagy induction are both necessary to block *IFNB* induction**

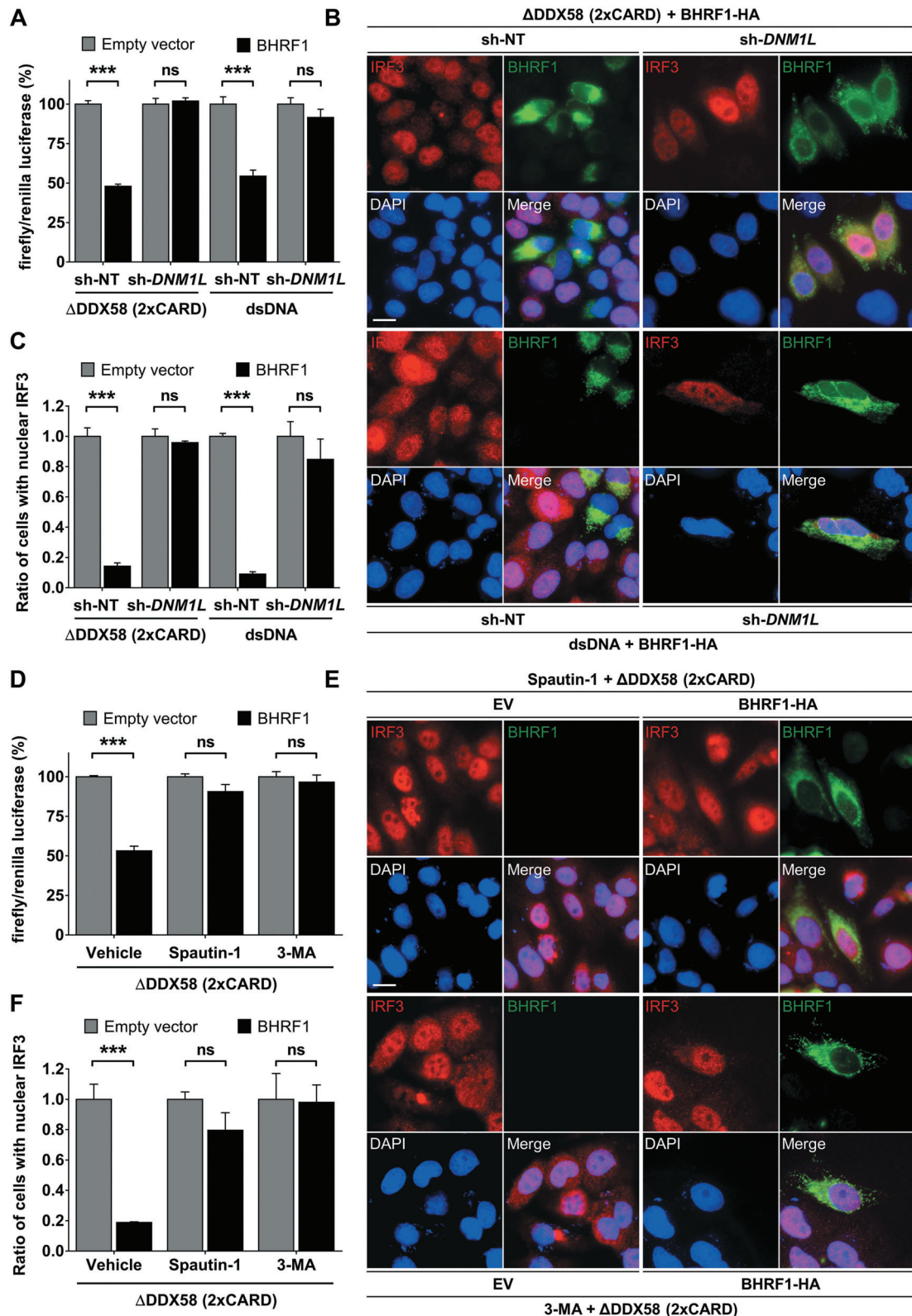
We speculated that mitochondrial fission might be required for BHRF1 to downregulate the *IFNB* response. To test this hypothesis, we used sh-*DNM1L* HEK293T or sh-*DNM1L* HeLa cells and measured the *IFNB* promoter activity, as before (Figure 6A and B). We observed that *DNM1L* knock-down abolished the inhibitory effect of BHRF1 on the *IFNB* promoter activation triggered by  $\Delta$ DDX58 or dsDNA (Figure 7A). Similarly, nuclear translocation of IRF3 was abrogated by BHRF1 in sh-NT cells, whereas BHRF1 lost this ability in sh-*DNM1L* cells (Figure 7B and C). Altogether, these results showed that BHRF1 required *DNM1L*-dependent mitochondrial fission to block the *IFNB* induction. Since we previously demonstrated that BHRF1 activated the autophagic flux, we speculated that autophagy might be required for BHRF1 to block the *IFNB* induction as well. To test this hypothesis, cells were treated with two different autophagy inhibitors, Spautin-1 and 3-MA. As shown in Figure 7D, both treatments totally abrogated the ability of BHRF1 to inhibit the *IFNB* induction in response to  $\Delta$ DDX58 transfection, suggesting that autophagy induction is necessary for BHRF1 to inhibit the *IFNB* system. This result was further confirmed by the inability of BHRF1 to block nuclear IRF3 translocation in response to  $\Delta$ DDX58 or dsDNA activation when autophagy was inhibited by Spautin-1 or 3-MA (Figure 7E and F).

## **Discussion**

Whereas it has been reported that BHRF1, an EBV-encoded protein, acts on the mitochondria to control apoptosis, only one study previously noticed that BHRF1 might modify the distribution of the mitochondria [19]. However, the



**Figure 6.** BHRF1 inhibits type I IFN induction via MAVS or STING1 signaling pathways. (A and B) Luciferase reporter assay on HEK293T or HeLa cells co-transfected with plasmids expressing BHRF1-HA, the reporter plasmid expressing firefly luciferase under the control of the *IFNB* promoter (*IFNB-Luc*) and renilla luciferase (RL-TK; to standardize the transfection efficiency). The activation of the *IFNB* promoter was analyzed 24 h after transfection. Below the histograms, immunoblot analysis of BHRF1-HA from HEK293T or HeLa cells transfected with increasing amounts of *BHRF1-HA* plasmid are shown. ACTB was used as a loading control. (A) To study the MAVS pathway, HEK293T cells were transfected with the *Flag-ΔDDX58 (2xCARD)* plasmid to express a dominant-positive form of DDX58. (B) To study the STING1 pathway, HeLa cells were stimulated with dsDNA for the last 8 h to activate the CGAS-STING1 axis. Firefly/renilla luciferase ratios were calculated and normalized to control condition (EV) to assess the activation level of the *IFNB* promoter. (C and D) HeLa cells were transfected with EV or *BHRF1-HA* for 24 h. Cells were also transfected with *Flag-ΔDDX58 (2xCARD)* plasmid or stimulated with dsDNA. After fixation, cells were immunostained for IRF3 and BHRF1. Nuclei were stained with DAPI. (C) Representative images. Scale bar: 20  $\mu$ m. (D) Percentage of cells with IRF3 nuclear localization. Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (A and B) \*\*\*  $P < 0.001$  (one-way ANOVA test). (D) \*\*  $P < 0.01$  (Student's t-test).



**Figure 7.** Mitochondrial fission and autophagy are required for BHRF1-inhibitor effect on type I IFN induction. (A) Luciferase reporter assay on sh-*DNM1L* HEK293T or sh-*DNM1L* HeLa cells and their corresponding control cell lines (sh-NT). Cells were co-transfected with EV or *BHRF1-HA*, *IFNB-Luc*, and *RL-TK* plasmids for 24 h. HEK293T cells were also transfected with *Flag-ΔDDX58 (2xCARD)* plasmid and HeLa cells were stimulated with dsDNA. Firefly/renilla luciferase ratios were calculated and normalized to control conditions (EV). (B and C) sh-NT and sh-*DNM1L* HeLa cells were transfected with EV or *BHRF1-HA* plasmids. Cells were also transfected with *Flag-ΔDDX58 (2xCARD)* plasmid or stimulated with dsDNA and immunostained for IRF3 and BHRF1. Nuclei were stained with DAPI. (B) Representative images of BHRF1-HA-expressing cells. Scale bar: 20  $\mu$ m. (C) Quantification of IRF3 nuclear localization, normalized to EV condition. (D) Luciferase reporter assay, as described in Figure 6A. HEK293T cells were transfected with *Flag-ΔDDX58 (2xCARD)* plasmid to stimulate IFN production. To inhibit autophagy, cells were treated by Spautin-1 or 3-MA. Firefly/renilla luciferase ratios were calculated and normalized to control conditions (EV). (E and F) HeLa cells were co-transfected with *Flag-ΔDDX58 (2xCARD)* and EV or *BHRF1-HA* plasmids. Cells were treated with Spautin-1 or 3-MA, and immunostained for IRF3 and BHRF1. Nuclei were stained with DAPI. (E) Representative images. Scale bar: 20  $\mu$ m. (F) Quantification of IRF3 nuclear localization, normalized to EV condition. Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. ns = non-significant; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  (Student's t-test).

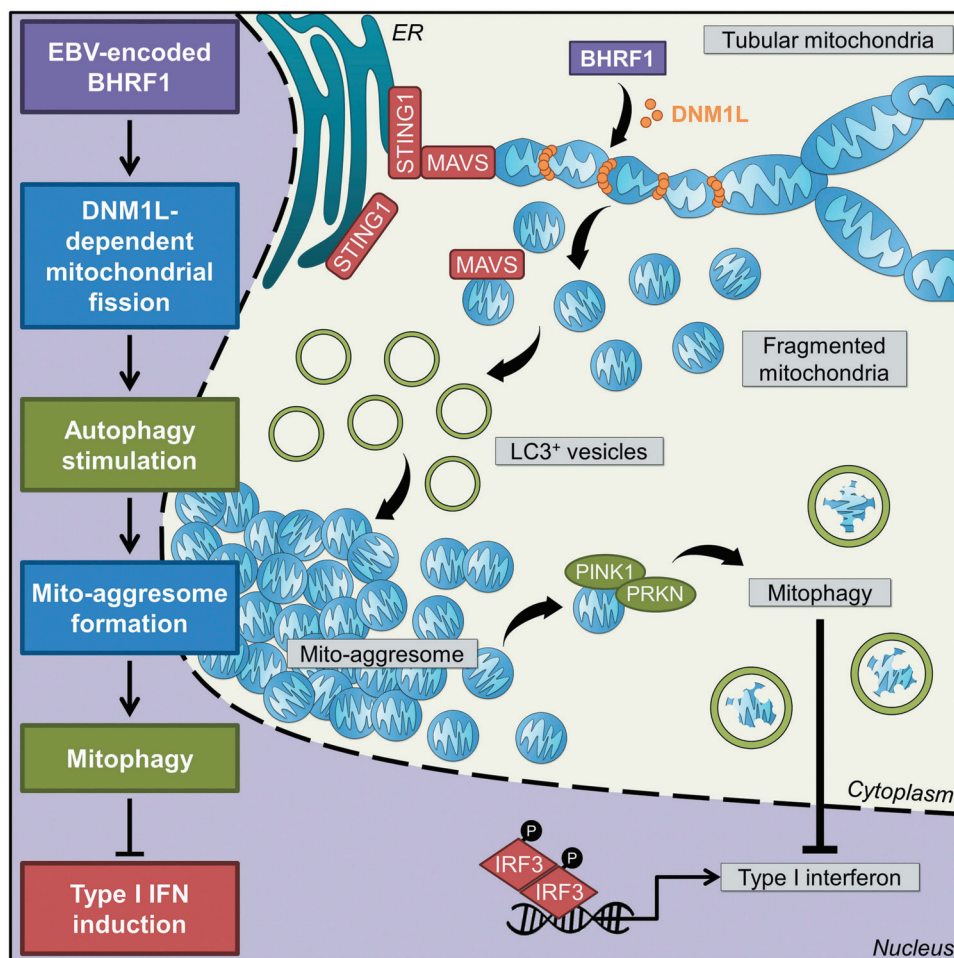


mechanisms leading to BHRF1-induced mitochondrial reorganization, as well as their functional consequences, have not been explored so far. In the present study, we shed new light on the role of BHRF1 and provide evidence that contributes to innate immunity evasion. It is shown here that BHRF1 dampens the type I IFN activation pathway by promoting the fragmentation and subsequent sequestration of mitochondria in autophagosomes, which eventually leads to their degradation by mitophagy (Figure 8). This notion could be explained by the fact that MAVS, which is localized on the mitochondrial surface, might become unavailable for functional interaction with STING1.

Throughout evolution, herpesviruses, such as EBV, HSV-1, or human cytomegalovirus (HCMV), have developed numerous strategies to escape the innate immune response [49], and several EBV-encoded proteins have been described to block type I IFN production by different mechanisms. Hahn et al. initially reported that the trans-activator protein BZLF1/ZEBRA/Zta interferes with type I IFN production. During EBV reactivation, BZLF1 counteracts IFNA4 and IFNB production by interacting with IRF7, although BZLF1 does not

affect the nuclear localization of IRF7 [50]. The other immediate early activator BRLF1/Rta can also suppress IFNB production by decreasing both IRF3 and IRF7 expression in reactivated Akata cells [51]. EBV-encoded BGLF4 kinase can interact with IRF3 and inhibits its phosphorylation [52]. Additionally, the tegument protein LF2 blocks IRF7 dimerization directly inside the nucleus [53]. Finally, it has been recently demonstrated that EBV reactivation is associated with the induction of cellular TRIM29, which leads to the proteasomal degradation of STING1 and, therefore, inhibits the downstream signaling cascade [54]. In this report, we discovered that BHRF1 inhibits the type I IFN activation pathway through an original mechanism, which involves mitochondrial dynamics and autophagy.

Besides its role in the maintenance of cellular homeostasis, autophagy is a process with multiple effects on immunity. Indeed, during viral infections, autophagy plays a crucial role by promoting the clearance of viral components but also by activating innate immunity in order to produce antiviral cytokines. However, some viruses have developed different strategies to impair the immune response by subverting



**Figure 8.** Working model. Expression of BHRF1, a BCL2 viral homolog encoded by the Epstein-Barr virus, is able to modify mitochondrial dynamics. Recruitment of a DNM1L active form upon BHRF1 expression induces mitochondrial fission. This fission is required to stimulate autophagy by BHRF1, leading to the formation of mito-aggresomes. Then, numerous mitochondria are sequestered inside autophagosomes in order to be degraded by BHRF1-induced mitophagy. The innate immune signaling adaptors MAVS and STING1 are located at the mitochondria and at the ER, respectively. They can interact together and play a pivotal role in the antiviral response by inducing type I interferons. BHRF1 modulates the mitochondrial fate by the sequestration of mitochondria in autophagic vacuoles and mitophagy and finally leads to inhibition of type I IFN induction via both MAVS and STING1 pathways.

autophagy [55]. One mechanism relies on the suppression of the signal transduction related to the autophagic degradation of signaling proteins, such as MAVS or DDX58. Following viral infection, BST2/tetherin recruits MARCHF8, an E3 ubiquitin ligase, in order to mediate the K27-ubiquitination of MAVS for CALCOCO2/NDP52-dependent degradation [56]. LRRC25, another key negative regulator of type I IFN, stimulates the interaction between DDX58 and the autophagic cargo receptor SQSTM1, therefore, promoting DDX58 degradation by selective autophagy [57]. Autophagic proteins can also interfere with innate immunity by directly inhibiting signaling molecules. To that respect, ATG12-ATG5 conjugate downregulates the DDX58 signaling by directly binding to DDX58 and MAVS CARD domains [58]. J. Cui and collaborators have demonstrated that BECN1 can also block the interaction between DDX58 and MAVS [59]. They have shown that the USP19 (ubiquitin-specific peptidase 19), which stabilizes BECN1 by deubiquitination, allows its interaction with the MAVS CARD domain and, therefore, inhibits the DDX58-mediated type I IFN signaling. Members of the IRF family are also targeted by autophagic proteins to downregulate type I IFN production. Kim et al. have reported that RUBCN/Rubicon, an autophagic inhibitor, can suppress IRF3 dimerization by interacting with the IRF association domain [60]. Mitochondrial sequestration into autophagosomes may be an additional mechanism to downregulate type I IFN signaling [44]. Indeed, it has been recently reported that the HPIV3-encoded matrix protein M triggers mitochondrial sequestration and inhibits the type I IFN response. However, the final degradation of mitochondria does not occur in infected cells, thanks to the expression of the phosphoprotein P that inhibits the maturation of autophagosomes [44]. Here, we show that BHRF1 protein induces the sequestration of fragmented mitochondria in autophagosomes, which leads to their degradation by mitophagy, thereby suppressing type I IFN production (Figure 8). Three EBV-encoded proteins (BRLF1, BZLF1, and BALF0/1) have been described to induce autophagy when ectopically expressed, but their involvement regarding the IFN signaling pathway was not investigated [17,61,62].

Modifications of mitochondrial distribution, mitochondrial fission, and/or mitophagy have been reported to occur during several viral infections. Indeed, other herpesviruses than EBV, such as HSV-1, pseudo rabies virus (PRV), and HCMV, have been reported to disrupt the mitochondrial network and promote aberrant mitochondrial dynamics [63,64]. Interestingly, the hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) also induce the formation of mito-aggregates in a juxtannuclear region, mitochondrial fission, and subsequent mitophagy [40,65]. The activation of mitophagy during HBV or HCV infection seems essential for the clearance of damaged mitochondria, contributes to cell survival and attenuates the virus-induced mitochondrial apoptotic cell death. The expression of proteins encoded by different viral families can also reproduce the effects on mitochondria observed during viral infection. For example, the expression of HBx, encoded by HBV, promotes mitochondrial fragmentation and PRKN-dependent mitophagy [40]. The anti-apoptotic protein vMIA (viral mitochondrion-localized inhibitor of apoptosis), encoded by

HCMV, induces mitochondrial fragmentation either alone or in the context of viral infection [63]. Nevertheless, vMIA induces only minor modifications of the membrane potential and seems unable to initiate mitophagy [63,66]. Until now, the LMP2A (latent membrane protein 2A), is the only EBV protein that has been reported to modify the mitochondrial network and increase DNMI1L-dependent mitochondrial fission [67]. BHRF1 is, therefore, the first EBV protein described to trigger mitophagy. It is tempting to speculate that BHRF1 participates to cell survival in EBV-infected cells by the attenuation of mitochondrial apoptosis, similar to HBV and HCV, by inducing mitophagy and autophagy. Moreover, due to its expression during some latency programs and by inhibiting type I IFN activation pathways, BHRF1 may favor the establishment of latent EBV infection. Indeed, BHRF1, currently described as the tenth latent protein, is constitutively expressed during Wp-restricted latency and from Wp-initiated transcripts in Latency III [1]. Since type I and II IFN were described for their antiproliferative properties, BHRF1 could also participate in EBV-related cancer development by impairing type I IFN production [68]. However, further studies are required to confirm the significance of our findings in the context of latency.

## Materials and methods

### Antibodies, plasmids, and reagents

References of materials used in this study are summarized in Table 1. The *BHRF1-HA* expression vector was constructed by inserting the *BHRF1* open reading frame in the pcDNA3.1 expression vector (Invitrogen, V79020). Briefly, *BHRF1* ORF was amplified by PCR with AmpliTaq Gold® Master Mix (Applied Biosystems™, 10460085) using genomic DNA extracted from Burkitt lymphoma Akata cell line and *BHRF1*-specific primers (Table 1). The Reverse primer has been designed so that an HA-tag (YPYDVPDYA) is fused in frame at the C terminus of BHRF1. The PCR product was inserted in the EcoRI site of pcDNA3.1 by recombination using the Cold Fusion Cloning kit (Ozyme, MC100A-1) according to the manufacturer's instructions.

### Cell culture and treatments

HeLa and HEK293T cells (ATCC, CRL11268) were cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) as previously described [69,70]. DNMI1L knockdown (sh-*DNMI1L*) and corresponding control (sh-NT) cell lines were generated from HeLa or HEK293T cells and were cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in DMEM supplemented with 10% FCS and puromycin (2.5 µg/mL). HEK293/EBV<sup>+</sup> cells harboring WT and ΔBHRF1 bacmids were kindly provided by Wolfgang Hammerschmidt (German Research Center for Environmental Health and German Center for Infection Research, Munich, Germany) [7] and were grown at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in DMEM supplemented with 10% FCS and hygromycin B (100 µg/mL). GFP-LC3 stably transfected HeLa cells were kindly provided by Aviva Tolkovsky

**Table 1.** Materials used in this study.

| <b>Antibodies</b>   | <b>Source</b>                             | <b>Identifier</b>   |
|---|---|---|
| Mouse Anti-Human SQSTM1 Monoclonal Antibody, Unconjugated, Clone 2C11                         | Abnova Corporation                        | H00008878-M01   |
| IgG antibody  | Agilent                                   | A0423   |
| BECN1/Beclin 1 antibody   | BD Biosciences                            | 612,112   |
| DNM1L/Drp1 antibody   | BD Biosciences                            | 611,738   |
| TIMM23/Tim23 antibody   | BD Biosciences                            | 611,223   |
| TOMM20/Tom20 antibody   | BD Biosciences                            | 612,278   |
| DNM1L/DRP1 (D6C7) rabbit mAb antibody   | Cell Signaling Technology                 | 8570  |
| LAMP1 (D2D11) XP rabbit Antibody  | Cell Signaling Technology                 | 9091  |
| Phospho-DNM1L/DRP1 (Ser637) (D3A4) rabbit mAb antibody  | Cell Signaling Technology                 | 6319  |
| Alexa Fluor 488-AffiniPure goat anti-mouse IgG (H + L) antibody                               | Jackson ImmunoResearch                    | 115-545-003   |
| Alexa Fluor 488-AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H + L) antibody                              | Jackson ImmunoResearch                    | 111-545-003   |
| Peroxidase-AffiniPure goat anti-mouse IgG (H + L) antibody                                    | Jackson ImmunoResearch                    | 115-035-003   |
| Peroxidase-AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H + L) antibody                                   | Jackson ImmunoResearch                    | 111-035-003   |
| Anti-human LC3 polyclonal antibody  | MBL International                         | PM036   |
| Anti-ACTB/ $\beta$ -actin, clone C4 antibody  | Millipore                                 | MAB1501   |
| Anti-EBV EA-R-p17, clone 5B11 antibody  | Millipore                                 | MAB8188   |
| BECN1/Beclin 1 human, mouse   | Novus                                     | NB500-249   |
| PINK1 antibody  | Novus                                     | BC100-494   |
| BECN1 (D-18) antibody   | Santa Cruz Biotechnology                  | 10,086  |
| EBV Ea-D (0261) antibody  | Santa Cruz Biotechnology                  | 58,121  |
| EBV BZLF1/ZEBRA (BZ1) antibody  | Santa Cruz Biotechnology                  | 53,904  |
| HA-probe (Y-11) antibody  | Santa Cruz Biotechnology                  | 805   |
| IRF3/IRF-3 (SL-12) antibody   | Santa Cruz Biotechnology                  | 33,641  |
| IRF3/IRF-3 (FL-425) antibody  | Santa Cruz Biotechnology                  | 9082  |
| Anti-LC3B antibody produced in rabbit   | Sigma-Aldrich                             | L7543   |
| Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody   | Sigma-Aldrich                             | F3165   |
| Donkey anti-mouse IgG (H + L) highly cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 647       | Thermo Fisher Scientific                  | A-31,571  |
| Goat anti-mouse IgG (H + L) cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 350                | Thermo Fisher Scientific                  | A-11,045  |
| Goat anti-mouse IgG (H + L) highly cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 555         | Thermo Fisher Scientific                  | A-21,424  |
| Goat anti-rabbit IgG (H + L) highly cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 555        | Thermo Fisher Scientific                  | A-21,429  |
| LDHA polyclonal antibody  | Thermo Fisher Scientific                  | PA5-27,406  |
| VDAC antibody   | Provided by C Brenner (Inserm UMR-S 1180) | N/A   |
| <b>Dye and markers</b>  | <b>Source</b>                             | <b>Identifier</b>   |
| DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride)   | Thermo Fisher Scientific                  | D1306   |
| Hoechst 33,342  | Thermo Fisher Scientific                  | H3570   |
| MitoTracker Red CMXRos  | Life technologies                         | M7512   |
| Protein ladder prestained   | Euromedex                                 | 06P-0111  |
| <b>Oligonucleotides and DNA</b>   | <b>Source</b>                             | <b>Identifier</b>   |
| BHRF1 ORF forward primer: AGTCCAGTGTGGAAGATGGCCTATTCAACA                                      | This paper                                | N/A   |
| BHRF1 ORF reverse primer:<br>GATATCTGCAGAAATTTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGTGTCTTCCTCTGGAGAT | This paper                                | N/A   |
| Deoxyribonucleic acid, low molecular weight from salmon sperm                                 | Sigma-Aldrich                             | 31,149-10 G-F   |
| <b>Plasmids</b>   | <b>Source</b>                             | <b>Identifier</b>   |
| BECN1 expression vector   | [33]                                      | N/A   |
| BHRF1-HA expression vector  | This paper                                | N/A   |
| CFP-Parkin  | Addgene                                   | 47,560  |
| pFlag-ICP34.5   | [37]                                      | N/A   |
| pFlag-DDX58 (2xCARD)  | [46]                                      | N/A   |
| pIFN- $\beta$ -Luc  | [45]                                      | N/A   |
| pMito mRFP-EGFP   | Provided by Andreas Till [40]             | N/A   |
| pcDNA3.1 empty vector (EV)  | Invitrogen                                | N/A   |
| pRL Renilla Luciferase Control Reporter Vectors   | Promega Corporation                       | E2241   |
| BZLF1 expression vector   | [23]                                      | N/A   |
| <b>Reagents and kit</b>   | <b>Source</b>                             | <b>Identifier</b>   |
| Bovine serum albumin (BSA)  | Euromedex                                 | 04-100-812-C  |
| Deoxycholic acid  | Sigma                                     | D-6750  |
| Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)   | Gibco                                     | 41,965-039  |
| Dual-luciferase reporter assay system   | Promega Corporation                       | E1910   |
| Fetal calf serum (FCS)  | Dominique Dutscher                        | S181B-500   |
| Fugene HD transfection reagent  | Promega Corporation                       | E2311   |
| Glycergel Mounting Medium   | Dako                                      | C0563   |
| Hepes, Sodium   | Sigma-Aldrich                             | H-3662  |
| Hexadimethrine bromide (Polybrene)  | Sigma-Aldrich                             | H9268   |
| Immobilon western   | Merck Millipore                           | MA01821   |
| Oligofectamine  | Thermo Fisher Scientific                  | 12,252,011  |
| Opti-MEM  | Gibco                                     | 31,985-047  |
| Phosphate buffered saline (PBS)   | Gibco                                     | 14,200-067  |
| Protease inhibitor cocktail   | Sigma-Aldrich                             | P8340   |
| RPMI medium 1640  | Gibco                                     | A10491-01   |
| Triton X-100  | Sigma-Aldrich                             | T-8787  |
| <b>Software and algorithms</b>  | <b>Source</b>                             | <b>Identifier</b>   |
| Prism (GraphPad 5.00)   | GraphPad Software                         | <a href="https://www.graphpad.com/">https://www.graphpad.com/</a> |

(Continued)



Table 1. (Continued).

| Antibodies   | Source   | Identifier   |
|--|--|--|
| ImageJ (Fiji)<br>LAS AF Lite   | ImageJ software<br>Leica Microsystems CMS GmbH | <a href="https://fiji.sc/">https://fiji.sc/</a><br><a href="https://www.leica-microsystems.com/fr/">https://www.leica-microsystems.com/fr/</a> |
| Viruses  | Source   | Identifier   |
| MISSION pLKO.1-puro non-target shRNA control transduction particles<br>MISSION lentiviral transduction particles (Drp1 sh-RNA) | Sigma-Aldrich<br>Sigma-Aldrich                 | SHC016V<br>SHCLNV  |

(Cambridge Center for Brain Repair, Cambridge, UK) [28] and mRFP-GFP-LC3 stably transfected HeLa cells were kindly provided by David Rubinsztein (University of Cambridge School of Clinical Medicine, Cambridge, UK) [30]. They were grown in DMEM supplemented with 10% FCS and G418 (500 µg/mL). The EBV-positive Burkitt lymphoma cell line Akata was cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS as previously described [62].

For stress induction, culture media was replaced by freshly prepared media containing the indicated drugs. Mitochondrial fission was induced by culturing cells in media supplemented with NaCl (125 mM) for 30 min and mitophagy was promoted by CCCP treatment (10 µM) for 4 h. Starvation-induced autophagy was carried out by placing the cells in EBSS for 4 h before cell lysis. Autophagic flux was monitored by the addition of CQ (50 µM) 4 h before cell lysis. Autophagy inhibition was performed in two different ways: addition of spautin-1 (20 µM) or 3-MA (5 mM) in culture media for 6 h.

### Cell transfection

DNA plasmid transfections were performed using Fugene HD transfection reagent (Promega Corporation, E2311) according to the manufacturer's protocol. One-day prior transfection, the cells were seeded in 24-well plates and incubated at 37°C. On the day of transfection, DNA plasmids were diluted in opti-MEM and Fugene HD was added to the mix (ratio DNA:Fugene equals 1:3). After incubation for 10 min at room temperature (RT), the transfection mix was added to the cells. The cells were incubated at 37°C and 6 h post-transfection DMEM supplemented with 10% FCS was added. Depending on the expression plasmids, cells were fixed 24 h or 48 h post-transfection.

Cells transfection with linear dsDNA was performed using oligofectamine transfection reagent (Thermo Fisher Scientific, 12,252,011) according to the manufacturer's protocol. One-day prior transfection, the cells were seeded in 24-well plates and incubated at 37°C. On the day of transfection, linear dsDNA (final concentration of 5 µg/mL) and oligofectamine were diluted in opti-MEM and separately incubated for 5 min at RT. Both mixes were then pooled and incubated for 20 min at RT. After one phosphate-buffered saline (PBS) wash, the culture medium was changed to opti-MEM, and the transfection mix was added. The cells were incubated at 37°C and 4 h post-transfection, DMEM supplemented with 30% FCS was added to the cells. Finally, cells were fixed 8 h post-transfection.

### Co-immunoprecipitation assays

To study the interaction between BHRF1 and BECN1, HeLa cells cultured in 6-well plates were transfected to co-express BECN1, and different molecular partners tested (EV, BHRF1-HA or Flag-ICP34.5). Two days (48 h) after transfection, cells were washed with cold, sterile PBS and then lysed at 4°C for 2 h in lysis buffer (50 mM Tris HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.5% Triton X-100 [Sigma-Aldrich, T-8787], 0.5% deoxycholic acid [Sigma-Aldrich, D-6750], 0.2% bovine serum albumin [BSA], 25 mM NaPPI [Sigma-Aldrich, P8010], 50 mM NAF [Merck Millipore, 7681-49-4], 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) followed by centrifugation at 20,000 g at 4°C for 30 min to remove cell debris. BECN1 was immunoprecipitated with a goat anti-BECN1 antibody (20 µg/mL). The interaction between BHRF1-HA and endogenous BECN1 was also explored by immunoprecipitation with a rabbit anti-HA antibody (20 µg/mL). Immunoprecipitations were performed overnight at 4°C. Protein G-Sepharose beads (Ademtech, 04332) were added for 2 h at 4°C and were washed three times with lysis buffer and twice with wash buffer (20 mM Tris HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.2% BSA). The immune complexes were finally boiled for 5 min in loading buffer (62.5 mM Tris, pH 6.8, 10% glycerol [Euromedex, EU3550], 1.5% SDS [Euromedex, EU0660], 0.025% bromophenol blue [Sigma-Aldrich, B8026], 8% beta-mercaptoethanol [Sigma-Aldrich, M3148]) before being analyzed by SDS-PAGE.

### Cytosol extraction and purification of mitochondrial fractions

Mitochondrial fractions were prepared using a digitonin-based subcellular fractionation technique, as described previously [26]. Briefly, HeLa cells transfected with an EV or *BHRF1-HA* plasmids were plated 48 h before the experiment in 6-well plates. After being washed twice with PBS, cells were permeabilized with lysis buffer (250 mM sucrose, 70 mM KCl, 137 mM NaCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2, supplemented with 200 µg/mL digitonin [Sigma-Aldrich, D141], and a cocktail of protease/phosphatase inhibitors) for 5 min on ice and then collected before being centrifugated at 1,000 g for 10 min. The cytosolic fraction consisted of the supernatant whereas the pellet, containing mitochondria, was resuspended in mitochondrial lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA [Euromedex, EU0084-A], 2 mM EGTA [Merck Millipore, 324,626], 0.2% Triton X-100, 0.3% NP-40 [Sigma-Aldrich, 74,385] and a cocktail of protease and phosphatase inhibitors [Sigma-Aldrich, PPC1010]) and incubated for 5 min on ice. After



centrifugation at 10,000 g for 10 min, the pellet was discarded and the supernatant corresponded to the mitochondrial fraction. Purity of the mitochondrial fraction was confirmed by the presence of the mitochondrial marker VDAC (voltage dependent anion channel) and quasi-absence of a cytosolic marker, LDHA (lactate dehydrogenase A).

### **EBV-positive cells and EBV reactivation**

Akata cells correspond to EBV-positive Burkitt lymphoma B cells, where EBV gene expression is limited to type I latency. To induce the EBV lytic cycle, cells were treated with polyclonal rabbit anti-human IgG at 7.5 µg/mL for 8 h. Then, the cells were washed with PBS and incubated at 37°C with MitoTracker Red CMXRos (250 nM) for 30 min. Following incubation, cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min, and permeabilized in PBS, Triton X-100 (0.2%) for 5 min. The cells were pelleted and resuspended with PBS. The cell suspension was then fixed to microscope slides via cytocentrifugation using a cytospin (A78300003; Thermo Fisher Scientific, USA) at 1,200 g under medium acceleration mode for 1 min. Cells were blocked and immunostained as described below. We also used HEK293/EBV WT and  $\Delta$ BHRF1 mutant cells. These cells harbor the genome of the EBV strain B95.8 [7]. To induce EBV reactivation, cells were transfected with a *BZLF1* (also called ZEBRA, Zta or EB1) expression plasmid for 48 h, or an EV as a control [23]. Then, the cells were washed with PBS and incubated at 37°C with MitoTracker Red CMXRos (250 nM) for 30 min. Following incubation, cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min and permeabilized in PBS, Triton X-100 (0.2%) for 5 min. Cells were blocked and immunostained as described below.

### **Establishment of stable *DNM1L* knockdown cell lines**

Stable HeLa and HEK293T cells knockdown for *DNM1L* expression were established using lentiviral transduction. *DNM1L* and non-target shRNA (sh-NT) were purchased from Sigma (MISSION lentiviral transduction particles). One-day before transduction, the cells were seeded in 96-well plates. On the day of transduction, the cells were placed in transduction media (DMEM supplemented with 10% FCS, Hepes 10 mM and polybrene [Sigma-Aldrich, H9268] 8 µg/mL). Then, the cells were infected with lentiviruses at a multiplicity of infection of 0.5, 1 or 5. One-day post-transduction, the culture medium was replaced by DMEM supplemented with 10% FCS. Two days post-transduction, sh-NT and sh-*DNM1L*-expressing cells were selected by the addition of puromycin (5 µg/mL) in the culture medium. To assess the knockdown, proteins level in cells stably expressing the sh-*DNM1L* were compared to cells expressing a sh-NT by immunoblot.

### **Immunoblot analysis**

Cells were lysed in lysis buffer (65 mM Tris, pH 6.8, 4% SDS, 1.5% beta-mercaptoethanol and a cocktail of protease/phosphatase inhibitors) and held at 100°C for 10 min. Protein extracts were resolved on SDS-PAGE (12.5%) and electro-transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Amersham, 10,600,002). After 1 h of incubation in blocking buffer (PBS, 0.1% Tween 20 [Euromedex, 2001] and 5% BSA [Euromedex, 04-100-812] or nonfat dry milk), the membranes were probed overnight at 4°C with primary antibodies. Horseradish peroxidase-labeled antibodies were used as secondary antibody, and revelation was performed using the ECL detection system according to the manufacturer's instructions (Merck Millipore, WBKLS0500). Scanning for quantification of protein levels was monitored using ImageJ software. An anti-ACTB (actin beta) antibody was used to ensure equal loadings and normalize quantification.

### **Immunofluorescence microscopy**

For indirect immunofluorescence, cells were cultured on glass coverslips in 24-well plates. Cell monolayers were washed with PBS and cells were fixed with paraformaldehyde (4%) in PBS or methanol or acetone/water, depending on the antibodies. The cells were treated with PBS, NH<sub>4</sub> Cl (50 mM) for 10 min, permeabilized using PBS, Triton X-100 (0.2%) for 4 min, washed twice with PBS and then incubated for 1 h in PBS, gelatin (0.2%; Sigma-Aldrich, G7765) supplemented with FCS (5%) for blocking. Then the cells were incubated for 1 h with appropriate primary antibody diluted in PBS, gelatin (0.2%) at RT. Cells were washed three times with PBS and then incubated with appropriate secondary antibody diluted in PBS, gelatin (0.2%) for 1 h at RT. After washing, the nuclei were counterstained with DAPI or Hoechst 33,342. Coverslips were mounted in glycerol (Agilent Dako, C056330-2) and observed by microscopy as described below.

For the labeling of autophagic vesicles, cells were fixed with paraformaldehyde (4%) in PBS. Permeabilization and blocking were performed by treating the cells with PBS, NH<sub>4</sub> Cl (50 mM) for 10 min followed by an incubation of 30 min with PBS, saponin (0.075%; Sigma-Aldrich, 84,510), BSA (1%) and FCS (5%). Then the appropriate primary antibody diluted in PBS, saponin (0.075%) and BSA (1%) was incubated for 1 h at RT. The cells were then washed twice in PBS, saponin (0.075%), BSA (1%), once with PBS, saponin (0.037%), BSA (0.5%) and twice in PBS. Then, cells were incubated with appropriate secondary antibody diluted in PBS, saponin (0.075%), BSA (1%). After washing, nuclei were counterstained with DAPI. Coverslips were mounted in glycerol and observed using a Nikon Eclipse 80i epifluorescence microscope (Nikon Instruments) or a Leica TCS SP8 X inverted confocal microscope (Leica, USA). Photographic images were resized, organized and labeled using ImageJ software or LAS AF Lite. For colocalization analysis, line profiles

were performed using LAS AF Lite software and Manders split coefficients were determined using ImageJ software.

### Luciferase reporter assays

HEK293T or HeLa cells were cultured in 24-well plates and transfected for 24 h using Fugene HD, with plasmids encoding the *IFNB* luciferase reporter (firefly luciferase; 100 ng), pRL-TK (Renilla luciferase; 25 ng) and increasing concentrations (0, 250, 500, or 750 ng) of plasmids expressing BHRF1-HA. EV was used to maintain equal amounts of DNA among wells. To study the *IFNB* promoter activation dependent on the MAVS pathway, a transfection with 150 ng of a plasmid encoding a positive dominant form of DDX58/RIG-I (Flag- $\Delta$ DDX58 [2xCARD]) was performed. In order to study the *IFNB* promoter activation dependent on STING1 pathway, a stimulation by salmon sperm dsDNA (5  $\mu$ g/mL) was performed for 8 h using oligofectamine as previously described [48]. 24 h post-transfection, cells were lysed and measurement of firefly and renilla luciferase activities was performed using the dual-luciferase reporter assay system (Promega Corporation, E1910) according to the manufacturer's protocol. Relative expression levels were calculated by dividing the firefly luciferase values by those of renilla luciferase and normalized to the control condition (without BHRF1-HA expression).

### Results quantification

**Mito-aggresomes** are scored by measuring the CI of mitochondrial staining, as previously described [21]. Briefly, the CI corresponds to the fact that compacted mitochondria occupied a limited area of the cell compared to mitochondria that are dispersed throughout the cell. The CI was calculated from the perimeter and the area occupied by mitochondria using the formula developed by Narendra et al [21]. A CI close to 1 corresponds to mitochondria being maximally compact, whereas a CI close to 0 corresponds to mitochondria being minimally compact. We arbitrarily determined that a cell presents a mito-aggresome when the CI is above 0.4. The percentage of cells presenting a mito-aggresome was determined by counting at least 20 random cells in each condition from three independent experiments. **Mitochondria average length** was determined using ImageJ software. Images were converted into 8-bit, and brightness/contrast was adjusted in order to better visualize isolated mitochondria. For each condition, the length of 20 isolated mitochondria per cell was measured on 10 random cells from three independent experiments. The number of endogenous **LC3-dots** (or GFP-LC3 dots) per cell was determined using ImageJ software. All images were taken with the same microscope settings to be compared to each other. Images were converted into 8-bit. Cells outline was drawn and nuclei cropped to conserve only cytoplasm part. Thresholding of images was performed to detect only LC3 vesicles. Note that the value of the threshold was conserved and used for each analyzed cell. Finally, the “analyze particles” plug-in was used in order to count the total number of LC3-dots per cell. For each condition, at least 25 cells were analyzed in three independent experiments. To quantify **colocalization degree** between red channel and

green channel, the measurement of Manders split coefficient was performed using the “colocalization threshold” plug-in. For each condition, 10 random cells were analyzed. Proportion of cells presenting an **IRF3 nuclear localization** was determined by counting at least 50 random cells in each condition from three independent experiments. Scanning for quantification of protein levels was monitored using ImageJ software. An anti-ACTB antibody was used to ensure equal loadings and normalize quantification.

### Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean) and were analyzed with Prism software (GraphPad) by using Student's t-test or one-way ANOVA (analysis of variance) test comparisons. P values less than 0.05 were considered statistically significant. Three independent experiments were performed.

### Acknowledgments

We would like to thank D. Rubinsztein (University of Cambridge School of Clinical Medicine, Cambridge, UK) for providing us the mRFP-GFP-LC3 HeLa cells. We are also very grateful to A. Till (University of California, San Diego, USA) for providing us the *mito-mRFP-EGFP* plasmid. We would like to thank W. Hammerschmidt (German Research Center for Environmental Health and German Center for Infection Research, Munich, Germany) for providing us the WT and  $\Delta$ BHRF1 EBV bacmids. We wish to thank V. Nicolas (University of Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France) for her technical assistance from the cellular imaging MIPSIT facility. Also, the present work has benefited from the core facilities of Imagerie-Gif, (<http://www.i2bc.paris-saclay.fr>), member of IBISA (<http://www.ibisa.net>), supported by “France-BioImaging” (ANR-10-INBS-04-01), and the Labex “Saclay Plant Science” (ANR-11-IDEX-0003-02). Finally, special thanks to B. Trimbach (University of Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France) for her critical reading of the manuscript.

### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

### Funding

This work was supported by institutional funding from CNRS and from Univ. Paris-Sud, DIM MALINF Région Ile de France to GV and GS and grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE14-0022) to AE; Agence Nationale de la Recherche [ANR-14-CE14-0022]; Centre National de la Recherche Scientifique [2019]; Conseil Régional, Île-de-France [DIM MALINF]; Conseil Régional, Île-de-France [DIM MALINF]; Université Paris-Sud [2019].

### ORCID

Gabriel Siracusano  <http://orcid.org/0000-0001-7125-1745>  
 Frédérique Quignon  <http://orcid.org/0000-0001-9570-434X>  
 Vincent Maréchal  <http://orcid.org/0000-0003-2689-6266>

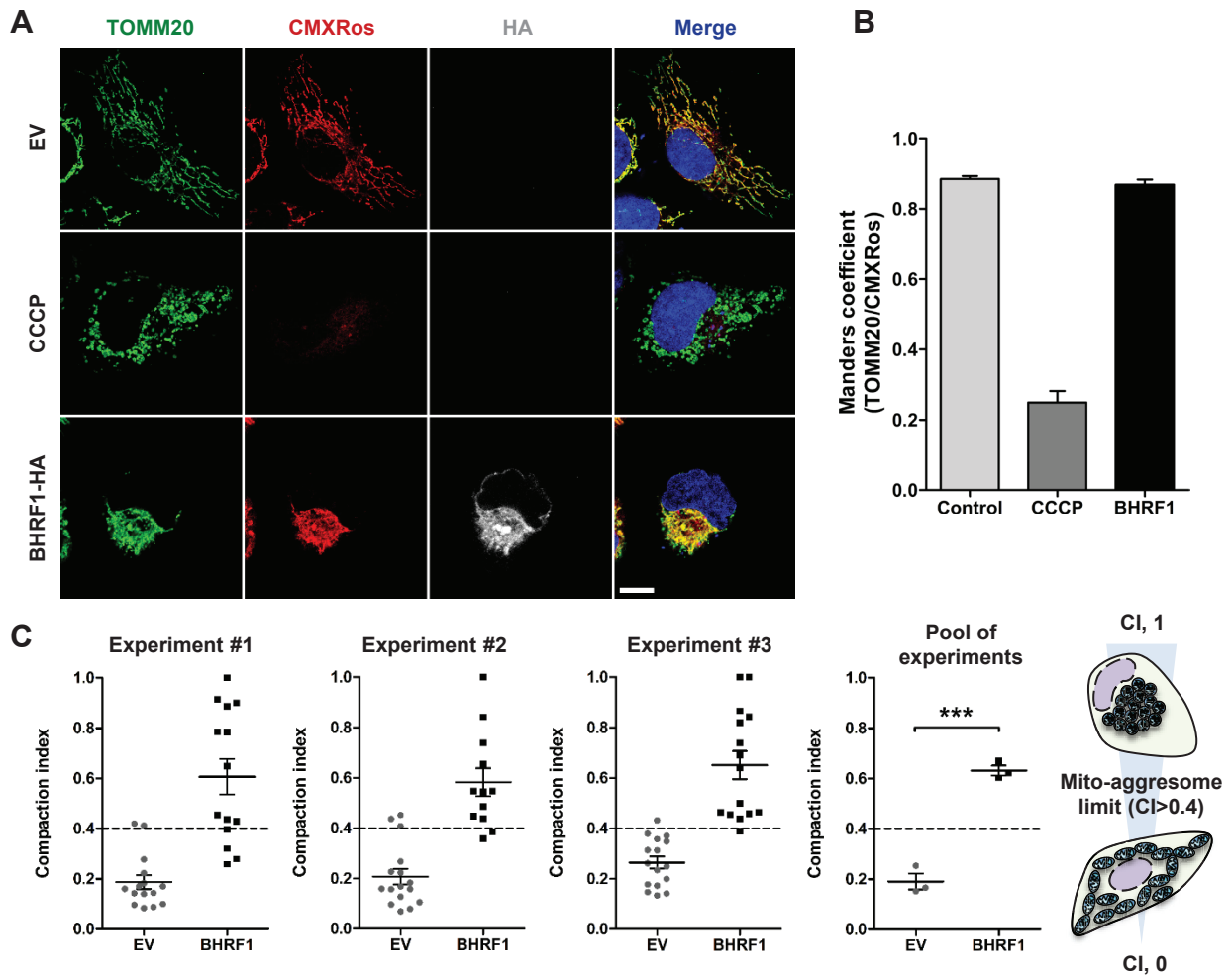
### References

- [1] Rowe M, Kelly GL, Bell AI, et al. Burkitt's lymphoma: the rosetta stone deciphering Epstein-Barr virus biology. *Semin Cancer Biol.* 2009;19:377–388.

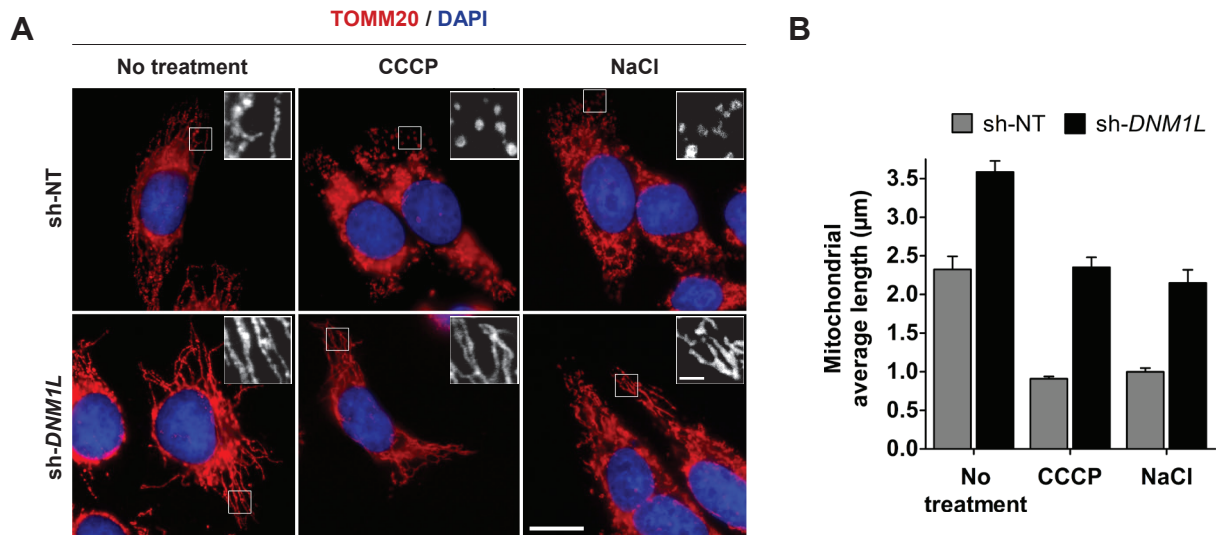
- [2] Kang MS, Kieff E. Epstein-Barr virus latent genes. *Exp Mol Med*. 2015;47:e131.
- [3] Jha HC, Pei Y, Robertson ES. Epstein-Barr virus: diseases linked to infection and transformation. *Front Microbiol*. 2016;7:1602.
- [4] Longnecker RM, Kieff E, Cohen JI. Epstein-Barr virus. In: editors, Fields BNKD, Howley PM. *Fields virology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2013. p. 1898–1959.
- [5] Fitzsimmons L, Kelly GL. EBV and apoptosis: the viral master regulator of cell fate? *Viruses*. 2017;9. DOI:10.3390/v9110339
- [6] Austin PJ, Flemington E, Yandava CN, et al. Complex transcription of the Epstein-Barr virus BamHI fragment H rightward open reading frame 1 (BHRF1) in latently and lytically infected B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:3678–3682.
- [7] Altmann M, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis. *PLoS Biol*. 2005;3:e404.
- [8] Khanim F, Dawson C, Meseda CA, et al. BHRF1, a viral homologue of the Bcl-2 oncogene, is conserved at both the sequence and functional level in different Epstein-Barr virus isolates. *J Gen Virol*. 1997;78(Pt 11):2987–2999.
- [9] Kvensakul M, Hinds MG. Structural biology of the Bcl-2 family and its mimicry by viral proteins. *Cell Death Dis*. 2013;4:e909.
- [10] Kvensakul M, Wei AH, Fletcher JI, et al. Structural basis for apoptosis inhibition by Epstein-Barr virus BHRF1. *PLoS Pathog*. 2010;6:e1001236.
- [11] Desbien AL, Kappler JW, Marrack P. The Epstein-Barr virus Bcl-2 homolog, BHRF1, blocks apoptosis by binding to a limited amount of Bim. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:5663–5668.
- [12] Henderson S, Huen D, Rowe M, et al. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:8479–8483.
- [13] Pattinre S, Tassa A, Qu X, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 2005;122:927–939.
- [14] Green DR, Levine B. To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate. *Cell*. 2014;157:65–75.
- [15] Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12:1–222.
- [16] Nowag H, Guhl B, Thriene K, et al. Macroautophagy proteins assist Epstein Barr virus production and get incorporated into the virus particles. *EBioMedicine*. 2014;1:116–125.
- [17] Granato M, Santarelli R, Farina A, et al. Epstein-barr virus blocks the autophagic flux and appropriates the autophagic machinery to enhance viral replication. *J Virol*. 2014;88:12715–12726.
- [18] Cirone M. EBV and KSHV infection dysregulates autophagy to optimize viral replication, prevent immune recognition and promote tumorigenesis. *Viruses*. 2018;10. DOI:10.3390/v10110599
- [19] Bellows DS, Howell M, Pearson C, et al. Epstein-Barr virus BALF1 is a BCL-2-like antagonist of the herpesvirus antiapoptotic BCL-2 proteins. *J Virol*. 2002;76:2469–2479.
- [20] Lee JY, Nagano Y, Taylor JP, et al. Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *J Cell Biol*. 2010;189:671–679.
- [21] Narendra D, Kane LA, Hauser DN, et al. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy*. 2010;6:1090–1106.
- [22] Delecluse HJ, Hilsenrath T, Pich D, et al. Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:8245–8250.
- [23] Gruffat H, Manet E, Sergeant A. MEF2-mediated recruitment of class II HDAC at the EBV immediate early gene BZLF1 links latency and chromatin remodeling. *EMBO Rep*. 2002;3:141–146.
- [24] Palmer CS, Osellame LD, Stojanovski D, et al. The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cell Signal*. 2011;23:1534–1545.
- [25] Chang CR, Blackstone C. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1201:34–39.
- [26] Perdiz D, Lorin S, Leroy-Gori I, et al. Stress-induced hyperacetylation of microtubule enhances mitochondrial fission and modulates the phosphorylation of Drp1 at (616)Ser. *Cell Signal*. 2017;39:32–43.
- [27] Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins de Brito O, et al. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:15803–15808.
- [28] Bampton ET, Goemans CG, Niranjan D, et al. The dynamics of autophagy visualized in live cells: from autophagosome formation to fusion with endo/lysosomes. *Autophagy*. 2005;1:23–36.
- [29] Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012;8:445–544.
- [30] Sarkar S, Korolchuk V, Renna M, et al. Methodological considerations for assessing autophagy modulators: a study with calcium phosphate precipitates. *Autophagy*. 2009;5:307–313.
- [31] Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy*. 2007;3:452–460.
- [32] Levine B, Liu R, Dong X, et al. Beclin orthologs: integrative hubs of cell signaling, membrane trafficking, and physiology. *Trends Cell Biol*. 2015. DOI:10.1016/j.tcb.2015.05.004
- [33] Shoji-Kawata S, Sumpter R, Leveno M, et al. Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature*. 2013;494:201–206.
- [34] Mouna L, Hernandez E, Bonte D, et al. Analysis of the role of autophagy inhibition by two complementary human cytomegalo- virus BECN1/Beclin 1-binding proteins. *Autophagy*. 2016;12:327–342.
- [35] Lussignol M, Esclatine A. Herpesvirus and autophagy: “All right, everybody be cool, this is a robbery!”. *Viruses*. 2017;9(12):372.
- [36] Orvedahl A, Alexander D, Tallozy Z, et al. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe*. 2007;1:23–35.
- [37] Verpooten D, Ma Y, Hou S, et al. Control of TANK-binding kinase 1-mediated signaling by the gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1. *J Biol Chem*. 2009;284:1097–1105.
- [38] Burman JL, Pickles S, Wang C, et al. Mitochondrial fission facilitates the selective mitophagy of protein aggregates. *J Cell Biol*. 2017;216:3231–3247.
- [39] Randow F, Youle RJ. Self and nonself: how autophagy targets mitochondria and bacteria. *Cell Host Microbe*. 2014;15:403–411.
- [40] Kim SJ, Khan M, Quan J, et al. Hepatitis B virus disrupts mitochondrial dynamics: induces fission and mitophagy to attenuate apoptosis. *PLoS Pathog*. 2013;9:e1003722.
- [41] Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol*. 2010;8:e1000298.
- [42] Castanier C, Garcin D, Vazquez A, et al. Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Rep*. 2010;11:133–138.
- [43] West AP, Shadel GS, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:389–402.
- [44] Ding B, Zhang L, Li Z, et al. The matrix protein of human parainfluenza virus Type 3 induces mitophagy that suppresses interferon responses. *Cell Host Microbe*. 2017;21:538–47 e4.
- [45] Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, et al. Autocrine amplification of type I interferon gene expression mediated by interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3). *J Biochem*. 1996;120:160–169.
- [46] Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*. 2004;5:730–737.
- [47] Vazquez C, Horner SM. MAVS coordination of antiviral innate immunity. *J Virol*. 2015;89:6974–6977.
- [48] Choi HJ, Park A, Kang S, et al. Human cytomegalovirus-encoded US9 targets MAVS and STING signaling to evade type I interferon immune responses. *Nat Commun*. 2018;9:125.
- [49] Garcia-Sastre A. Ten strategies of interferon evasion by viruses. *Cell Host Microbe*. 2017;22:176–184.



- [50] Hahn AM, Huye LE, Ning S, et al. Interferon regulatory factor 7 is negatively regulated by the Epstein-Barr virus immediate-early gene, BZLF-1. *J Virol.* 2005;79:10040–10052.
- [51] Bentz GL, Liu R, Hahn AM, et al. Epstein-Barr virus BRLF1 inhibits transcription of IRF3 and IRF7 and suppresses induction of interferon-beta. *Virology.* 2010;402:121–128.
- [52] Wang JT, Doong SL, Teng SC, et al. Epstein-Barr virus BGLF4 kinase suppresses the interferon regulatory factor 3 signaling pathway. *J Virol.* 2009;83:1856–1869.
- [53] Wu L, Fossum E, Joo CH, et al. Epstein-Barr virus LF2: an antagonist to type I interferon. *J Virol.* 2009;83:1140–1146.
- [54] Xing J, Zhang A, Zhang H, et al. TRIM29 promotes DNA virus infections by inhibiting innate immune response. *Nat Commun.* 2017;8:945.
- [55] Deretic V, Levine B. Autophagy balances inflammation in innate immunity. *Autophagy.* 2018;14:243–251.
- [56] Jin S, Tian S, Luo M, et al. Tetherin suppresses Type I interferon signaling by targeting MAVS for NDP52-mediated selective autophagic degradation in human cells. *Mol Cell.* 2017;68:308–22 e4.
- [57] Du Y, Duan T, Feng Y, et al. LRRC25 inhibits type I IFN signaling by targeting ISG15-associated RIG-I for autophagic degradation. *Embo J.* 2018;37:351–366.
- [58] Jounai N, Takeshita F, Kobiyama K, et al. The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:14050–14055.
- [59] Jin S, Tian S, Chen Y, et al. USP19 modulates autophagy and antiviral immune responses by deubiquitinating Beclin-1. *Embo J.* 2016;35:866–880.
- [60] Kim JH, Kim TH, Lee HC, et al. Rubicon modulates antiviral Type I interferon (IFN) signaling by targeting IFN regulatory factor 3 dimerization. *J Virol.* 2017;91(14):e00248-17.
- [61] Hung CH, Chen LW, Wang WH, et al. Regulation of autophagic activation by Rta of Epstein-Barr virus via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Virol.* 2014;88:12133–12145.
- [62] Shao Z, Borde C, Quignon F, et al. Epstein-Barr virus BALF0 and BALF1 modulate autophagy. *Viruses.* 2019;11(12):1099.
- [63] McCormick AL, Smith VL, Chow D, et al. Disruption of mitochondrial networks by the human cytomegalovirus UL37 gene product viral mitochondrion-localized inhibitor of apoptosis. *J Virol.* 2003;77:631–641.
- [64] Kramer T, Enquist LW. Alphaherpesvirus infection disrupts mitochondrial transport in neurons. *Cell Host Microbe.* 2012;11:504–514.
- [65] Kim SJ, Syed GH, Khan M, et al. Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:6413–6418.
- [66] Narendra D, Tanaka A, Suen DF, et al. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol.* 2008;183:795–803.
- [67] Pal AD, Basak NP, Banerjee AS, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein-2A alters mitochondrial dynamics promoting cellular migration mediated by Notch signaling pathway. *Carcinogenesis.* 2014;35:1592–1601.
- [68] Bekisz J, Baron S, Balinsky C, et al. Antiproliferative properties of Type I and Type II interferon. *Pharmaceuticals.* 2010;3:994–1015.
- [69] Lussignol M, Queval C, Bernet-Camard MF, et al. The herpes simplex virus 1 Us11 protein inhibits autophagy through its interaction with the protein kinase PKR. *J Virol.* 2013;87:859–871.
- [70] Pourcelot M, Zemirli N, Silva Da Costa L, et al. The Golgi apparatus acts as a platform for TBK1 activation after viral RNA sensing. *BMC Biol.* 2016;14:69.

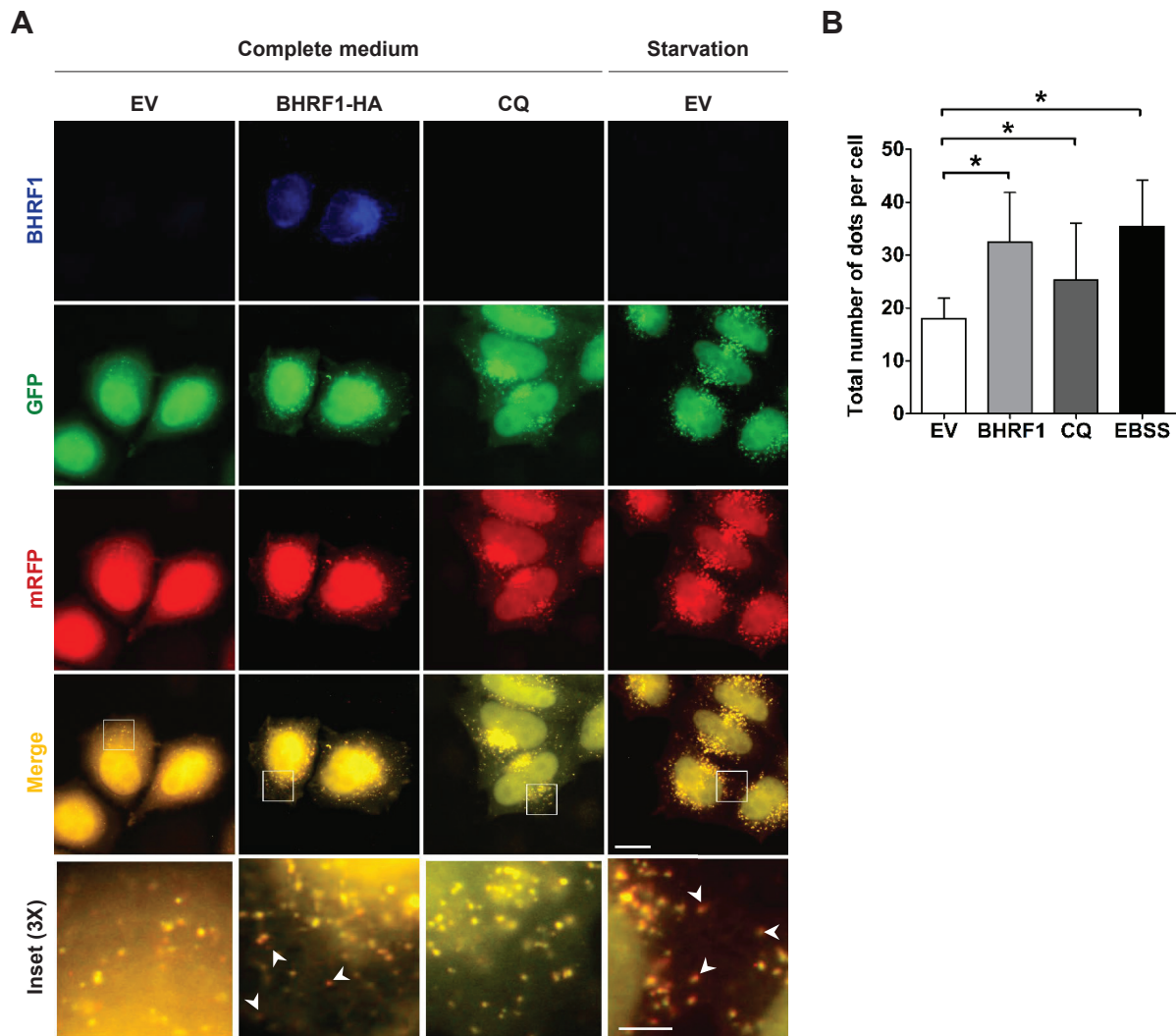


**Figure S1.** Impact of BHRF1 expression on the mitochondrial membrane potential (MMP) and on the scoring of mito-aggresomes. **(A and B)** BHRF1 does not change the MMP. HeLa cells were transfected for 24 h with the *BHRF1-HA* plasmid or EV. Treatment with CCCP (2 h at 10  $\mu$ M) was used as positive control to induce the loss of MMP. **(A)** Confocal images. Scale bar: 10  $\mu$ m. **(B)** To assess the loss of MMP, colocalization between TOMM20 and CMXRos mitochondrial markers was measured by the Manders split coefficient using the ImageJ software. As MitoTracker CMXRos dye accumulates only in the mitochondria with intact membrane potential, the decrease in TOMM20/CMXRos colocalization level reflects a loss of MMP. **(C)** Calculations of mitochondrial CI (compaction index) related to the images from Fig. 1B. As previously described by Richard Youle [21], mito-aggresomes are scored by measuring the CI of the mitochondrial staining. We arbitrarily determined that a cell presents a mito-aggresome when the CI is above 0.4. The percentage of cells presenting a mito-aggresome (Fig. 1C) was then determined from these three independent experiments. \*\*\*  $P < 0.001$  (Student's *t*-test).

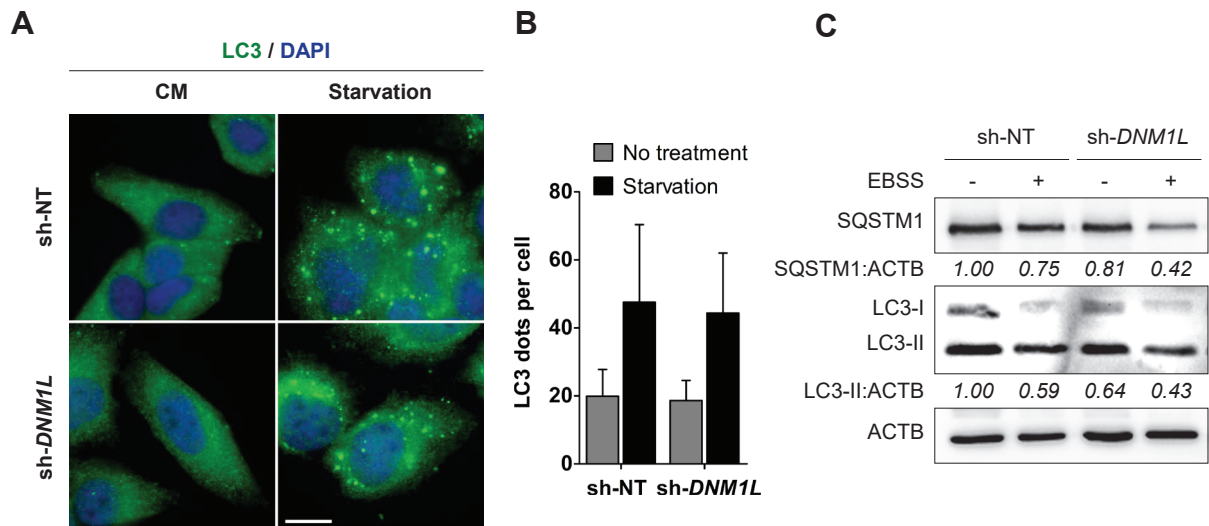


**Figure S2.** Study of the mitochondrial phenotype in DNMI1-deficient cell line. **(A and B)** sh-NT and sh-DNM1L HeLa cells were treated by CCCP or NaCl to induce mitochondrial fission. Then, mitochondria were immunostained for TOMM20 and nuclei were stained with DAPI. **(A)** Representative images. Insets (5X) show part of the cytoplasm at a higher magnification to observe mitochondrial phenotype. Scale bars: 20 µm, and 3 µm for insets. **(B)** Mitochondrial average length. In sh-DNM1L cells, mitochondria display a hyperfused phenotype and stay tubular after fission-inducing treatments.

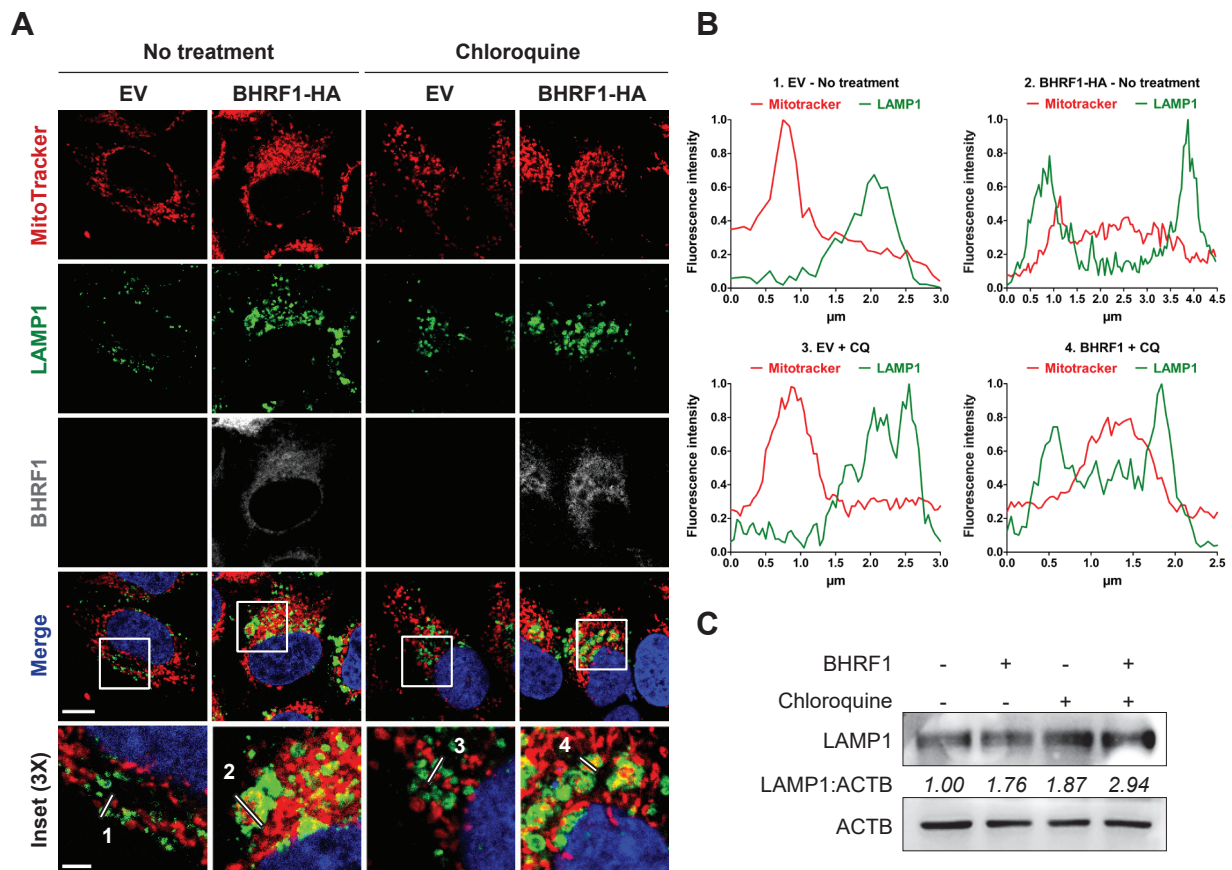




**Figure S3.** BHRF1 stimulates the autophagic flux. mRFP-GFP-LC3 HeLa cells were transfected with EV or *BHRF1-HA* plasmids. As controls, cells were treated with CQ or starved in EBSS for 4 h. (A) Representative images of autophagosomes (yellow: RFP<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> dots) and autolysosomes (red: RFP<sup>+</sup>/GFP<sup>-</sup> dots) assessed by confocal microscopy. Insets show part of the cytoplasm at a higher magnification. Arrows indicate autolysosomes. CQ was able to suppress the autophagic flux and induce the accumulation of autophagosomes (>95% yellow dots are observed), whereas starvation with EBSS induced the autophagic flux, and only part of the LC3-positive autophagic vacuoles were yellow. Scale bars: 20  $\mu$ m, and 5  $\mu$ m for insets. (B) Results are expressed as absolute numbers of individuals vesicles (total autophagic vesicles: all RFP<sup>+</sup> dots). We observed that CQ, BHRF1 expression, and EBSS all increased the number of autophagic vesicles. Histogram represents the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*  $P < 0.05$  (One-way ANOVA test).



**Figure S4.** Knockdown of DNM1L does not impact autophagy. **(A and B)** sh-NT and sh-DNM1L HeLa cells were cultured in EBSS to carry out starvation-induced autophagy or maintained in complete medium (CM) and immunostained for LC3 to assess autophagy. Nuclei were stained with DAPI. **(A)** Representative images. Scale bar: 20  $\mu$ m. **(B)** Number of LC3 dots. **(C)** Immunoblot analysis of LC3 and SQSTM1 expression in sh-NT and sh-DNM1L HeLa cells. ACTB was used as a loading control.



**Figure S5.** Detection of mitochondria in LAMP1-positive vesicles under BHRF1 expression. **(A and B)** HeLa cells were transfected with EV or *BHRF1-HA* plasmids for 48 h and treated with CQ when indicated. Cells were labeled with MitoTracker and immunostained for LAMP1 to visualize lysosomes and late endosomes. Nuclei were stained with DAPI. **(A)** Confocal images of cells. Insets show part of the cytoplasm at a higher magnification to better visualize mitochondria inside LAMP1-positive vesicles. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ , and 4  $\mu\text{m}$  for insets. Insets of confocal images show the lysosomes surrounding the mitochondria upon BHRF1-HA expression. Line profiles through these structures were performed (1 to 4). **(B)** Graphical analyzes show the fluorescence intensity of each channel (red: mitochondria, green: lysosomes/late endosomes) along the line. Under BHRF1 expression, LAMP1-positive vesicles contained mitochondria. Moreover, treatment by CQ inhibited mitochondria degradation inside the lysosomes. **(C)** Immunoblot analysis of HeLa cells transfected with EV or *BHRF1-HA* plasmids for 48 h and treated with CQ when indicated. Accumulation of LAMP1 was observed under BHRF1 expression. ACTB was used as a loading control.

## V. 1. C Conclusions, discussions et perspectives

### V. 1. C. (a) BHRF1 altère la morphodynamique mitochondriale

Il était déjà connu que BHRF1 était présente dans les mitochondries et agissait à leur niveau afin de contrôler l'induction de l'apoptose. En revanche, une seule étude avait précédemment relevé que BHRF1 modifiait également la distribution des mitochondries dans le cytoplasme (Bellows *et al.*, 2002). Depuis la publication de ce travail, il y a presque vingt ans, les mécanismes conduisant à ce phénotype mitochondrial ainsi que ses conséquences fonctionnelles n'avaient pas été explorées. Dans notre étude, nous avons observé que l'expression ectopique de BHRF1, dans des cellules HeLa, entraîne la fragmentation des mitochondries, suivie de leur agrégation afin de former ce que nous appelons un mito-agrèsome (Figure 1 de l'article). Il est intéressant de noter que ce mito-agrèsome s'observe également en contexte infectieux, suite à la réactivation de l'EBV, et qu'il dépend uniquement de l'expression de BHRF1 (Figure 1 de l'article).

D'un point de vue mécanistique, nous avons pu observer que le raccourcissement des mitochondries précède l'agrégation. Nous avons voulu caractériser cet évènement induit par BHRF1 afin d'identifier s'il correspond à une augmentation de la fission, ou alors à une inhibition de la fusion des mitochondries. Il s'avère que BHRF1 stimule la fission de manière dépendante de DNM1L/DRP1, puisque l'extinction de DRP1 par une approche *shRNA* (*short hairpin RNA*) prévient le phénotype mitochondrial induit par BHRF1 (Figure 2 de l'article). Il n'est pas à exclure que BHRF1 puisse tout de même inhiber la fusion mitochondriale, mais cette hypothèse n'a pour l'heure pas été explorée. Pour cela, nous pourrions étudier l'impact de BHRF1 sur les protéines de fusion MFN1 et MFN2. Cette piste serait particulièrement intéressante puisque MFN2 semble impliquée dans l'immunité antivirale en permettant les interactions mitochondrie-RE ou encore en permettant l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Basso *et al.*, 2018; Ichinohe *et al.*, 2013). Sachant que BHRF1 réduit l'immunité innée antivirale (Figure 6 de l'article), cet effet inhibiteur pourrait donc également être lié à la dérégulation de MFN2. Cependant, d'autres données rapportent que MFN2 établirait une interaction antagoniste avec MAVS (Horner *et al.*, 2011; Yasukawa *et al.*, 2009). Ces différents résultats rendent d'autant plus intéressante l'idée d'explorer un potentiel effet de BHRF1 au niveau de la machinerie de fusion mitochondriale.

Nous envisageons par la suite de mieux comprendre à quel niveau intervient BHRF1, par rapport à DRP1, pour induire la fission. L'activité de DRP1 est notamment régulée par des phosphorylations et déphosphorylations, intervenant sur différents acides aminés (Giacomello *et al.*, 2020), et nous observons ici que BHRF1 induit la déphosphorylation de DRP1 en position Ser-637, une MPT précédemment associée à l'induction de la fission (Chang & Blackstone, 2007). BHRF1 n'étant ni une phosphatase, ni une kinase, la régulation ne peut donc se faire que de manière indirecte. Nous

aimerions donc par des approches protéomiques établir une liste sans *a priori* des interactants de BHRF1, où il serait possible d'identifier, entre autres, des enzymes impliquées dans la phosphorégulation de DRP1. Pour cela nous envisageons deux techniques : la première serait d'immunoprécipiter BHRF1 et d'identifier, par spectrométrie de masse, les protéines ayant co-immunoprécipitées avec BHRF1 ; la seconde technique se baserait sur le principe du BioID (Sears *et al.*, 2019) et aurait l'avantage, par rapport à la technique précédente, de pouvoir retranscrire la dynamique des interactions et donc d'identifier un potentiel interactant transitoire de BHRF1. Les outils nécessaires à ces approches sont actuellement en cours de construction et d'optimisation au laboratoire.

Nous observons que BHRF1 est également retrouvée au niveau du RE et il est possible que suivant sa localisation, BHRF1 puisse exercer des fonctions différentes. Nous pouvons par exemple imaginer que le pool de BHRF1 localisé dans le RE puisse être impliqué dans le phénomène de torsion du RE, nécessaire pour induire la fission mitochondriale (Friedman *et al.*, 2011). Quant au pool de BHRF1 associé aux mitochondries, il pourrait être impliqué dans leur agrégation périnucléaire. Afin d'explorer ces hypothèses, nous envisageons de construire des mutants de BHRF1 ayant une localisation restreinte, soit à la mitochondrie, soit au RE. Pour y parvenir il s'agira de remplacer le domaine transmembranaire de BHRF1 par une séquence d'adressage à la MME (ActA) ou au RE (cytochrome b5), de manière analogue à ce qui a déjà pu être réalisé par le passé avec BCL-2 (Pattingre *et al.*, 2005). Étudier l'impact de ces deux mutants de BHRF1 sur le phénotype mitochondrial, ou même l'induction de l'autophagie, pourrait nous permettre d'identifier le rôle respectif de chacune des localisations de BHRF1.

#### V. 1. C. (b) Implication du cytosquelette dans la formation des mito-agrèsomes

Dans cet article, nous avons caractérisé le phénomène de fission mitochondriale (Figure 2 de l'article). En revanche le mécanisme permettant l'agrégation des mitochondries a besoin d'être approfondi. Après cette étude, le seul élément dont nous étions certains était que l'autophagie est importante pour la formation du mito-agrèsome, ce qui est probablement lié à la capacité de BHRF1 à induire la mitophagie. En effet, dès 2010 le terme de mito-agrèsome fut employé par Lee *et al.*, qui démontrèrent la formation d'agrégats mitochondriaux à proximité du noyau. Ils montrèrent que ces structures sont nécessaires au déclenchement de la mitophagie dépendante de PARKIN (Lee *et al.*, 2010). On peut donc penser que l'accumulation de mitochondries fragmentées et de vésicules autophagiques sont des signaux pré-inducteurs de la mitophagie et, qu'une fois le tout rassemblé dans la région périnucléaire, son déclenchement sera possible.

Afin de décrypter le mécanisme permettant l'agrégation des mitochondries nous avons envisagé d'étudier l'implication des différents éléments du cytosquelette. Les MTs sont connus pour leur implication dans les mouvements intracellulaires d'organites (Hancock, 2014). Ainsi, le regroupement des mitochondries dans la région périnucléaire pourrait correspondre à un mouvement rétrograde, le long des MTs. De plus, au cours de la fission, une polymérisation locale d'actine est observée au niveau des portions de RE marquant le point de scission entre deux segments de mitochondrie (Ji *et al.*, 2015). Ceci nous a amené à proposer le rôle du cytosquelette d'actine dans la fission induite par BHRF1. Ces pistes ont été explorées dans une seconde étude (Glon *et al.*, 2021), présentée dans la suite du manuscrit (§ V. 2).

#### V. 1. C. (c) BHRF1 stimule l'autophagie et interagit avec BECN1

Dans cette étude, nous montrons que BHRF1 module l'autophagie puisqu'elle induit l'accumulation d'autophagosomes ainsi que l'augmentation de la conversion de LC3-I en LC3-II (Figure 3 de l'article). Cette modulation peut être la résultante de deux phénomènes : soit une stimulation de l'autophagie, soit une inhibition de la formation des autolysosomes. Pour discriminer entre ces deux possibilités nous avons étudié le flux autophagique et validé une stimulation complète de l'autophagie dans des cellules exprimant BHRF1 (Figures 3 et S3 de l'article), démontrant l'activité pro-autophagique de BHRF1.

Par des expériences de co-immunoprécipitation, nous avons observé l'interaction entre BHRF1 et BECN1 (Figure 3 de l'article). Cette interaction pourrait être à l'origine de son activité pro-autophagique, comme cela fut déjà décrit pour la protéine E1B19K de l'adénovirus (Piya *et al.*, 2011). En effet, cette protéine est une orthologue de BCL-2 qui s'associe avec le complexe BECN1, afin de déstabiliser l'interaction entre BECN1 et BCL-2, conduisant à stimuler l'autophagie (Piya *et al.*, 2011). Il serait donc intéressant d'envisager de mener de nouvelles expériences de co-immunoprécipitation afin d'étudier si l'expression de BHRF1 impacte l'interaction antagoniste de BCL-2 sur BECN1.

De plus, nous aimerions caractériser l'interaction entre BECN1 et BHRF1, en identifiant les domaines/résidus impliqués dans sa mise en place. Dans le cas de l'adénovirus, l'interaction entre E1B19K et BECN1 se fait entre leurs domaines BH3 respectifs (Piya *et al.*, 2011). BHRF1 étant dépourvu de ce type de domaine, nous avons décidé de nous focaliser sur des mutations affectant le sillon hydrophobe de BHRF1. En effet, ces mutations ont été impliquées dans l'interaction de BHRF1 avec des protéines à domaine BH3 dans des études sur les propriétés anti-apoptotiques de BHRF1 (Fitzsimmons *et al.*, 2020). Ces mutants sont en cours de caractérisation, mais si nous parvenons à identifier un mutant de perte d'interaction nous pourrions conclure quant à l'implication de l'interaction BHRF1-BECN1 dans l'induction de l'autophagie.



#### V. 1. C. (d) BHRF1 induit une mitophagie indépendante de PARKIN

En complément de son rôle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, l'autophagie est un processus impliqué dans la régulation de l'immunité. En effet, lors d'une infection virale, l'autophagie peut jouer un rôle crucial dans l'élimination de composants viraux mais permet aussi d'activer l'immunité innée, afin de produire des cytokines à visée antivirale. En conséquence, les virus ont développé différentes stratégies d'échappement aux réponses immunitaires en détournant l'autophagie (Deretic & Levine, 2018; Pradel *et al.*, 2020). En introduction de ce manuscrit (§ IV. 3. C), nous avons vu que l'EBV exprime plusieurs protéines capables de bloquer les défenses antivirales de la cellule. Cependant, il s'agit de la première fois qu'il est décrit chez l'EBV un mécanisme d'échappement impliquant la mitophagie. Cette découverte a d'ailleurs fait l'objet d'une nouvelle dans la revue Médecine/sciences (Glon *et al.*, 2020), disponible en annexe du manuscrit (§ VII).

Notre étude montre que, dans les cellules exprimant BHRF1, un certain nombre de mitochondries sont séquestrées dans des autophagosomes/autolysosomes, conduisant à leur dégradation ainsi qu'à l'inhibition de l'initiation de la réponse IFN (Figure 8 de l'article). Cette forme de mitophagie serait indépendante de PARKIN puisque nous l'observons dans des cellules HeLa, naturellement dépourvues de cette protéine. Cependant, l'expression ectopique de PARKIN permet de potentialiser le phénotype car nous observons un recrutement de PARKIN et l'accumulation de PINK1 à la surface des mitochondries (Figure 5 de l'article), suggérant que les deux catégories de mitophagie sont possibles.

Nous aimerions également explorer l'implication des récepteurs de l'autophagie sélective, qui permettent habituellement de reconnaître les mitochondries et de les conduire dans les autophagosomes. Il est important de noter que BHRF1 ne possède pas de domaine LIR, ce qui exclue la possibilité qu'elle agisse directement en tant que récepteur mitophagique, comme il est déjà décrit pour d'autres protéines virales (Ding *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019, 2020b). Cependant, il est envisageable que BHRF1 puisse interagir avec l'un des récepteurs cellulaires pour induire la mitophagie. Nous disposons au laboratoire de nombreux *siRNA* (*small interfering RNA*) ciblant différents récepteurs impliqués dans la mitophagie (OPTN, NDP52, TAX1BP1, p62). L'idée serait d'étudier si l'extinction de l'un de ces récepteurs permet de prévenir l'induction de la mitophagie par BHRF1, ce qui nous permettrait de mieux caractériser cette forme de mitophagie.

#### V. 1. C. (e) À quel niveau la mitophagie bloque elle l'immunité antivirale ?

Ces dernières années, des études ont permis de démontrer l'implication de la mitophagie dans le contrôle de l'immunité antivirale. Il a par exemple été montré que la protéine M du HPIV3 induit la séquestration des mitochondries dans des autophagosomes afin de bloquer la réponse IFN (Ding *et al.*,

2017). Cependant, les mitochondries ne semblent pas être dégradées, puisque la protéine P du virus bloque la maturation des autophagosomes (Ding *et al.*, 2014). La protéine PB1-F2 d'IAV induit également de la mitophagie, conduisant à la dégradation de MAVS et à l'inhibition de la production d'IFNs (Wang *et al.*, 2020b).

Dans notre étude nous avons voulu caractériser à quel niveau la mitophagie intervient dans la voie de signalisation des IFNs. Nous avons montré que BHRF1 bloque l'activité du promoteur IFN- $\beta$  en inhibant la relocalisation nucléaire d'IRF3 (Figure 6 de l'article), confirmant que BHRF1 intervient en amont d'IRF3. Étant donné que nous observons la dégradation de TOM20, un marqueur mitochondrial (Figure 5 de l'article), nous avons recherché si BHRF1 induit également la dégradation de MAVS. Cependant, il semble que la quantité de MAVS ne soit pas impactée par l'expression de BHRF1 (résultat non montré). Nous avons donc voulu voir de manière plus générale si la dégradation autophagique était nécessaire au blocage de l'IFN. Nous observons que le traitement des cellules BHRF1<sup>+</sup> par de la chloroquine restaure partiellement l'activité IFN- $\beta$  (Figure 40). En effet, après traitement BHRF1 ne diminue plus que de 40% la production d'IFN- $\beta$  au lieu de presque 60% sans traitement (Figure 40). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'immunité antivirale passerait plutôt par la séquestration des mitochondries dans des autophagosomes et pas uniquement par leur dégradation. Castanier *et al.* ont précédemment montré que MAVS interagissait avec STING, localisée dans le RE, que cette interaction était nécessaire à la transduction du signal et qu'une séparation physique entre les deux diminuait la production d'IFNs (Castanier *et al.*, 2010). Étant donné que BHRF1 agit aussi bien sur la voie d'activation dépendante de MAVS que celle dépendante de STING (Figure 6 de l'article), nous pensons que la séquestration des mitochondries dans des vésicules autophagiques limite l'accès de MAVS à ses partenaires, en particulier STING. Nous envisageons donc de rechercher par des expériences de co-immunoprécipitation si l'interaction entre MAVS et STING est affectée en présence de BHRF1.

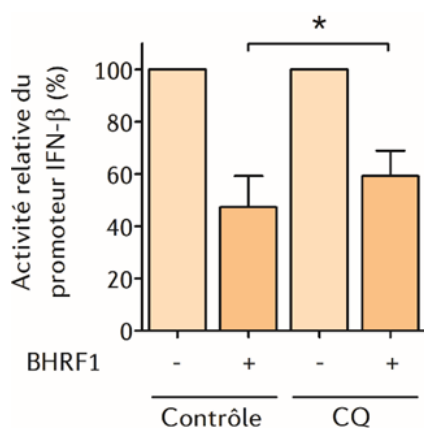


Figure 40 | **L'inhibition de la dégradation autophagique ne restaure que partiellement l'activité IFN- $\beta$**

L'activité du promoteur IFN- $\beta$  a été évaluée par un test luciférase dans des cellules HEK293T exprimant BHRF1 ou non. Les cellules ont été traitées par de la chloroquine (CQ) à 5 mM pendant 4 h afin d'inhiber la dégradation autophagique. Les valeurs d'activité sont normalisées à 100% par rapport à la condition contrôle (sans BHRF1). Les résultats sont donnés pour trois expériences indépendantes. Analyse statistique : \* P < 0.05 (Test de Student).

### V. 1. C. (f) Impact de BHRF1 sur le RE ?

Le RE et les mitochondries sont intimement liés et leurs fonctions respectives sont largement régulées par les sites de contact établis entre les deux organites (Martinvalet, 2018). Ces contacts entre le RE et les mitochondries sont notamment essentiels dans les voies de signalisation de l'immunité innée (Castanier *et al.*, 2010; Pila-Castellanos *et al.*, 2021). BHRF1 possède une double localisation dans les mitochondries et le RE. Au-delà de son rôle sur la morphodynamique des mitochondries, nous souhaiterions explorer un éventuel impact de BHRF1 sur le RE. En collaboration avec le laboratoire de Francesca Giordano (I2BC, Gif/Yvette, France) nous aimerions rechercher si BHRF1 est présent dans les MERCs par des techniques de microscopie (confocale et électronique à transmission). ORP5 et ORP8 (*Oxysterol-binding protein-Related Proteins*) sont des protéines localisées dans les MERCs qui interagissent avec PTP51, une protéine de la MME (Galmes *et al.*, 2016). Nous disposons de constructions codant les versions étiquetées à la GFP de ces protéines et de mutants d'intérêt. Il serait intéressant de rechercher si BHRF1 colocalise et interagit avec ces différentes protéines. Nous pourrions aussi quantifier les MERCs dans des cellules BHRF1\* par TEM (*Transmission Electronic Microscopy*) grâce à une construction pKDEL-HRP qui permet de mieux visualiser le RE en le rendant dense aux électrons. Avoir des connaissances plus précises sur la localisation de BHRF1 nous permettra de mieux caractériser ses multiples fonctions, notamment sur l'immunité innée.

De plus, nous observons que l'expression de BHRF1 semble induire des modifications de la morphologie du RE (résultat non montré). Considérant l'activité pro-autophagique de BHRF1, il serait intéressant d'explorer la piste de l'induction d'une autophagie sélective du RE, appelée réticulophagie (Khaminets *et al.*, 2015).

### V. 1. C. (g) Rôle de BHRF1 au cours du cycle productif

Il nous a semblé important de replacer nos résultats dans un contexte infectieux. L'activité pro-autophagique de BHRF1 semble compatible avec les données publiées concernant la modulation de l'autophagie au cours de la réactivation de l'EBV dans des lymphocytes B ou des cellules épithéliales (Granato *et al.*, 2014; Nowag *et al.*, 2014). En effet, ces études montrent que la réactivation de l'EBV induit l'accumulation de vésicules autophagiques aux temps précoces (entre 8 et 20 h post-induction), suivie d'une inhibition du flux autophagique aux temps tardifs (72 h post-induction). Il a ainsi été conclu que l'EBV exploite l'autophagie pour assurer sa réplication et la production de virions (Granato *et al.*, 2014; Nowag *et al.*, 2014). Bien que la protéine très précoce RTA soit déjà connue pour stimuler la transcription de gènes autophagiques (Hung *et al.*, 2014), nous avons souhaité évaluer l'implication de BHRF1 dans la stimulation autophagique, aux temps précoces, au cours de la réactivation. Afin d'explorer cette hypothèse nous avons étudié le niveau d'autophagie dans des cellules épithéliales,

hébergeant le génome de l'EBV sauvage (WT) ou déficient pour le gène *BHRF1*, dans lesquelles nous avons induit la réactivation du virus pendant 24h. Des résultats préliminaires suggèrent qu'en absence de BHRF1, la réactivation ne semble plus stimuler l'autophagie aux temps précoces (Figure 41).

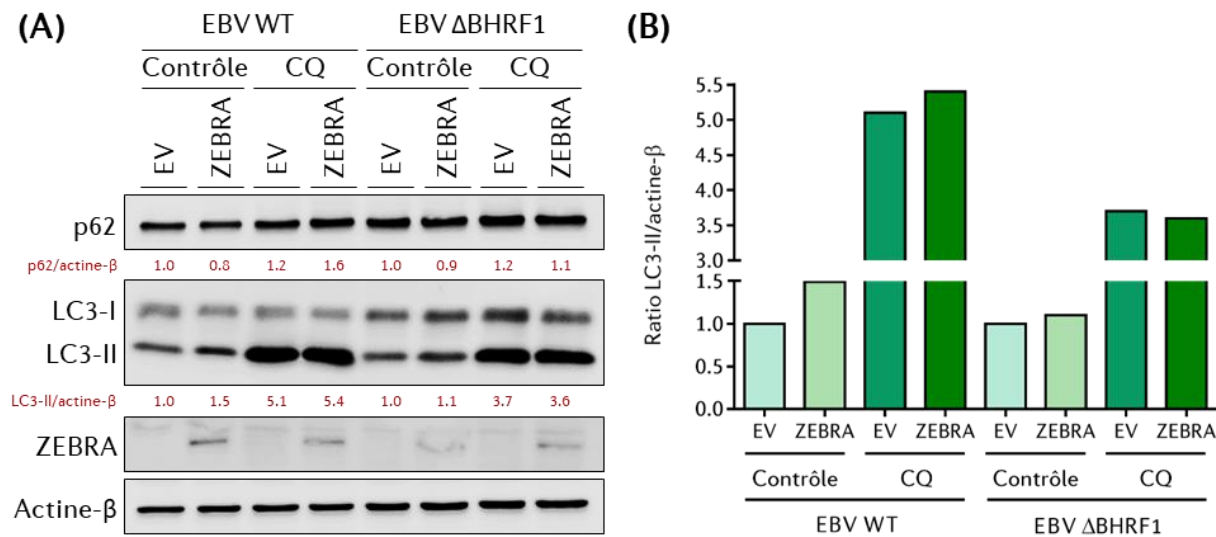


Figure 41 | **BHRF1 est impliquée dans l'induction précoce de l'autophagie après réactivation de l'EBV**

**(A)** Les cellules HEK293 infectées de manière latente par l'EBV sauvage (WT) ou déficient pour BHRF1 ( $\Delta$ BHRF1) ont été transfectées pour 24 h par le plasmide codant la protéine transactivatrice ZEBRA afin de réactiver le cycle productif du virus. Les cellules ont été ou non (contrôle) traitées par de la chloroquine (CQ - 5 mM pendant 4 h) afin d'étudier le flux autophagique. Le niveau d'autophagie a été évalué en analysant dans les lysats cellulaires le niveau d'expression de p62 et de LC3 par immunoblot. **(B)** Représentation graphique de l'accumulation de LC3-II normalisée par rapport à l'actine- $\beta$ .

Ce résultat demande à être reproduit et nous aimerions voir si la même observation peut être faite lors de la réactivation de l'EBV en lymphocytes B. Pour l'étudier, nous disposons au laboratoire de quoi produire des lentivirus qui hébergent un *shRNA* ciblant BHRF1. Nous envisageons donc de générer des cellules Akata qui n'exprimeraient plus BHRF1 dans le but d'étudier son rôle dans la modulation de l'autophagie au cours de la réactivation. Si nous parvenons à confirmer nos résultats, il s'avèrerait que lors des étapes précoces de la réactivation de l'EBV, BHRF1 accomplirait une double fonction en induisant l'autophagie et en inhibant l'apoptose afin d'optimiser la réplication virale. Néanmoins, le rôle de BHRF1 dans la réplication virale semble non essentiel puisque le laboratoire de Wolfgang Hammerschmidt, dont proviennent les cellules HEK293/EBV<sup>+</sup>, n'a pas observé de différence de production virale entre le virus sauvage et le virus déficient pour BHRF1 (Altmann & Hammerschmidt, 2005).

Il serait également intéressant d'explorer dans un contexte infectieux si l'expression de BHRF1 lors du cycle productif induit une mitophagie provirale. Les premiers éléments que nous avons vus dans ce sens puisque BHRF1 induit la formation de mito-agrèsomes, après réactivation de l'EBV dans des cellules épithéliales, et stimulerait l'autophagie.

De plus, nous avons des résultats complémentaires qui indiquent que la formation des mito-agrésomes est dépendante de l'autophagie dans les cellules infectées. En effet, nous observons qu'en inhibant pharmacologiquement l'autophagie des cellules Akata, la réactivation de l'EBV ne permet plus la formation de mito-agrésomes (Figures 42.A et B). Le rôle de l'autophagie dans la formation des mito-agrésomes a été confirmé dans les cellules HEK293/EBV<sup>+</sup> (Figures 42.C et D). Nous envisageons maintenant d'explorer par microscopie confocale si au sein des mito-agrésomes, observés après réactivation de l'EBV, nous retrouvons la séquestration de mitochondries dans des autophagosomes.

Si nous parvenons à observer de la mitophagie, il serait intéressant d'étudier si l'induction de cette autophagie sélective a bien pour conséquence de diminuer la production d'IFNs de type I dans un contexte infectieux. Pour cela, nous envisageons d'analyser l'expression des ARNm codant des IFNs de type I dans des cellules EBV<sup>+</sup> qui expriment ou non BHRF1. Pour ce type d'expérience, l'utilisation des cellules Akata, dans lesquelles l'expression de BHRF1 sera bloquée par des *shRNA*, sera privilégiée par rapport au modèle HEK293/EBV<sup>+</sup>. En effet, dans les cellules HEK293/EBV<sup>+</sup> nous devons transfecter la protéine ZEBRA pour réactiver le virus, or ZEBRA est connue pour inhiber la production d'IFNs (Hahn *et al.*, 2005). En utilisant ce modèle le risque serait donc que l'activité inhibitrice de ZEBRA masque une potentielle restauration de la production d'IFNs que l'on souhaite mettre en évidence en réactivant l'EBV  $\Delta$ BHRF1.

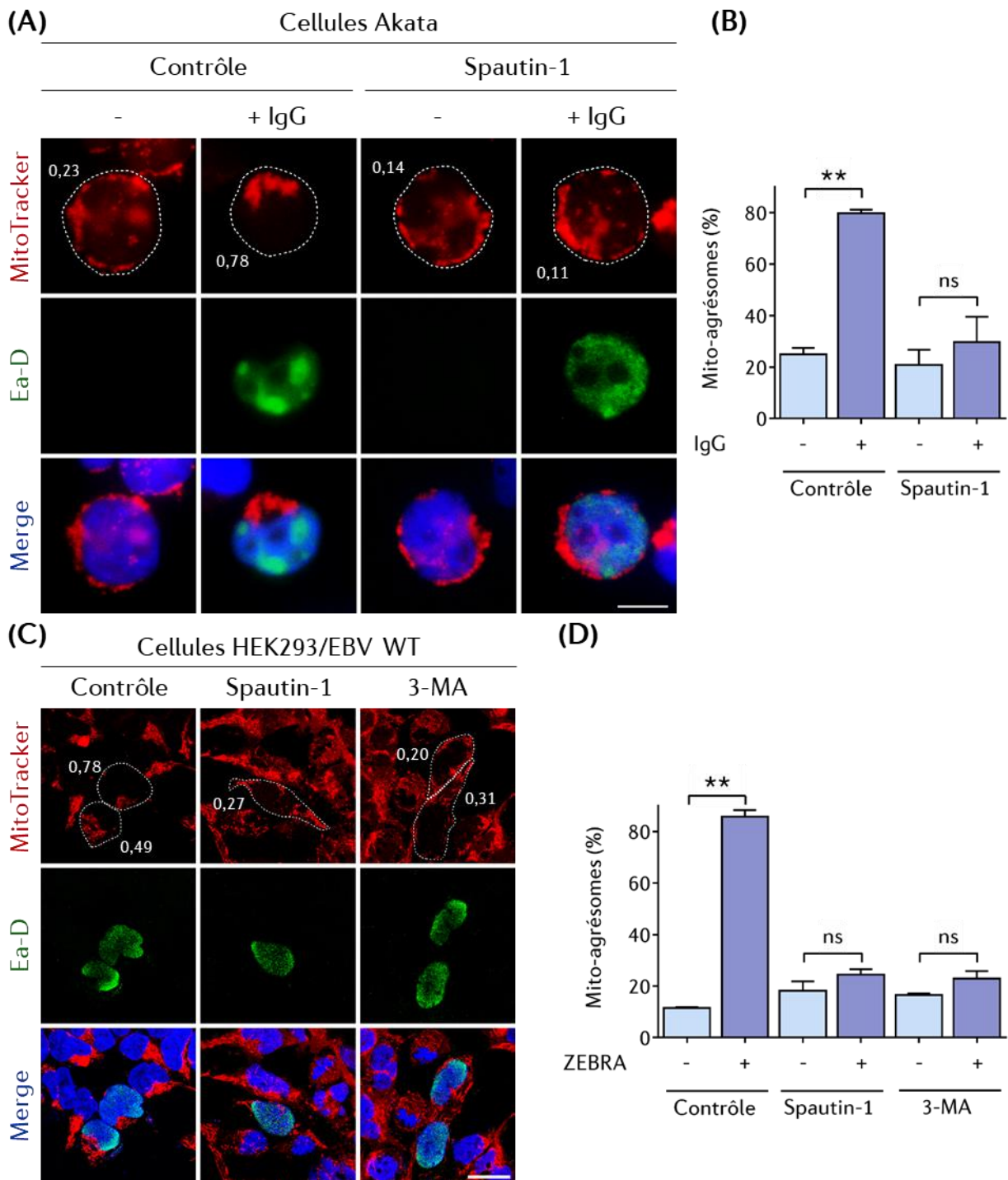


Figure 42 | L'autophagie est requise pour former des mito-agresomes après réactivation de l'EBV

**(A)** Photos de cellules Akata après réactivation de l'EBV par un traitement de 8 h avec des IgG anti-humain. En parallèle les cellules sont traitées par de la spautin-1 pendant 8 h. Les mitochondries sont marquées par du MitoTracker et les cellules réactivées visualisées par l'immunomarquage de la protéine virale Ea-D. Les noyaux sont colorés par du DAPI. Pour chaque cellule, le contour a été dessiné et la valeur de l'IC mitochondrial est donnée. Barre = 20  $\mu$ m. **(B)** Quantification du taux de mito-agresomes pour chaque condition. **(C)** Photos de microscopie confocale de cellules HEK293/EBV<sup>+</sup> réactivées par la transfection de ZEBRA pendant 24 h. Les cellules sont également traitées par des inhibiteurs autophagique (spautin-1 ou 3-MA) pendant 8 h. Les mitochondries sont marquées par du MitoTracker et les cellules réactivées visualisées par l'immunomarquage d'Ea-D. Les noyaux sont colorés par du DAPI. Pour chaque cellule, le contour a été dessiné et la valeur de l'IC mitochondrial est donnée. Barre = 20  $\mu$ m. **(D)** Quantification du taux de mito-agresomes pour chaque condition. Les résultats sont donnés pour trois expériences indépendantes (n = 40 cellules). Analyse statistique : ns, non significatif ; \*\* P < 0.05 (Test de Student).



## V. 2 Article n°2 : “Essential role of hyperacetylated microtubules in the innate immunity escape orchestrated by the EBV-encoded BHRF1 protein”

### V. 2. A Introduction

Dans cette seconde étude nous nous sommes attachés à mieux caractériser le mécanisme par lequel BHRF1 induit la formation des mito-agrèsomes. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur le rôle du cytosquelette, et plus particulièrement sur l'implication des MTs et leur niveau d'acétylation, dans les mouvements mitochondriaux. Cette étude a aussi permis de mettre en lumière un nouveau mécanisme de régulation de l'immunité innée, impliquant l'hyperacétylation des MTs par ATAT1.

Chez les eucaryotes, les mitochondries accomplissent de nombreuses fonctions essentielles telles que la production d'énergie, l'homéostasie calcique, la régulation de la mort cellulaire programmée ou encore la modulation de l'immunité innée (Giacomello *et al.*, 2020). Les fonctions mitochondriales sont directement liées à la morphologie de l'organite, qui est elle-même sous la dépendance des processus de dynamique mitochondriale (fission, fusion et motilité). En effet, les mitochondries ne sont pas des organites figés dans la cellule, elles subissent régulièrement des processus de fission et de fusion afin d'adapter la taille et la structure du réseau (Giacomello *et al.*, 2020). De plus, les mitochondries ont besoin d'être motiles afin d'assurer leurs fonctions. Le cytosquelette, et plus particulièrement les MTs, jouent un rôle fondamental dans la distribution des mitochondries dans le cytoplasme vers des sites, entre autres, où la demande énergétique est forte (Frederick & Shaw, 2007; Kruppa & Buss, 2021).

Les MTs sont des biopolymères dynamiques formés d'hétérodimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ . Leurs fonctions sont multiples, puisque les MTs sont impliqués dans le maintien de la structure et de la polarité des cellules, ou encore dans le transport d'organites. Les MTs peuvent même être utilisés par les virus pour permettre leurs mouvements intracellulaires (Zheng *et al.*, 2017). Pour assurer leurs fonctions, les MTs possèdent des protéines qui leur sont associées, appelées les MAPs. C'est à ce groupe de protéines qu'appartiennent les kinésines et les dynéines, des moteurs moléculaires largement connus pour assurer les mouvements intracellulaires de cargos le long des MTs. Les kinésines sont à l'origine d'un mouvement dit antérograde, vers la périphérie cellulaire, tandis que les dynéines assurent un mouvement rétrograde, vers le centre de la cellule (Hancock, 2014). Concernant spécifiquement les mouvements mitochondriaux le mécanisme n'est pas totalement décrypté, mais certaines protéines permettant de faire le lien entre les mitochondries et les moteurs ont été identifiées (Tang, 2018; Van Spronsen *et al.*, 2013).

Les MTs subissent de nombreuses MPT (Janke & Magiera, 2020). Parmi elles, l'acétylation de la tubuline  $\alpha$ , qui intervient principalement sur la Lys-40, apparaît comme un important moyen de réguler différentes fonctions cellulaires (Perdiz *et al.*, 2011). L'acétylation de la tubuline  $\alpha$  est communément associée à la stabilité des MTs, ce qui modulerait également la fixation des MAPs et par conséquent les mouvements d'organites (Dompierre *et al.*, 2007; Mackeh *et al.*, 2014; Reed *et al.*, 2006). En effet, les MTs stables sont une population particulièrement impliquée dans les mouvements mitochondriaux (Friedman *et al.*, 2010). De plus, il a été montré que l'acétylation de la tubuline pouvait faciliter le mouvement rétrograde des mitochondries via les dynéines (Misawa *et al.*, 2013).

Dans cet article, nous avons eu pour objectif d'explorer la possibilité que BHRF1 induise l'agrégation des mitochondries en agissant au niveau des MTs. Nous avons démontré qu'en déstructurant le réseau de MTs, les mito-agrésomes induits par BHRF1 sont dispersés. Il s'avère même que BHRF1 agit directement sur les MTs, en induisant l'hyperacétylation de la tubuline  $\alpha$ . Cette hyperacétylation est dépendante de l'acétyltransférase ATAT1. Cette MPT est essentielle à la formation des mito-agrésomes, qui est également dépendante de l'activité des dynéines. Comme nous avons décrit précédemment que BHRF1 induit une mitophagie provirale (Vilmen *et al.*, 2020), nous avons recherché si l'inhibition de l'hyperacétylation des MTs prévient l'induction de la mitophagie, et donc l'activité inhibitrice de BHRF1 sur la réponse IFN de type I. Dans cette étude, nous montrons que la production d'IFNs peut être régulée via l'hyperacétylation des MTs. Ces expériences ont donc permis de caractériser un nouveau mécanisme de régulation de l'immunité innée antivirale.

### V. 2. B Résultats

Les résultats de cette étude, où j'apparais en tant que premier auteur, sont actuellement en *preprint* sur bioRxiv depuis juin 2021 (Glon *et al.*, 2021) ainsi qu'en révision à Review Commons.

## **Essential role of hyperacetylated microtubules in innate immunity escape orchestrated by the EBV-encoded BHRF1 protein**

**Damien Glon<sup>1</sup>, Géraldine Vilmen<sup>1, 2†</sup>, Daniel Perdiz<sup>3†</sup>, Eva Hernandez<sup>1</sup>, Guillaume Beauclair<sup>1</sup>, Vincent Maréchal<sup>2</sup>, Christian Poüs<sup>3, 4</sup>, Marion Lussignol<sup>1#</sup> and Audrey Esclatine<sup>1##</sup>**

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

2. CRSA, Centre de Recherche Saint-Antoine, UMRS 938, INSERM, Sorbonne Université, 75012 Paris, France

3. INSERM UMR-S 1193, Université Paris-Saclay, 92296 Châtenay-Malabry, France

4. Biochimie-Hormonologie, APHP, Hôpitaux Universitaires Paris-Saclay, Site Antoine Béclère, 92141 Clamart, France

† These authors contributed equally to this work.

# These authors share senior authorship.

\* For correspondence: [audrey.esclatine@universite-paris-saclay.fr](mailto:audrey.esclatine@universite-paris-saclay.fr) (AE)

**Competing interests:** The authors declare that no competing interests exist.

## Abstract

Innate immunity constitutes the first line of defense against viruses, in which mitochondria play an important role in the induction of the interferon (IFN) response. BHRF1, a multifunctional viral protein expressed during Epstein-Barr virus reactivation, modulates mitochondrial dynamics and disrupts the IFN signaling pathway. Mitochondria are mobile organelles that move through the cytoplasm thanks to the cytoskeleton and in particular the microtubule (MT) network. MTs undergo various post-translational modifications, among them tubulin acetylation. In this study, we demonstrated that BHRF1 induces MT hyperacetylation to escape innate immunity. Indeed, expression of BHRF1 induces the aggregation of shortened mitochondria next to the nucleus. This mito-aggresome is organized around the centrosome and its formation is MT-dependent. We also observed that the BHRF1-induced hyperacetylation of MTs involves the  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase ATAT1. Thanks to a non-acetylatable  $\alpha$ -tubulin mutant, we demonstrated that this hyperacetylation is necessary for the mito-aggresome formation. We investigated the mechanism leading to the clustering of mitochondria, and we identified dyneins as motors that are required for the mitochondrial aggregation. Finally, we demonstrated that BHRF1 needs MT hyperacetylation to block the induction of the IFN response. Indeed, in the absence of MT hyperacetylation, BHRF1 is unable to initiate the sequestration of mitochondria into autophagosomes, and mitophagy, which is essential to inhibiting the signaling pathway. Therefore, our results reveal the role of the MT network, and its acetylation level, in the induction of a pro-viral mitophagy.

## Introduction

The innate immunity system provides the first line of defense against different invading pathogens. This process is based on the sensing of motifs from the foreign organism, called the pathogen-associated molecular pattern (PAMP), by different host pattern recognition receptors (PRR). In the case of a viral infection, their recognitions notably lead to the induction of the interferon (IFN) response, which leads to the expression of interferon-stimulated genes and the synthesis of cytokines known for their antiviral properties (Lee and Ashkar, 2018).

Mitochondria carry out a crucial role in many cellular processes ranging from energy production to programmed cell death, from calcium homeostasis to cell immunity. They constitute a platform for signaling pathways involved in innate immunity thanks to the MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein) receptor, predominantly localized at the mitochondrial outer membrane surface (Arnoult *et al.*, 2011; West *et al.*, 2011). The functions of mitochondria depend on their morphology, which is in turn dependent upon mitochondrial dynamics (including fission, fusion, and motility). Indeed, mitochondria are dynamic organelles that continually switch between cycles of fusion and fission to regulate the network structure (Giacomello *et al.*, 2020). Fission occurs at mitochondria-endoplasmic reticulum (ER) contact sites, which facilitate the recruitment of Drp1 (dynamin related protein 1), which multimerizes and in turn triggers the severing of mitochondria (Pagliuso *et al.*, 2018). Fusion is regulated by both MFN1/2 (mitofusins 1 and 2) and OPA1 (optic atrophy type 1) located at the outer and inner mitochondrial membrane, respectively. Moreover, mitochondria are motile because they are actively recruited to specific cellular locations to respond to their functions. In eukaryotic cells, the cytoskeleton and notably microtubules (MTs) play a critical role in the distribution of mitochondria throughout the cytoplasm by facilitating their transport to areas with high metabolic demands (Frederick and Shaw, 2007; Kruppa and Buss, 2021).

The MT cytoskeleton is a highly dynamic polymer of  $\alpha$  and  $\beta$ -tubulin heterodimers, which is involved in a variety of cellular functions, such as supporting cell structures, maintaining cell polarity, but also allowing the transport of organelles. Moreover, it has been shown that the MT network of viral infected cells could be used for intracellular transport of viral particle/genomic material to the sites of replication or assembly (Zheng *et al.*, 2017). A broad range of MT-associated proteins (MAPs) contribute to regulate MT dynamic behavior. MAPs include kinesins and dyneins, which both allow the positioning of organelles and the long-distance transport of vesicles along MT tracks. Kinesins generally transport their cargos toward the plus-end of MTs at the cell periphery. Conversely, dyneins transport their cargos to the minus-end of MTs in the cell center (Hancock, 2014). The relationship between MTs and mitochondrial transport is not completely understood. Mitochondrial movement involves

mitochondrial adaptors such as small mitochondrial Rho GTPases Miro1/2 and TRAK1/2 (López-Doménech *et al.*, 2018). Indeed, Miro proteins can engage both kinesin and dynein to mediate the bidirectional movement of mitochondria along MT tracts (Fransson *et al.*, 2006; Frederick and Shaw, 2007; Tang, 2018).

MT functions are regulated by numerous post-translational modifications such as acetylation, detyrosination, phosphorylation, methylation or polyglutamylated (Janke and Magiera, 2020). Among them the acetylation of  $\alpha$ -tubulin, which mainly occurs on the Lysine in position 40 (K40), has emerged as an important regulator of numerous cell functions (Perdiz *et al.*, 2011). For example,  $\alpha$ -tubulin acetylation, which is often linked to MT stabilization, may modulate the binding of MAPs (Dompierre *et al.*, 2007; Mackeh *et al.*, 2014; Reed *et al.*, 2006) and therefore may modulate organelle movement. Indeed, stable MTs are particularly involved in mitochondrial transport (Friedman *et al.*, 2010), and it has been reported that acetylation of  $\alpha$ -tubulin mediates dynein-dependent transport of mitochondria along MTs (Misawa *et al.*, 2013).

In this work, we aimed at studying the role of the MT network in the innate immunity escape induced by the Epstein-Barr virus (EBV). BHRF1 is a viral Bcl-2 homolog (Khanim *et al.*, 1997), and our group recently unravelled its novel functions in innate immunity, related to its mitochondrial localization (Vilmen *et al.*, 2020). We demonstrated that BHRF1 disturbs mitochondrial dynamics and subsequently stimulates autophagy. More precisely, BHRF1 induces mitophagy, a cellular process that can specifically sequester and degrade mitochondria by autophagy, and we have shown that BHRF1-induced mitophagy participates in the inhibition of type I IFN response by EBV (Vilmen *et al.*, 2020). Here, we described the importance of the MT hyperacetylation on the mitochondrial clustering and, more unexpectedly, on the capability of BHRF1 to counteract the IFN induction.



## Results

### **BHRF1-induced mito-aggresomes are organized around the centrosomes**

The EBV-encoded BHRF1 localizes to mitochondria, and its expression in HeLa cells dramatically alters mitochondrial dynamics and distribution, (Vilmen *et al.*, 2020). By confocal microscopy, we observed abnormal mitochondrial aggregates close to the nucleus in BHRF1-expressing cells, whereas in control cells (empty vector [EV] transfection), mitochondria remained distributed throughout the cytoplasm (**Figure 1A**). This mitochondrial phenotype, known as mito-aggresome, is in accordance with our previous observations. We arbitrarily consider that, when the compaction index (CI) of mitochondria is above 0.4, the cell presents a mito-aggresome, whereas when the CI value is below 0.4, mitochondria are distributed homogeneously throughout the cell cytoplasm (Narendra *et al.*, 2010; Vilmen *et al.*, 2020). The expression of BHRF1 significantly increased the CI values, which corresponds to the formation of a mito-aggresome in almost 80% of the cells (**Figure 1B**). Since BHRF1 is associated with mitochondrial fragmentation (**Figure 1A - insets**), we precisely evaluated mitochondrial shape by calculation of the aspect ratio (AR) and the form factor (FF), two parameters which reflect the mitochondrial length and the branching of mitochondria, respectively. As calculated in **Figure 1C**, BHRF1 expression significantly reduced both AR and FF parameters, confirming an induction of mitochondrial fission.

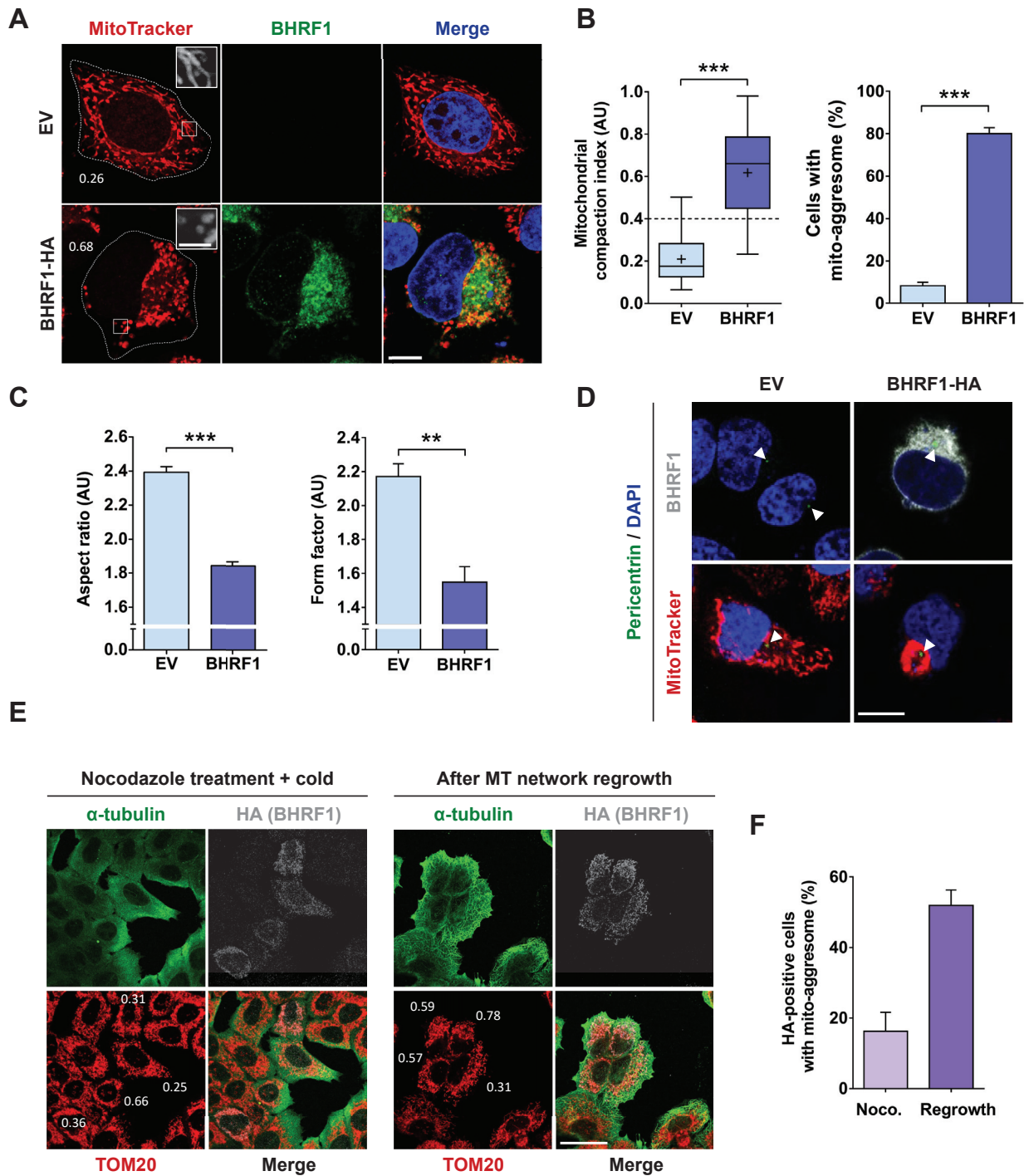
As mitochondria localize near the nucleus, the involvement of the MT network in this mitochondrial redistribution was investigated. In mammalian cells, mitochondria move along cytoskeletal tracks to sites of high-energy demand in an MT-dependent manner (Detmer and Chan, 2007). At interphase, the MT network radiates from the centrosome, the main MT organizing center for directing the polarity and the orientation of MTs. By co-staining BHRF1-expressing cells for mitochondria and pericentrin, a classical centrosomal marker, we observed that mitochondria are concentrated around the centrosome to form a mito-aggresome (**Figure 1D**). Moreover, a 3D reconstruction confirmed the clustering of BHRF1 in the vicinity of the nucleus around the centrosome (**Supplementary file 1**).

### **The MT network is required for BHRF1-induced mito-aggresome formation**

To test whether MTs play a role in the mitochondrial redistribution following BHRF1 expression, the whole MT network was disassembled using a treatment mixing nocodazole, a classical MT-destabilizing drug, and exposure to cold (Geeraert *et al.*, 2010). As shown in **Figure 1E - left panel** this treatment disassembled MTs (fuzzy staining of  $\alpha$ -tubulin). The removal of nocodazole followed by 1 hour in a warm complete medium at 37°C restored the MT network (**Figure 1E - right panel**). In cells without BHRF1 expression, mitochondria were homogeneously distributed in the cytoplasm, and the disorganization of the MT network had no impact on their distribution. Conversely, mitochondrial

aggregation in BHRF1-expressing cells was abolished when MTs were depolymerized (**Figure 1E - left panel**) and mitochondria were then distributed throughout the cell (CI values mainly below 0.4). This phenomenon was reversible since the mitochondria rapidly re-aggregated to different extents within 1 hour after reassembly of the MT network (most of the CI values above 0.4) (**Figure 1E - right panel**). In contrast, mitochondria in non-transfected neighboring cells remained scattered within the cytoplasm after nocodazole removal. The quantification of mito-aggregates in BHRF1-positive cells showed that whereas less than 20% of the cells presented mitochondrial aggregation after depolymerization treatment (**Figure 1F**), this proportion went back to more than 50% after repolymerization of the MTs (compare to 80% without treatment). We concluded that the MT network is required for the mito-aggregate formation.

As the actin network is also known to be involved in mitochondrial transport and fission (De Vos *et al.*, 2005; López-Doménech *et al.*, 2018), we also checked if F-actin disorganization affects the mitochondrial phenotype induced by BHRF1. In order to do so, we treated HeLa cells with cytochalasin B to disrupt F-actin but we did not observe any changes in the mitochondrial phenotype in BHRF1-positive cells (**Supplementary file 2A**). BHRF1 still induced the mitochondrial aggregation and fission at the same level as in the control (**Supplementary file 2B and C**). Therefore, the actin network does not seem to be involved in the mitochondrial phenotype.



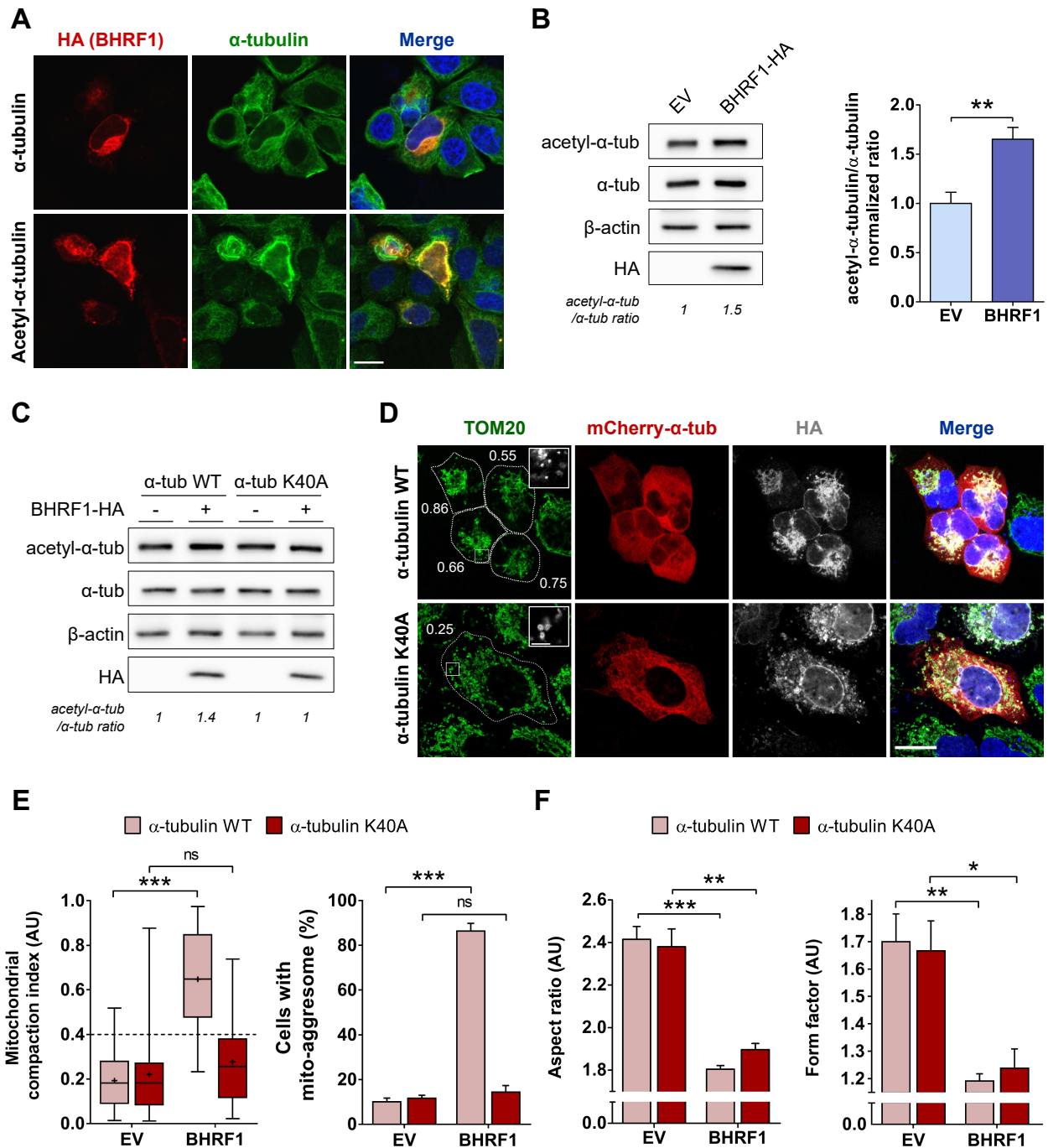
**Figure 1.** BHRF1 induces the formation of mito-aggresomes in a microtubule dependent manner. (A-C) HeLa cells were transfected for 24 h with BHRF1-HA plasmid or with EV as a control. Mitochondria were labeled with MitoTracker Red CMXRos and cells immunostained for BHRF1. Nuclei were stained with DAPI. (A) Confocal images with insets (3X) on mitochondrial phenotype. The values of the mitochondrial CI are indicated on representative cells. Scale bars: 10  $\mu$ m, and 2  $\mu$ m for insets. (B) *Left*, assessment of mitochondrial aggregation by calculation of CI. *Right*, percentage of cells presenting a mito-aggresome (n = 20 cells). (C) Quantification of mitochondrial fission parameters, aspect ratio (AR; *left panel*) and form factor (FF, *right panel*). (D) Confocal images of HeLa cells transfected with BHRF1-HA plasmid (or EV) and immunostained for pericentrin and BHRF1 (*upper panel*) or mitochondria (*lower panel*). Nuclei were stained with DAPI. Scale bar: 20  $\mu$ m. Arrowheads show the centrosomal localization of pericentrin. (E-F) MT network depolymerization assay. (E) Representative images where BHRF1 expression is visualized by HA immunostaining (gray), the MT network by  $\alpha$ -tubulin immunostaining (green), and mitochondria are immunostained with an anti-TOM20 antibody (red). The values of the mitochondrial CI are indicated on representative cells. Scale bars: 10  $\mu$ m, and 2  $\mu$ m for insets. (F) Percentage of BHRF1-HA-positive cells presenting a mito-aggresome (n = 30 cells) in cells treated with nocodazole and after MT regrowth. Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001 (Student's t-test).

**BHRF1 induces MT hyperacetylation, which is required for the mito-aggresome formation**

We next explored whether BHRF1 could modify the MT network by assessing its acetylation level. Upon BHRF1 expression, whereas  $\alpha$ -tubulin staining was unchanged, acetyl- $\alpha$ -tubulin was redistributed and colocalized with BHRF1 (**Figure 2A**). Moreover, we observed a brighter signal of acetyl- $\alpha$ -tubulin, suggesting an increase in  $\alpha$ -tubulin acetylation. This was confirmed by western-blot analysis, showing an increase of 60% under BHRF1 expression (**Figure 2B**).

To determine whether this hyperacetylation could be involved in BHRF1-induced mitochondrial alterations, we expressed a non-acetylatable  $\alpha$ -tubulin mutant (mCherry- $\alpha$ -tubulin K40A) which prevents MT hyperacetylation (Dompierre *et al.*, 2007). It has previously been reported that this non-acetylatable  $\alpha$ -tubulin mutant does not alter the MT network and is present in the entire MT network (Geeraert *et al.*, 2010). Notably, when  $\alpha$ -tubulin K40A is expressed, endogenous  $\alpha$ -tubulin still remains acetylatable. However, the MT network's ability to be hyperacetylated is prevented, since  $\alpha$ -tubulin acetylation only occurs on protofilaments and the MT network is totally decorated with this non-acetylatable  $\alpha$ -tubulin. We thus verified by immunoblot analysis that BHRF1 was unable to induce hyperacetylation of  $\alpha$ -tubulin when the mutant  $\alpha$ -tubulin K40A was expressed (**Figure 2C**). Then, the impact of  $\alpha$ -tubulin K40A on the clustering of mitochondria was analyzed (**Figures 2D and E**). In cells co-expressing  $\alpha$ -tubulin K40A and BHRF1, CI mean value was below 0.4 and mitochondria were homogeneously distributed throughout the cytoplasm, similarly to control cells. Thus, we concluded that BHRF1-induced mito-aggresome formation depends on MT hyperacetylation.

Interestingly, we observed that without  $\alpha$ -tubulin hyperacetylation, BHRF1 was still able to promote mitochondrial fragmentation (**Figure 2F**). Confocal images (**Figure 2D, insets**) clearly showed that upon BHRF1 expression (for both WT and K40A conditions) mitochondria were drastically smaller. Therefore, hyperacetylation of MTs is essential for BHRF1-induced mito-aggresome formation but not for mitochondrial fission.

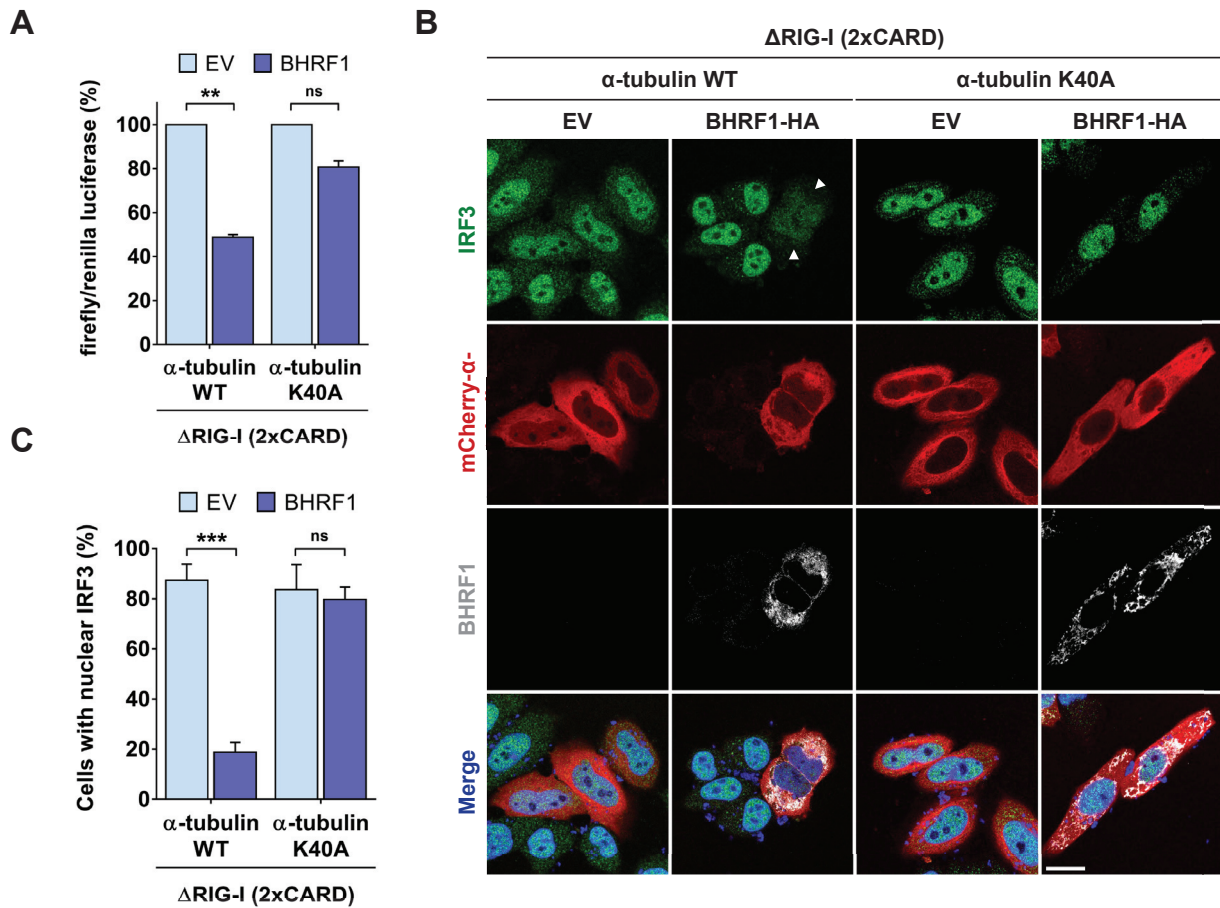


**Figure 2.** BHRF1 stimulates microtubules hyperacetylation, a process essential for the mito-aggresome formation. (A) Representative images of HeLa cells expressing BHRF1-HA and immunostained for HA and  $\alpha$ -tubulin (*upper panel*) or acetyl- $\alpha$ -tubulin (*lower panel*). Nuclei were stained with DAPI. Scale bar: 20  $\mu$ m. (B) *Left*, immunoblot analysis of BHRF1-HA, acetyl and total  $\alpha$ -tubulin.  $\beta$ -actin was used as a loading control. *Right*, the histograms show the normalized ratios of acetyl- $\alpha$ -tubulin to total  $\alpha$ -tubulin. (C-F) HeLa cells were co-transfected with plasmids encoding BHRF1-HA (or EV) and either mCherry- $\alpha$ -tubulin WT (K40K) or a non-acetylatable form (K40A). (C) Immunoblot analysis of BHRF1-HA, acetyl and total  $\alpha$ -tubulin. (D) Confocal images with insets (3X). BHRF1-HA expressing cells were visualized with an anti-HA antibody and mitochondria were immunostained with an anti-TOM20 antibody. Nuclei were stained with DAPI. Scale bars: 10  $\mu$ m and 4  $\mu$ m for insets. Values of mitochondrial CI are indicated on representative cells. Images of control cells are presented in **Supplementary Figure 3**. (E) Quantification of CI and cells with mito-aggregomes ( $n = 20$  cells). (F) Quantification of mitochondrial fission parameters ( $n = 20$  cells). Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. ns = non-significant; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  (Student's t-test).

### **MT hyperacetylation is necessary to the inhibition of type I IFN response by BHRF1**

Mitochondria appear to be central organelles for the induction of antiviral innate immunity. RIG-I (retinoic acid-inducible gene) and MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) are two cytoplasmic PRRs that detect viral genome. Upon activation, these receptors are translocated to the mitochondria to interact with the mitochondrial-resident protein MAVS that recruits and activates TBK1 (TANK-binding kinase 1). This kinase is required for the phosphorylation of the transcription factors IRF3 and IRF7 (interferon regulatory factors 3 and 7), leading to their dimerization, nuclear translocation and the subsequent activation of type I IFN promoter (Arnoult *et al.*, 2011; West *et al.*, 2011). Our group and others previously demonstrated that impairing the mitochondrial morphodynamics leads to the inhibition of IFN response (Castanier *et al.*, 2010; Chatel-Chaix *et al.*, 2016; Vilmen *et al.*, 2020; Yoshizumi *et al.*, 2014). Considering the importance of tubulin hyperacetylation for the formation of mito-aggresomes, we sought to know whether MT hyperacetylation was required for the inhibition of type I IFN response by BHRF1. We performed an IFN- $\beta$  promoter-driven luciferase reporter assay in BHRF1-expressing HEK293T cells (**Figure 3A**). To activate the IFN-signaling pathway, we expressed an active form of RIG-I, designated  $\Delta$ RIG-I (2xCARD) (Yoneyama *et al.*, 2004), which constitutively activates MAVS-dependent pathway through CARD domains interaction. As previously observed, BHRF1 dramatically blocked the IFN- $\beta$  promoter activation, however, the expression of the  $\alpha$ -tubulin K40A significantly prevented this inhibition (**Figure 3A**). To confirm our results, we examined the cellular localization of IRF3 by immunofluorescence. In basal conditions, IRF3 staining is diffuse throughout the cytoplasm. When  $\Delta$ RIG-I (2xCARD) is expressed, IRF3 translocates from the cytoplasm into the nucleus but expression of BHRF1 blocked this translocation (**Figure 3B**). However, when MT hyperacetylation was prevented, BHRF1 was not able to block IRF3 nuclear translocation (**Figure 3B**). Quantification of this assay showed that expression of the non-acetylatable form of  $\alpha$ -tubulin totally restored IRF3 nuclear translocation upon BHRF1 expression (**Figure 3C**). Therefore, our results demonstrated that MT hyperacetylation is required for BHRF1 to inhibit type I IFN response.



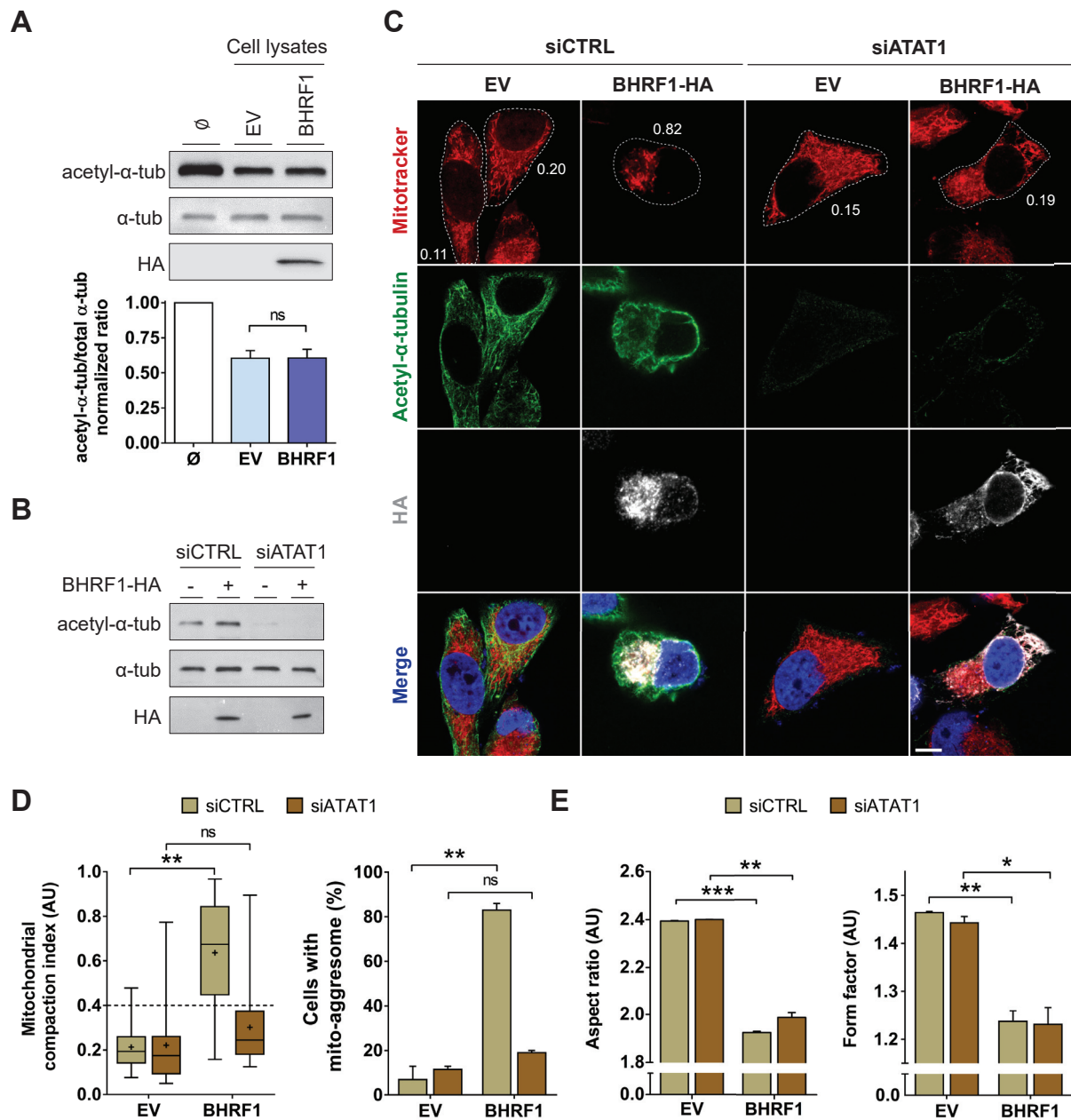


**Figure 3.** Hyperacetylation of  $\alpha$ -tubulin is required for BHRF1 to block IFN. **(A)** Luciferase reporter assay on HEK293T cells co-expressing BHRF1 (or EV) and  $\alpha$ -tubulin K40A (or WT). Activation of the IFN- $\beta$  promoter was analyzed 24 h post-transfection. Firefly/renilla luciferase ratios were calculated and normalized to control conditions. **(B and C)** HeLa cells were co-transfected for 24 h with plasmids encoding BHRF1-HA (or EV), mCherry- $\alpha$ -tubulin K40A (or WT), and  $\Delta$ RIG-I (2xCARD). **(B)** Confocal images. BHRF1-HA-transfected cells were visualized with an anti-HA antibody and cells were immunostained with an anti-IRF3 antibody. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar: 20  $\mu$ m. Arrowheads indicate BHRF1-expressing cells without IRF3 nuclear localization. **(C)** Percentage of cells expressing mCherry- $\alpha$ -tubulin and presenting IRF3 nuclear localization (n = 50 cells). Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. ns = non-significant; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001 (Student's t-test).

**BHRF1 requires acetyltransferase ATAT1 to modify MTs and form mito-aggresomes.**

Thereafter, we wanted to characterize the mechanism of MT hyperacetylation induction by BHRF1. Tubulin acetylation results from the balance between the activities of tubulin acetyltransferases and deacetylases. Therefore, a hyperacetylation of the MTs can be the consequence of either the inhibition of deacetylases or the activation of an acetyltransferase. First of all, we wanted to investigate a potential inhibitory role of BHRF1 on the two main  $\alpha$ -tubulin deacetylases, HDAC6 (histone deacetylase 6) and SIRT2 (sirtuin type 2) (Hubbert *et al.*, 2002; North *et al.*, 2003). Indeed, it has been observed that knockdown of SIRT2 results in an aberrant mitochondrial distribution in the perinuclear region (Misawa *et al.*, 2013), and another study showed that the depletion of SIRT2 results in nuclear envelope shape defects (Kaufmann *et al.*, 2016). These observations are clearly similar to the effect of BHRF1 on mitochondria, as well as its distribution around the nuclear envelope and the modification of the nucleus shape (**Figure 1A**). Thus, we performed an *in vitro* tubulin deacetylation assay (Mackeh *et al.*, 2014). This test consists of mixing the highly acetylated porcine brain tubulin with lysates of BHRF1-expressing cells. Lysate of control EV-transfected cells reduces the acetylation of tubulin by approximately 50% compared to condition without cell lysate (**Figure 4A**). The same deacetylase activity is observed with BHRF1-positive lysates, indicating that BHRF1 does not inhibit the deacetylases.

We subsequently investigated the role of ATAT1 (alpha-tubulin N-acetyltransferase 1) (Shida *et al.*, 2010). We knocked down ATAT1 expression by a siRNA approach and observed no more detectable acetylation activity under BHRF1 expression (**Figure 4B**), indicating involvement of ATAT1 in BHRF1-induced hyperacetylation. Then, we checked the mitochondrial network and observed that the knockdown of ATAT1 prevents the mito-aggresome formation but not mitochondrial fission (**Figure 4C-E**). These results led us to conclude that BHRF1 activates the acetyltransferase ATAT1, leading to MT hyperacetylation and subsequent mito-aggresome formation.

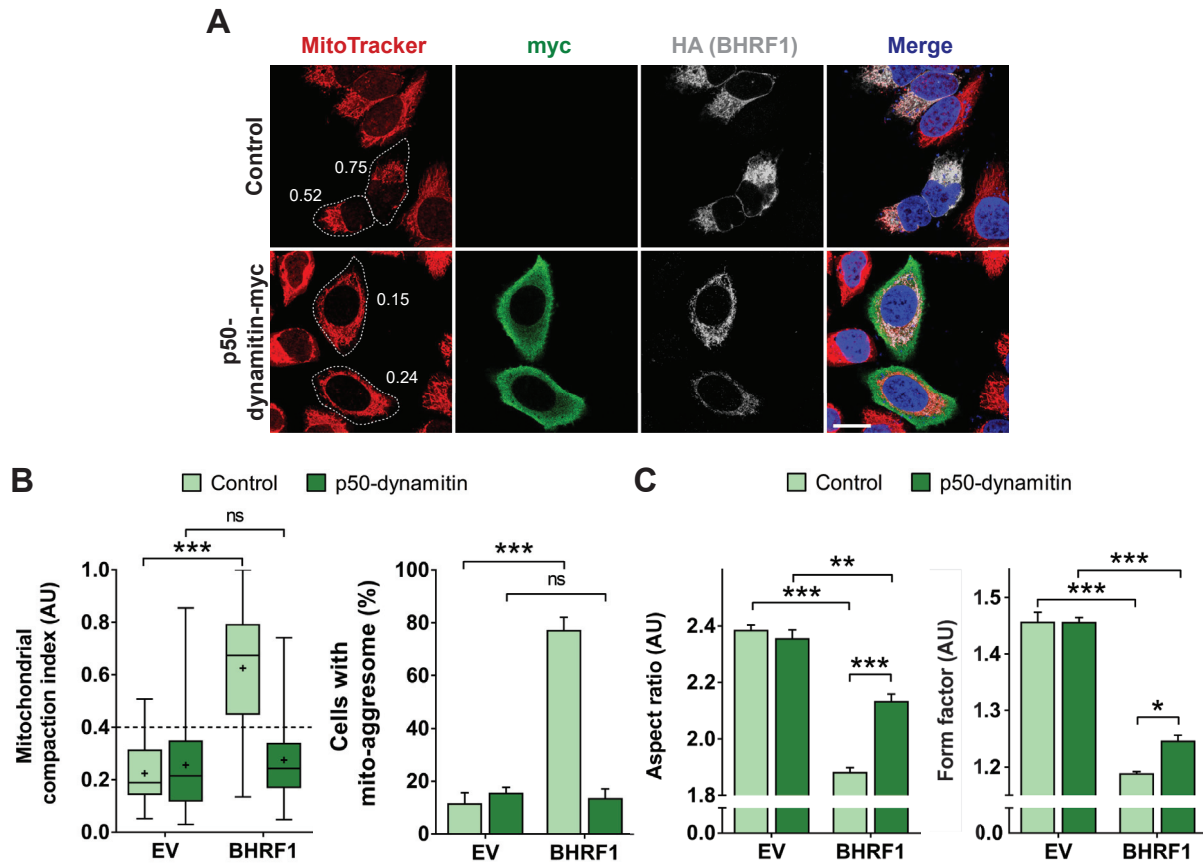


**Figure 4.** Characterization of MT hyperacetylation mechanism induced by BHRF1. **(A)** Tubulin deacetylation assay. HeLa cells were transfected with BHRF1-HA plasmid (or EV) and lysed 48 h post-transfection. Cell lysates were incubated *in vitro* with porcine brain tubulin and NAD<sup>+</sup>. BHRF1-HA, acetylated and total  $\alpha$ -tubulin were detected by immunoblot, and the histogram represents the normalized ratios of acetyl to total  $\alpha$ -tubulin. **(B-D)** After knockdown of ATAT1, HeLa cells were transfected with BHRF1-HA (or EV) and lysed/fixed 24 h post-transfection. **(B)** Extinction of ATAT1 activity visualized by immunoblot analysis of acetylated and total  $\alpha$ -tubulin. **(C)** Confocal images. Mitochondria were labeled with MitoTracker CMXRos, and cells were immunostained for acetyl- $\alpha$ -tubulin and HA. Nuclei were stained with DAPI. Values of mitochondrial CI are indicated on representative cells. Scale bar: 20  $\mu$ m. **(D)** Quantification of CI and cells with mito-aggregomes (n = 20 cells). **(E)** Quantification of mitochondrial fission parameters (n = 20 cells). Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. ns = non-significant; \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001 (Student's t-test).

### **Mito-aggresome formation requires retrograde transport of mitochondria via dyneins**

As observed in *Figure 1E*, after removal of nocodazole and regrowth of the MT network, mitochondria rapidly re-aggregated in BHRF1-expressing cells, indicating that an MT-dependent motor activity is involved in the mito-aggresome formation. Moreover, the hyperacetylation of MTs has been previously shown to facilitate the recruitment and binding of MAPs on the tubulin (Dompierre *et al.*, 2007). We therefore hypothesized that BHRF1-induced mitochondrial aggregation next to the nucleus could use dyneins. To investigate this hypothesis, we inhibited dynein functions by overexpression of p50-dynamitin. The overexpression of one subunit of the dynactin complex (p50-dynamitin) disrupts it and results in the dissociation of dyneins from the MT network. We observed that the expression of this construction totally prevents mitochondrial aggregation in BHRF1-expressing cells (*Figures 5A and 5B*). Moreover, the ability of BHRF1 to induce mitochondrial fission was decreased when dyneins were inhibited, as we observed a partial but significant restoration of mitochondrial fission parameters (AR and FF; *Figure 5C*).

To confirm the importance of dynein motors in the mito-aggresome formation, we treated cells with ciliobrevin-D, a specific inhibitor of dyneins, which blocks their gliding along MTs and their ATPase activity. As with overexpression of p50-dynamitin, BHRF1 was not able to induce mito-aggresomes in cells treated with ciliobrevin-D (*Supplementary file 4B and 4C*). However, BHRF1 still induced a slight mitochondrial fission phenomenon (*Supplementary file 4B and 4D*). Altogether, these results demonstrate that fragmented mitochondria are aggregated next to the nucleus in a dynein-dependent manner.



**Figure 5.** Dynein-based transport is required for BHRF1 to aggregate mitochondria next to the nucleus. **(A-C)** HeLa cells were co-transfected with plasmids encoding BHRF1-HA (or EV) and p50-dynamitin-myc (or control) for 24 h and then fixed. **(A)** Confocal images. Mitochondria were labeled with MitoTracker CMXRos, and cells were immunostained for c-myc and HA. Nuclei were stained with DAPI. Values of mitochondrial CI are indicated on representative cells. Scale bar: 20  $\mu$ m. Images of cells expressing EV and p50-dynamitin-myc are presented in **Supplementary Figure 4A**. **(B)** Quantification of CI and cells with mito-aggregomes ( $n = 20$  cells). **(C)** Quantification of mitochondrial fission parameters ( $n = 20$  cells). Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. ns = non-significant; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  (one-way ANOVA test).

### **MT hyperacetylation does not affect BHRF1-pro-autophagic activity, but is required for the first step of mitophagy induction**

Our group previously demonstrated that BHRF1 first stimulates autophagy and then induces mitophagy, the selective removal of mitochondria (Vilmen *et al.*, 2020). Autophagy is a conserved cellular process allowing the removal and recycling of damaged or supernumerary cellular components. This process involves double-membrane vesicles, called autophagosomes, which fuse with lysosomes to degrade the content. Selective autophagy consists of the recognition of a specific cargo by a molecular receptor that links the cargo to the autophagosome for its removal (Green and Levine, 2014).

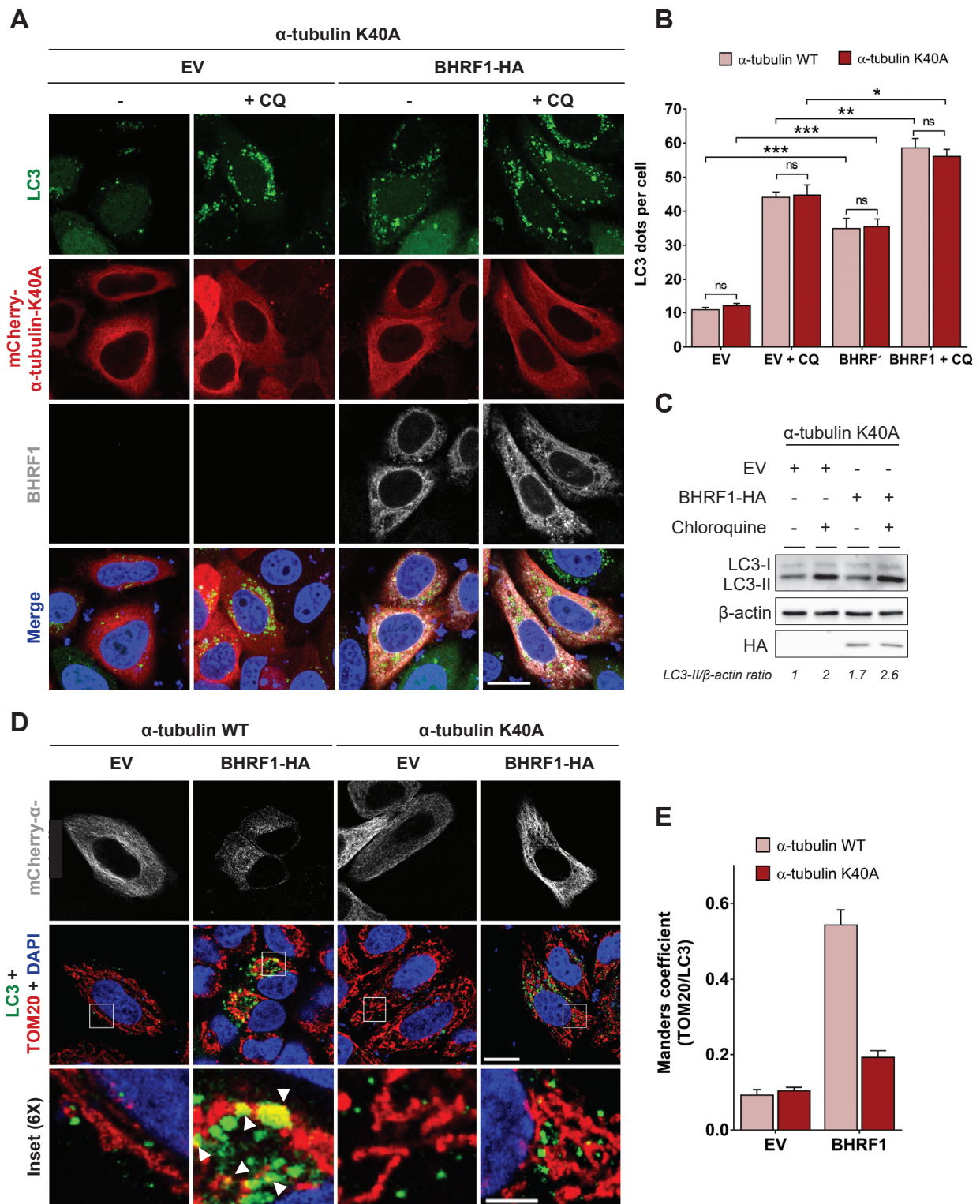
Several studies demonstrated the role of MTs during the autophagic process, notably during the formation of the autophagosomes (Geeraert *et al.*, 2010; Köchl *et al.*, 2006; Mackeh *et al.*, 2013). Thus, we investigated whether BHRF1 could stimulate autophagy dependent on MT hyperacetylation. The autophagic flux was studied in HeLa cells co-expressing  $\alpha$ -tubulin K40A and BHRF1. We first analyzed by immunofluorescence the accumulation of LC3 (microtubule associated protein 1 light chain 3), a classical marker of autophagosomes in the presence or absence of chloroquine (CQ), an inhibitor of the autophagic flux. When non-acetylatable  $\alpha$ -tubulin was expressed, BHRF1 induced a clear accumulation of LC3 dots in the cytoplasm, and even more after CQ treatment (**Figure 6A**). We quantified LC3 dots and we observed no difference when MTs were hyperacetylated or not (**Figure 6B and supplementary file 5A**). We confirmed the result by analyzing the accumulation of lipidated LC3 (LC3-II) by immunoblot and we observed an increase in LC3-II levels in BHRF1-expressing cells, independently of MT hyperacetylation (**Figure 6C and Supplementary file 5B**). This increase is potentiated after CQ treatment. Therefore, we concluded that BHRF1 stimulates the biogenesis of autophagosomes and the autophagic flux independently of MT hyperacetylation.

Mitochondrial aggregation in the perinuclear region has been already documented as essential to the efficient removal of mitochondria by mitophagy (Lee *et al.*, 2010). Although autophagy stimulation occurs independently of MT hyperacetylation, we investigated whether BHRF1-induced mitophagy depends on tubulin hyperacetylation by evaluating the colocalization between mitochondria and autophagosomes in cells co-expressing  $\alpha$ -tubulin K40A and BHRF1. When MT hyperacetylation was prevented, mitochondria did not colocalize anymore with autophagosomes (**Figure 6D**). The quantification of colocalization intensity, measured by Manders' coefficient, confirmed that mitochondrial sequestration in autophagic vesicles did not occur when the mito-aggresome formation was impeded (**Figure 6E**).



We then decided to investigate whether, conversely, autophagy was involved in BHRF1-induced MT hyperacetylation. We observed that inhibition of autophagy by treatment with 3-methyladenine (3-MA) or spautin-1 impeded the MT hyperacetylation (*Supplementary file 5C*).

Altogether, these results demonstrated that MT hyperacetylation was essential for the mitochondrial sequestration but not for the induction of autophagy. In fact, BHRF1 needs autophagy activation to induce MT hyperacetylation. Therefore, we uncovered a novel mechanism to counteract anti-viral immunity, involving the initiation of mitophagy through the induction of tubulin hyperacetylation by BHRF1.



**Figure 6.** MT hyperacetylation is dispensable for BHRF1-pro-autophagic activity, but essential for mitophagy. **(A-C)** HeLa cells were co-transfected for 24 h with plasmids encoding BHRF1-HA (or EV) and mCherry- $\alpha$ -tubulin K40A (or WT), and were treated with CQ when indicated. **(A)** Confocal images. Cells were immunostained for BHRF1 and LC3 and nuclei were stained with DAPI. Scale bar: 10  $\mu$ m. Images of cells transfected with mCherry- $\alpha$ -tubulin WT are presented in **Supplementary Figure 5A**. **(B)** Quantification of LC3 dots in each condition ( $n = 30$  cells). **(C)** Immunoblot analysis of LC3 expression. **(D and E)** HeLa cells were co-transfected with BHRF1 (or EV) and mCherry- $\alpha$ -tubulin K40A (or WT). Cells were immunostained for TOM20 and LC3, and nuclei stained with DAPI. **(D)** Confocal images with insets (6X) showing colocalization events (see arrows). Scale bars: 10  $\mu$ m and 5  $\mu$ m for insets. **(E)** Colocalization level (Manders split coefficient) between mitochondria and autophagosomes. Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. ns = non-significant; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  (one-way ANOVA test).

## Discussion

We previously demonstrated that EBV-encoded BHRF1 blocks the IFN response by modifying the mitochondrial dynamics and by stimulating autophagy (Vilmen *et al.*, 2020). Expression of this viral protein induces mitochondrial fission, followed by the relocalization of fragmented mitochondria close to the nucleus in the proximity of the centrosome (*Figure 1 and Supplementary file 1*). Mitochondria are usually driven over long distances along MTs by motor proteins, thanks to the Miro/TRAK adaptor complex (Kruppa and Buss, 2021). Here, we demonstrate that the MT network is hijacked by BHRF1 to ensure the mito-aggresome formation and to consequently block the antiviral innate immunity (*Figures 1 and 3*). We notably observed that disruption of the MT network impedes mitochondrial trafficking to the centrosome, suggesting a dynamic process. In accordance, our results indicate that BHRF1 requires the MT-based motor dynein, that typically move towards the minus-end of MT, to regroup mitochondria in the perinuclear region (*Figure 5 and Supplementary file 4*).

The cytoplasmic dynein complex contains a pair of identical heavy chains which comprises the MT-binding domain. Each heavy chain harbors a motor domain that belongs to the AAA+ superfamily. Additional subunits complete this complex, each of which functions as a dimer; these are the intermediate chain, light-intermediate chain and three types of light chain (TCTEX, DYNLL1 and Roadblock) (Janke and Magiera, 2020; Roberts *et al.*, 2013). It has been reported that DYNLL1 can interact with BCL2L1/BIM, a proapoptotic BH3-only protein expressed at the mitochondrial outer membrane, and can regulate its proapoptotic activity (Puthalakath *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2019). Interestingly, it has been shown that BIM binds to BECN1, a key regulator of autophagosome formation, linking BECN1 to DYNLL1 and MTs, and leading to autophagy inhibition (Luo *et al.*, 2012). We and others demonstrated that BHRF1 can stimulate autophagy through its interaction with BECN1 and block apoptosis through its interaction with BIM (Desbien *et al.*, 2009; Kvensakul *et al.*, 2010; Vilmen *et al.*, 2020). Therefore, we hypothesize that BIM could connect mitochondria to MTs by interacting with BHRF1 and the MT-trafficking apparatus. The formation of this complex could explain the mitochondrial movement toward the centrosome and participate in autophagy regulation.

In eukaryotic cells, MTs are generally built from 13 chains of  $\alpha$ - $\beta$  tubulin dimers known as protofilaments. Properties and behaviors of MTs can be modulated by numerous post-translational modifications on both  $\alpha$  and  $\beta$  tubulin (Janke and Magiera, 2020; Janke and Montagnac, 2017). We observed that the expression of BHRF1 increases the acetylation of  $\alpha$ -tubulin on the lysine in position 40 (K40) and that acetylated MTs are required for the mito-aggresome formation (*Figure 2*). Acetylation of  $\alpha$ -tubulin subtly changes its structure and disrupts the interaction between adjacent  $\alpha$ -tubulins of neighboring protofilaments (Eshun-Wilson *et al.*, 2019). The loss of this connection weakens

interactions between protofilaments, which facilitates their sliding and decreases the flexural rigidity of MTs, making them more resistant to mechanical bending-induced breakage and disassembly (Portran *et al.*, 2017).

The hyperacetylation of MTs can result from either activation of tubulin acetyltransferases or inhibition of deacetylases (Li and Yang, 2015). Knockdown of the acetyltransferase ATAT1 by siRNA impedes the acetylation of  $\alpha$ -tubulin and the mito-aggresome formation upon BHRF1 expression (**Figure 4**). Therefore, our results demonstrate that BHRF1 induces MT hyperacetylation by activating ATAT1. The expression of the non-acetylatable K40A mutant form of tubulin confirmed that tubulin acetylation, and not just ATAT1 activity, is required for the mito-aggresome formation and sequestration of mitochondria in autophagosomes (**Figures 2 and 6**). We also investigated a potential inhibitory role of BHRF1 on tubulin deacetylases. However, our results showed that BHRF1 does not impact the global tubulin deacetylase activity of BHRF1-expressing cells, suggesting that activities of HDAC6 and SIRT2, the two main  $\alpha$ -tubulin deacetylases, are not inhibited by BHRF1 (Hubbert *et al.*, 2002; North *et al.*, 2003).

Hyperacetylation of MTs in the presence of BHRF1 could directly allow the spatial arrangement of mitochondria to the centrosome but the precise role of acetylated MTs will need to be further investigated. Misawa *et al.* demonstrated that accumulation of acetylated  $\alpha$ -tubulin by knockdown of SIRT2 results in an aberrant mitochondrial distribution in the perinuclear region (Misawa *et al.*, 2013), similar to what was observed with BHRF1. Moreover, acetylated  $\alpha$ -tubulin is more abundant in stable MTs, which are particularly implicated in mitochondrial transport (Friedman *et al.*, 2010). Interestingly, it has been shown that MT hyperacetylation *in vitro* and in cells causes the recruitment of dynein and kinesin-1 to MTs, which notably stimulates anterograde and retrograde transport of organelles in neurons or epithelial cells (Dompierre *et al.*, 2007; Geeraert *et al.*, 2010). BHRF1-induced acetylation of  $\alpha$ -tubulin could thus increase dynein recruitment to MTs, facilitating the traffic of fragmented mitochondria to the centrosome.

It is interesting to note that MT hyperacetylation induced by BHRF1 is not involved in mitochondrial fission, since expression of the non-acetylatable  $\alpha$ -tubulin mutant K40A or the knockdown of ATAT1 have no impact on mitochondrial length or branching parameters (**Figure 2F and Figure 4E**). We previously demonstrated that BHRF1 increases mitochondrial fragmentation in a Drp1-dependent manner (Vilmen *et al.*, 2020). Moreover, BHRF1 increases the dephosphorylation of Drp1 in position Ser637, which is then recruited to mitochondria to allow mitochondrial fission (Vilmen *et al.*, 2020). In our context, the lack of direct involvement of acetylated MTs on mitochondrial fission could seem quite surprising, since it has been previously shown that MT hyperacetylation triggered by acute

hyperosmotic stress enhanced mitochondrial fission (Perdiz *et al.*, 2017). However, in the context of this acute stress, mitochondrial fission is associated with an increased level of Ser616 phosphorylation of Drp1, a different post-translational modification from the one observed upon BHRF1 expression. Implication of hyperacetylated-MT in the mitochondrial fission process may thus differ according to the type of cellular stress.

BHRF1 is a multifunction protein (*e.g.* anti-apoptotic and pro-autophagic) localized at both the ER and the mitochondrial membranes. Since mitochondrial fission occurs at contact sites between ER and mitochondria, ER-localized BHRF1 could be involved in the ER remodeling into tubules which enwrap mitochondria and initiate the constriction of mitochondrial membranes before the recruitment of Drp1 (Friedman *et al.*, 2011). Conversely, the impact of BHRF1 on MT acetylation and mitochondrial trafficking could be related to its mitochondrial membrane localization.

We observed that MT hyperacetylation is not necessary to induce autophagy upon BHRF1 expression, whereas inhibition of autophagy impedes MT acetylation (**Figure 6 and Supplementary file 5**). This could seem unexpected, since several studies have demonstrated the role of MT acetylation in autophagosome formation and maturation, and the autophagy flux is directly correlated to MT acetylation levels (Esteves *et al.*, 2019; Geeraert *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010). For example, initiation of starvation-induced autophagy requires MT acetylation to recruit dynein and kinesin-1 and to allow JNK (c-Jun N-terminal kinase) activation, leading to BECN1 release (Geeraert *et al.*, 2010). Very recently, it has been shown that p27, a tumor suppressor which promotes autophagy in response to glucose starvation, stimulates MT acetylation by binding to and stabilizing ATAT1, to allow the delivery of autophagosomes in the proximity of the centrosome for efficient fusion with lysosomes (Nowosad *et al.*, 2021). However, MTs is not involved in autophagosome formation in basal autophagy (Mackeh *et al.*, 2013). Although BHRF1-induced MT hyperacetylation has no role in non-selective autophagy, we observed that it is essential for BHRF1 to induce mitophagy since, in the absence of  $\alpha$ -tubulin acetylation, BHRF1 does not induce mitochondrial sequestration into autophagosomes (**Figure 6**). This suggests that formation of the autophagosomal membranes around mitochondria requires acetylated MTs.

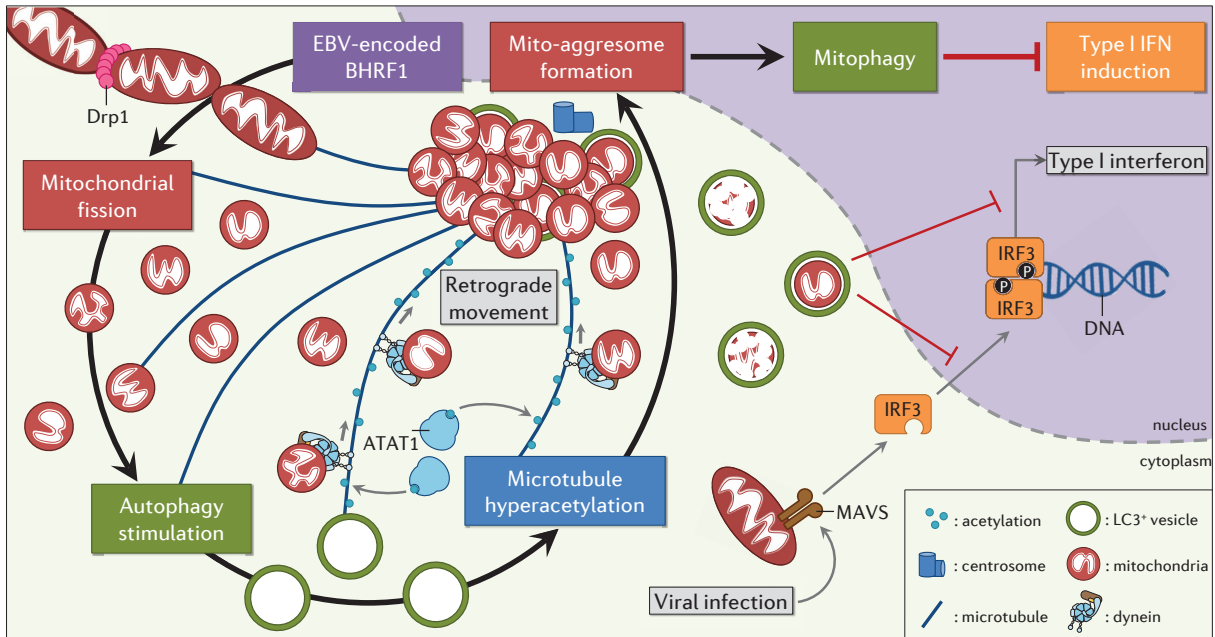
Numerous strategies are used by viruses to counteract or evade the innate immune response. We describe in this study a novel mechanism of a viral immune escape. Indeed, we report that MT hyperacetylation induced by BHRF1 can block IFN production, via mitophagy stimulation. Several proteins expressed by different viruses, such as human parainfluenza virus type 3, influenza A virus (IAV), or Hantaan virus (HTNV), are known to control type I IFN response by stimulating mitophagy (Ding *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019, 2020). The viral glycoprotein (Gn) encoded by HTNV translocates

to mitochondria, induces complete mitophagy which leads to MAVS degradation and subsequently impairs innate immune response (Wang *et al.*, 2020). PB1-F2 is a non-structural IAV-encoded protein constitutively localized to the mitochondrial inner membrane space (Yoshizumi *et al.*, 2014). At mitochondria, the interaction of PB1-F2 with LC3B and mitochondrial TUFM (Tu translation elongation factor) similarly leads to mitophagy induction, MAVS degradation and restrains type I IFN production (Wang *et al.*, 2020). Whether these pro-viral mechanisms depend on the tubulin acetylation level needs to be explored.

The role of MT-dependent mitochondrial movement has been previously described to be involved in the NLRP3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3) inflammasome, a complex that also contributes to antiviral innate immunity by the secretion of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 $\beta$  and 18 (Zhao and Zhao, 2020). Detection of a viral infection or a danger signal can trigger the formation of this inflammasome, which is comprised of NLRP3, the adaptor protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), and the effector protease caspase-1. Mitochondrial dynamics and movement are involved in inflammasome activation, to bring closer the fraction of ASC which resides on the mitochondria to NLRP3, located in the ER under resting conditions. It has been reported that acetylated MTs and dyneins are essential for the relocalization of mitochondria in the perinuclear region and the inflammasome complex formation (Misawa *et al.*, 2013). However, several studies have also reported that the activation of mitophagy can preclude NLRP3 inflammasome formation by preventing the release of mitochondrial DNA and ROS (Mishra *et al.*, 2021; Zhong *et al.*, 2016). The viral protein PB1-F2 negatively regulates the NLRP3 inflammasome (Yoshizumi *et al.*, 2014), and this could be related to its ability to stimulate mitophagy (Wang *et al.*, 2020). The activity of BHRF1 on the inflammasome is currently unknown but EBV encodes an miRNA that targets the *NLRP3* mRNA (Haneklaus *et al.*, 2012).

To conclude, we demonstrated how BHRF1, which is expressed during the early stages of EBV infection and some latency programs associated with lymphomas (Fitzsimmons and Kelly, 2017), reduces innate immunity by manipulating the MT network. We propose a model (**Figure 7**) in which EBV exploits acetylated MTs to change mitochondrial morphodynamics, thereby draining fragmented mitochondria toward the centrosome, segregating them from IFN signaling pathways in mitophagosomes to block IFN production and create an optimal environment for virus replication. We previously showed that BHRF1 expression induces mitochondrial fission activation and subsequently autophagy stimulation (Figure 7). We report here that MT hyperacetylation is downstream of these events. Beyond EBV infection and latency, these findings identify for the first time a role for acetylated MTs in regulating IFN response and innate immunity against viruses





**Figure 7.** Working model. EBV encodes a Bcl-2 homolog that dampens type I IFN induction thanks to MT hyperacetylation. BHRF1 induces Drp1-mediated mitochondrial fission and subsequently autophagy. These cellular modifications lead to the mito-aggresome formation, and we showed here that the MT network and in particular its level of acetylation are essential for this mitochondrial phenotype. Moreover, BHRF1 induces MT hyperacetylation through ATAT1 activation. This hyperacetylation allows the retrograde transport of mitochondria in a dynein-dependent manner. Finally, the sequestration and degradation of mito-aggresomes block innate immunity.

## Materials and methods

### Antibodies

Primary antibodies used in this study included anti- $\beta$ -actin (Merck Millipore, MAB1501), anti-BHRF1 (Merck Millipore, MAB8188), anti-c-Myc (Sigma-Aldrich, M4439), anti-HA (Santa Cruz Biotechnology, sc-9082), anti-IRF3 (Novus Biologicals, SD2062), anti-LC3 (MBL International, PM036 and M151-3B), anti-pericentrin (Sigma-Aldrich, HPA016820), anti-TOM20 (BD Biosciences, 612278), anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich, T6199) and anti-acetyl- $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich, T6793). Secondary antibodies used in this study included Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit, anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, 111-545-003, 115-545-003), Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit, anti-mouse (Life technology, A21428, A21424), Alexa Fluor 647 donkey anti-rabbit, anti-mouse (Life technology, A31573, 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).

### Cell culture and transfection

HeLa and HEK293T cells were cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Gibco, 41965-039) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Dominique Dutscher, S181B-500).

DNA plasmid transfections were performed using Fugene HD transfection reagent (Promega Corporation, E2311) according to the manufacturer's protocol. One day prior to transfection, cells were seeded in 24-well plates and incubated at 37°C. On the day of transfection, DNA plasmids were dispersed in opti-MEM (Gibco, 31985-047) and Fugene HD was added to the mix (ratio DNA:Fugene equals 1:3). After incubation for 10 min at room temperature (RT), the transfection mix was added to the cells. Then cells were incubated at 37°C and 6 h post-transfection, DMEM supplemented with 10% FCS was added. Depending on the expression plasmids, cells were fixed 24 h or 48 h post-transfection.

### Extinction of ATAT1 expression

To deplete ATAT1 in HeLa cells, we performed transfection of siRNA directed against ATAT1 encoding mRNA (or non-relevant siRNA as control). We used ON-TARGETplus siRNAs from Dharmacon as a pool of four siRNAs: 5-GUAGCUAGGUCCCGAUUAUA-3; 5-GAGUAUAGCUAGAUCUUU-3; 5-GGGAAACUCACCAGAA CGA-3; and 5-CUUGUGAGAUUGUCGAGAU-3. The transfections of siRNA were performed using Oligofectamine reagent (Thermo Fisher Scientific; 12.252.011) according to the manufacturer's protocol and were repeated at days 1, 2, and 3 at a final concentration of 100 nM. At the end of day 3, transfection with BHRF1-HA was also performed using Fugene HD transfection reagent as described above. Cells were then used at day 4 for immunoblotting or immunofluorescence analyses.

### ***In vitro* tubulin deacetylation assay**

Cell lysates of control cells or cells transfected with BHRF1-HA plasmids were prepared using 10 mM Tris buffer pH 8.0, supplemented with 1% Triton, 1 mM NAD<sup>+</sup>, and the protease inhibitor cocktail. Lysate aliquots containing 20 µg of proteins were mixed with 2 µg of soluble acetylated tubulin dimers purified from porcine brain (Mackeh *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 1988) and adjusted to 50 µL with NAD<sup>+</sup>-containing PEM buffer (80 mM PIPES, 2 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>). After 1 h at 37°C, reactions were stopped by adding 4X SDS-PAGE sample buffer and immediately subjected to SDS-PAGE and Western blotting of acetylated and total α-tubulin.

### **Immunoblot analysis**

Cells were lysed in lysis buffer (65 mM Tris, pH 6.8, 4% SDS, 1.5% β-mercaptoethanol, and a cocktail of protease/phosphatase inhibitors) and kept at 100°C for 10 min. Protein extracts were resolved on SDS-PAGE (12.5%) and electro-transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Amersham, 10600002). After 1h of incubation in blocking buffer (PBS, 0.1% Tween20, and 5% BSA or nonfat dry milk), the membranes were probed overnight at 4°C with primary antibodies. Horseradish peroxidase-labeled antibodies were used as secondary antibody, and revelation was performed using the ECL detection system according to the manufacturer's instructions (Merck Millipore, WBKLS0500). Scanning for quantification of protein levels was monitored using ImageJ software. An anti-β-actin antibody was used to ensure equal loadings and normalize quantification.

### **Immunofluorescence analysis**

For all indirect immunofluorescence, cells were cultured on glass coverslips in 24-well plates. Cell monolayers were washed with PBS and cells were fixed with paraformaldehyde (PFA; 4%) in PBS or methanol, depending on the antibodies. The cells were treated with PBS containing NH<sub>4</sub>Cl (50 mM) for 10 min, permeabilized using PBS, Triton X-100 (0.2%) for 4 min, washed twice with PBS and then incubated for 1 h in PBS, gelatin (0.2%) supplemented with FCS (5%) for blocking. Then the cells were incubated for 1 h with the appropriate primary antibody diluted in PBS, gelatin (0.2%) at RT. Cells were washed three times with PBS and then incubated with the appropriate secondary antibody diluted in PBS, gelatin (0.2%) for 1 h at RT. After washing, the nuclei were counterstained with DAPI. Coverslips were mounted in Glycergel (Agilent Dako, C056330-2) and observed using a Nikon Eclipse 80i epifluorescence microscope (Nikon Instruments) or a Leica TCS SP8 X inverted confocal microscope (Leica, USA). Photographic images were resized, organized, and labeled using Fiji-ImageJ software or LAS AF Lite. Imaris software was also used to perform 3D reconstruction video.

A specific procedure was performed for the colocalization study between mitochondria and autophagosomes. Permeabilization and blocking were performed by incubating the cells for 30 min

with PBS, saponin (0.075%; Sigma-Aldrich, 84,510), BSA (1%), and FCS (5%). Antibodies were diluted in PBS, saponin (0.075%), and BSA (1%). In addition, between each antibody incubation, cells were washed twice in PBS, saponin (0.075%), BSA (1%), once with PBS, saponin (0.037%), BSA (0.5%) and twice in PBS. Other steps were the same as described above.

### **Luciferase reporter assays to assess IFN- $\beta$ promoter activity**

HEK293T cells were cultured in 24-well plates and transfected for 24 h using Fugene HD, with plasmids encoding the IFN- $\beta$  luciferase reporter (firefly luciferase; 100 ng), pRL-TK (renilla luciferase; 25 ng), p $\Delta$ RIG-I (2xCARD) (encoding a positive dominant form of RIG-I; 150 ng), plasmids expressing BHRF1-HA (or EV as control; 150 ng) and mCherry-Tub (WT or K40A; 150 ng). One day after transfection, cells were lysed and measurement of firefly and renilla luciferase activities was performed using the dual-luciferase reporter assay system (Promega Corporation, E1910) according to the manufacturer's protocol. Relative expression levels were calculated by dividing the firefly luciferase values by those of renilla luciferase and normalized to the control condition (without BHRF1-HA expression).

### **Microtubules depolymerization and repolymerization**

To depolymerize MTs, HeLa cells were seeded directly onto glass coverslips and incubated one day before being transfected to express BHRF1. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with 10  $\mu$ M nocodazole (Sigma-Aldrich, M1404) for 2 h at 37°C then 1.5 h at 4°C, to depolymerize the MT network. Cells were immediately PFA 4% fixed and then methanol-permeabilized (t = 0 h before repolymerization). MTs and mitochondria were visualized by immunostaining of  $\alpha$ -tubulin and TOM20, respectively. To allow reassembly of the MT network, nocodazole was removed by repeated washes with PBS, and cells were left 1 h in warm complete medium (t = 1 h after MTs regrowth). Cells were then immunostained for BHRF1, TOM20, and  $\alpha$ -tubulin.

### **Mitochondrial phenotype assessment**

BHRF1-induced mito-aggresomes were scored by measuring the CI of mitochondrial staining, as we previously described (Vilmen *et al.*, 2020), based on Narendra *et al.* study (Narendra *et al.*, 2010). We arbitrarily determined that a cell presents a mito-aggresome when the CI is above 0.4. The percentage of cells presenting a mito-aggresome was determined by counting at least 20 random cells in each condition from three independent experiments.

Mitochondrial morphology was assessed by measuring AR and FF, which are indicators of mitochondrial length and branching, respectively. These parameters were quantified as described before (Koopman *et al.*, 2006). Briefly, on Fiji-ImageJ software, images of mitochondria were convolved using the matrix developed by Koopman, then a threshold was applied to isolate mitochondria from background. Then cell outline was drawn and mitochondrial phenotype was assessed by the

implement analysis particle tool. The AR value is given by the software and corresponds to the ratio between the major and minor axis of the ellipsis equivalent to the mitochondria. The FF value is defined as  $(P_{mit}^2)/(4\pi A_{mit})$ , where  $P_{mit}$  is the length of mitochondrial outline and  $A_{mit}$  is the area of mitochondria. The mitochondrial fission parameters were determined by analyzing at least 15 random cells in each condition from three independent experiments.

### Plasmids

We previously described the BHRF1-HA expression vector (Vilmen *et al.*, 2020), which was constructed from a pcDNA3.1 expression vector (EV) purchased from Invitrogen (V79020). The mCherry- $\alpha$ -tubulin WT-K40K control vector was kindly provided by Dr. R. Y. Tsien (Department of Pharmacology, Howard Hughes Medical Center, University of San Diego, USA) (Shaner *et al.*, 2004) and the mutated vector (mCherry- $\alpha$ -tubulin K40A) was a kind gift from Dr. F. Saudou (Institut Curie, Orsay, France) (Dompierre *et al.*, 2007). The plasmids Flag- $\Delta$ RIG-I (2xCARD) and pFN- $\beta$ -Luc were previously described respectively (Yoneyama *et al.*, 2004, 1996) and kindly provided by Dr. C. Lagaudrière (I2BC, Gif-sur-Yvette, France). The plasmid pRL-TK was purchased from Promega Corporation (E2241). The p50-dynamitin construct was a gift from Dr. S. Etienne-Manneville (Institut Pasteur, Paris, France) (Etienne-Manneville and Hall, 2001).

### Reagents

MitoTracker Red CMXRos was purchased from Life Technologies (M7512) and used at 100 nM for 30 min before cell fixation to stain the mitochondrial network. Phalloidin–Tetramethylrhodamine B isothiocyanate was purchased from Sigma-Aldrich (P1951) and used at 20  $\mu$ g/mL during 1 h to stain F-actin. DAPI was purchased from Thermo Fisher Scientific (D1306) and used at 300 nM to stain dsDNA (nuclei). Nocodazole was purchased from Sigma-Aldrich (M1404) and used at 10  $\mu$ M to disrupt the MT network. Ciliobrevin D was purchased from Sigma-Aldrich (250401) and used at 40  $\mu$ M overnight to inhibit cytosolic dyneins. Cytochalasin B was purchased from Sigma-Aldrich (C6762) and used at 10  $\mu$ g/mL for 30 min to disrupt F-actin. Autophagic flux was monitored by the addition of chloroquine (Sigma-Aldrich, C6628) at 50  $\mu$ M for 2 to 4 h. To inhibit autophagy, we used two different ways: cells were treated either with 3-MA (Sigma-Aldrich, M9281) at 5 mM for 8 h or by spautin-1 (Sigma-Aldrich, SML0440) at 20  $\mu$ M for 8 h.

### Results quantification

The number of endogenous LC3 dots per cell was determined using Fiji-ImageJ software. All images were taken with the same microscope settings to allow for comparison. Images were converted into 8-bit. Cells' outlines were drawn and nuclei cropped to conserve only the cytoplasm. A thresholding of images was performed to detect only LC3 vesicles. Note that the value of the threshold was conserved

and used for each analyzed cell. Finally, the “analyze particles” plug-in was used to count the total number of LC3 dots per cell. For each condition, at least 25 cells were analyzed in three independent experiments.

The colocalization degree between mitochondrial staining and autophagosomes staining was assessed by measuring Manders split coefficient using the “colocalization threshold” plug-in on Fiji-ImageJ software. For each condition, 30 random cells were analyzed.

The proportion of cells presenting an IRF3 nuclear localization was determined by counting at least 50 random cells in each condition from three independent experiments.

### Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) and were analyzed with Prism software (GraphPad) by using Student’s t-test. P values less than 0.05 were considered statistically significant. Data from three independent experiments were analysed.

### Acknowledgments

We would like to thank for her technical assistance Valérie Nicolas (Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France) from the MIPSIT cellular imaging facility. Also, the present work has benefited from the core facilities of Imagerie-Gif, (<http://www.i2bc.paris-saclay.fr>), member of IBISA (<http://www.ibisa.net>), supported by “France-BioImaging” (ANR- 10-INBS-04-01), and the Labex “Saclay Plant Science” (ANR-11- IDEX-0003-02). Finally, we thank Stephanie Straubel for critical reading of the manuscript.

### Additional information

#### Funding

| Funder                                      | Grand reference number | Author           |
|---|------------------------|------------------|
| CNRS, Univ Paris-Sud, DIM MALINF Région IDF | N/A                    | Géraldine Vilmen |
| Agence Nationale de la Recherche            | ANR-14-CE14-0022       | Audrey Esclatine |

The authors declare that the funders had no role in study design, data collection or interpretation, or the decision to submit the work for publication.

#### Author contributions

DG, GV, DP, conception and design, investigation, formal analysis, writing original draft; EH, investigation, formal analysis; GB, formal analysis, writing original draft, VM, formal analysis, funding acquisition, supervision; CP, formal analysis, provided materials; ML, conception and design, formal



analysis, writing original draft, supervision; AE, conception and design, formal analysis, funding acquisition, writing original draft, supervision.

### Authors ORCIDs

Damien Glon : <https://orcid.org/0000-0001-8405-8805>

Guillaume Beauclair : <https://orcid.org/0000-0001-5323-5987>

Vincent Maréchal : <https://orcid.org/0000-0003-2689-6266>

Christian Poüs : <https://orcid.org/0000-0002-2502-7854>

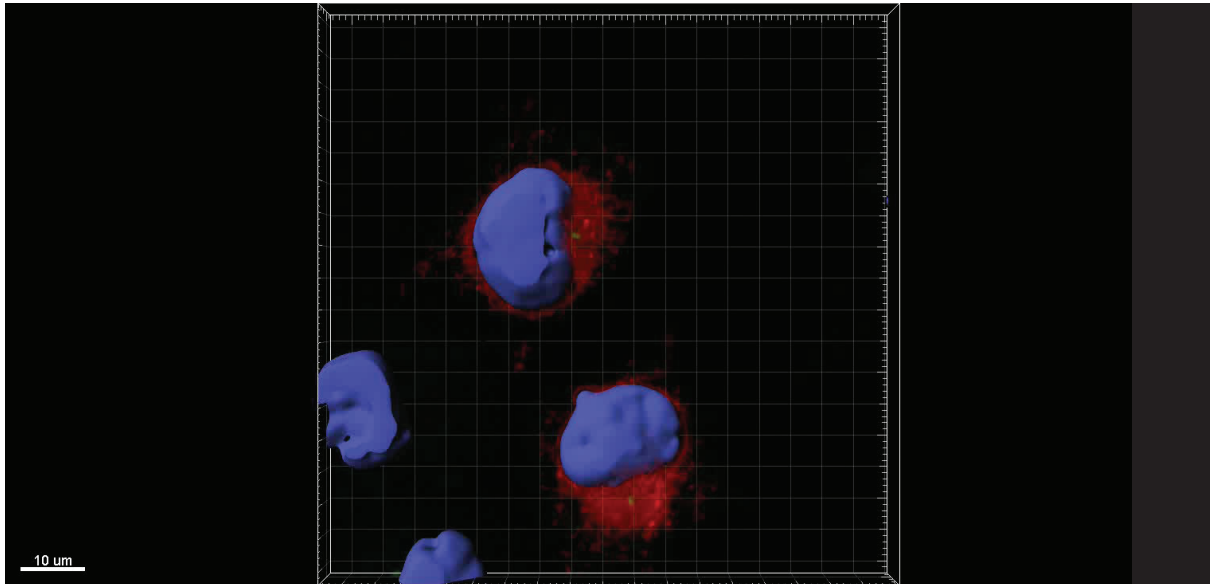
Marion Lussignol : <https://orcid.org/0000-0001-7586-2041>

### Data availability

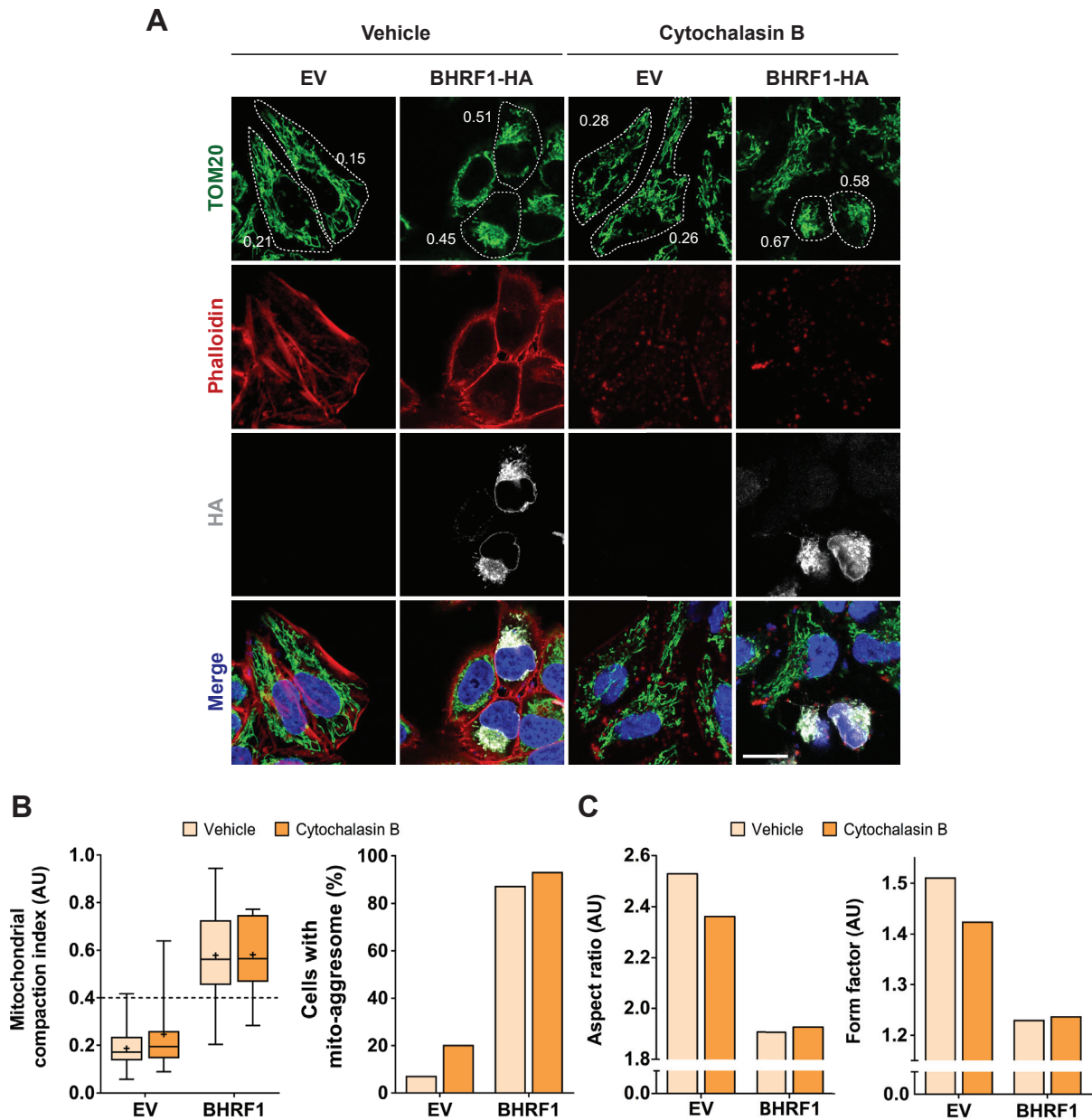
All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

### Supplementary files

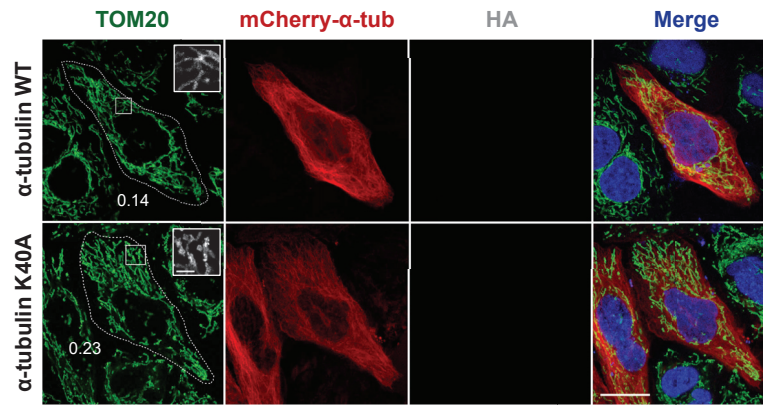
- Supplementary file 1. BHRF1 localizes in proximity of the centrosome.
- Supplementary file 2. The actin network is not involved in the formation of BHRF1-induced mito-aggresomes.
- Supplementary file 3. Expression of the non-acetylatable  $\alpha$ -tubulin K40A does not impact mitochondrial network.
- Supplementary file 4. Dyneins inhibition prevents BHRF1-induced mito-aggresomes.
- Supplementary file 5. BHRF1 stimulates autophagy when  $\alpha$ -tubulin WT is expressed, and autophagy is required to MT hyperacetylation.
- Supplementary file 6. Full-length western-blot.



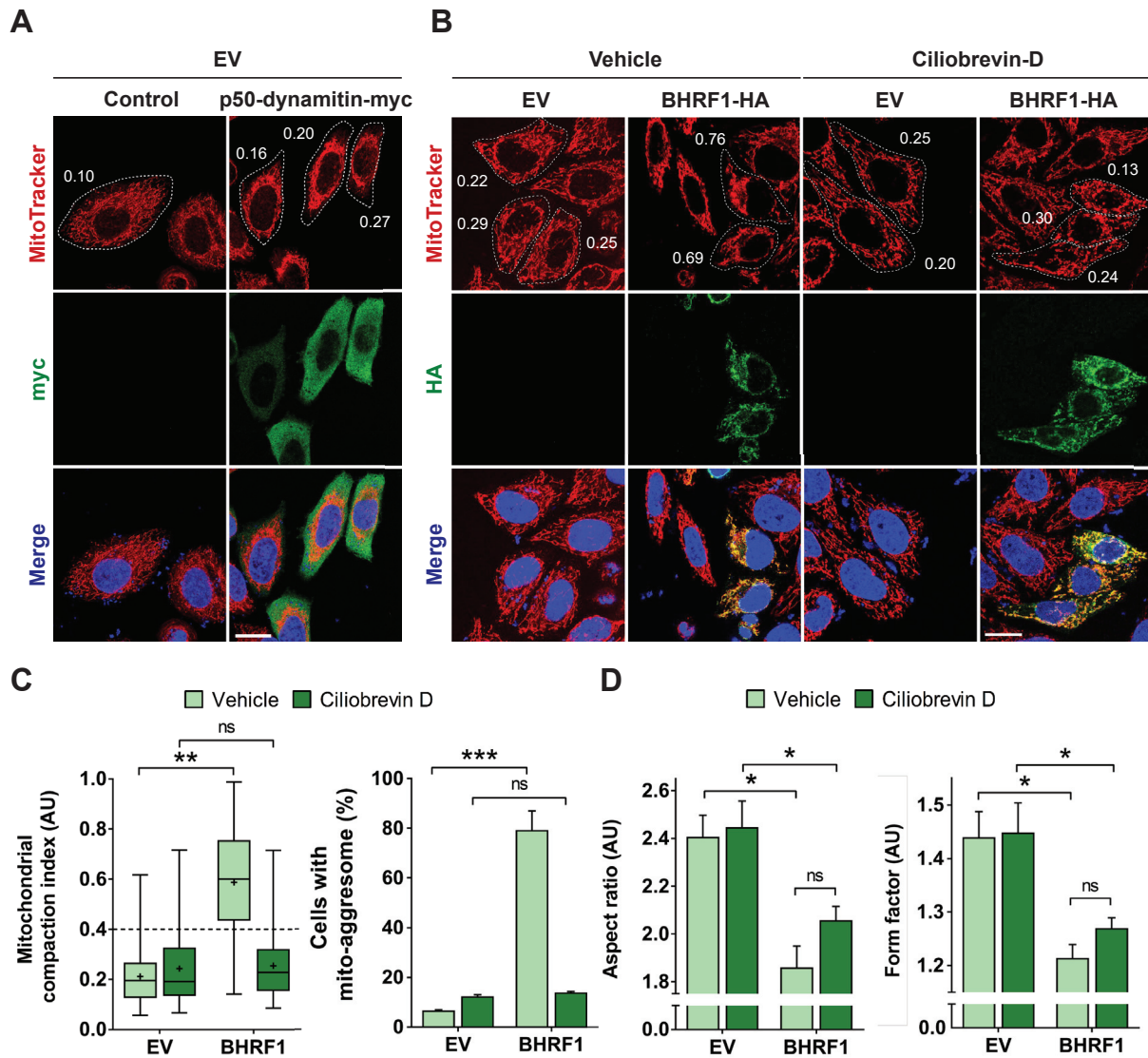
**Supplementary file 1.** BHRF1 localizes in proximity of the centrosome. 3D Imaparis surface reconstruction video of BHRF1-HA-transfected HeLa cells immunostained for pericentrin (centrosomal marker – green) and HA (BHRF1 – red). Nuclei were subsequently stained with DAPI. Scale bar: 10 μm.



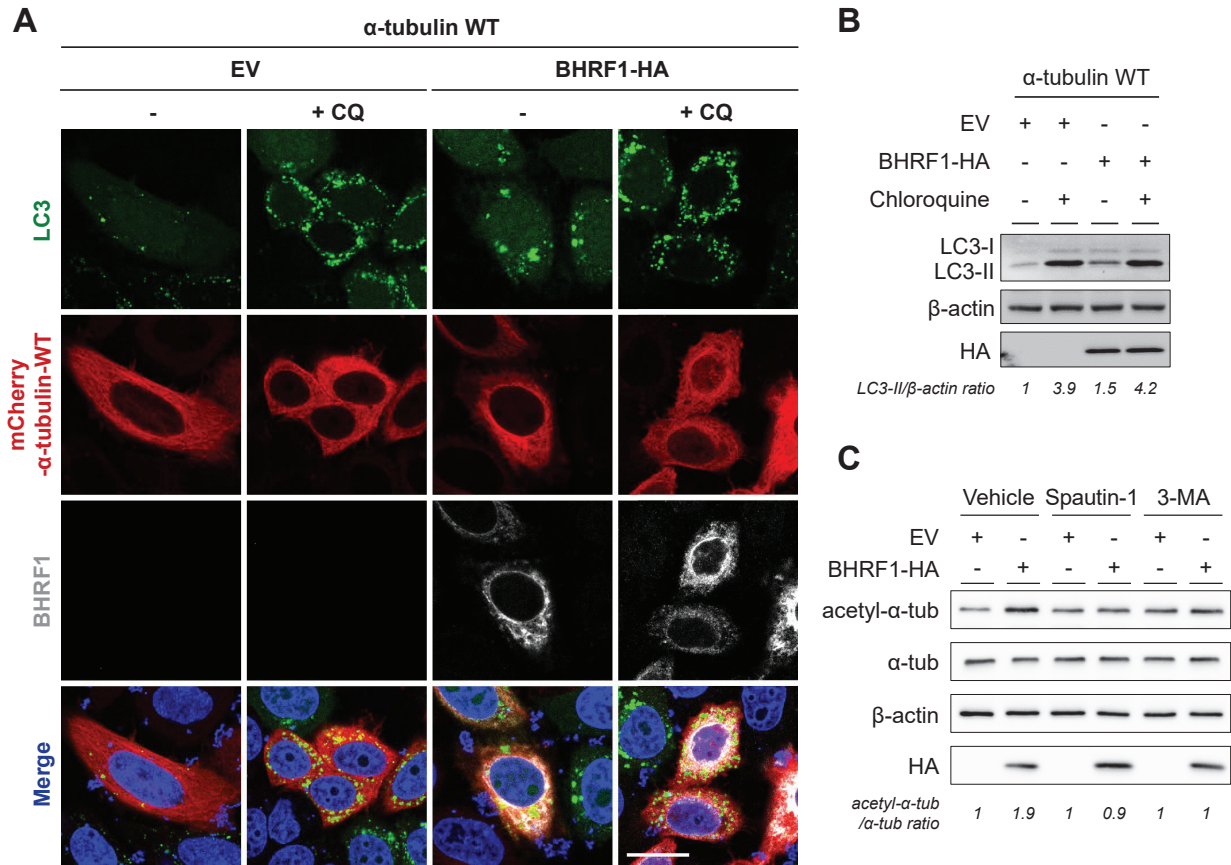
**Supplementary file 2.** The actin network is not involved in the formation of BHRF1-induced mito-aggregates. **(A-C)** HeLa cells were transfected with BHRF1-HA plasmid (or EV) for 24 h. For the final 30 min, cells were treated with cytochalasin B (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to disrupt the F-actin network and then were fixed. **(A)** Confocal images. Cells were immunostained for TOM20 and HA. The F-actin network was labeled with phalloidin, and the efficiency of the treatment with cytochalasin B was confirmed by the loss of F-actin staining. Nuclei were stained with DAPI. Values of mitochondrial CI are indicated on representative cells. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ . **(B)** Quantification of CI and cells with mito-aggregates ( $n = 20$  cells). **(C)** Quantification of mitochondrial fission parameters ( $n = 20$  cells).



**Supplementary file S3.** Expression of the non-acetylatable  $\alpha$ -tubulin K40A does not impact mitochondrial network. Confocal images of HeLa cells co-transfected with plasmids encoding EV and either mCherry- $\alpha$ -tubulin WT (K40K) or a mutated form (K40A). Mitochondria were immunostained with an anti-TOM20 antibody. Nuclei were stained with DAPI. Insets (3X) are shown to better observe the mitochondrial phenotype. Scale bars: 10  $\mu$ m and 4  $\mu$ m for insets. Values of mitochondrial CI are indicated on representative cells.

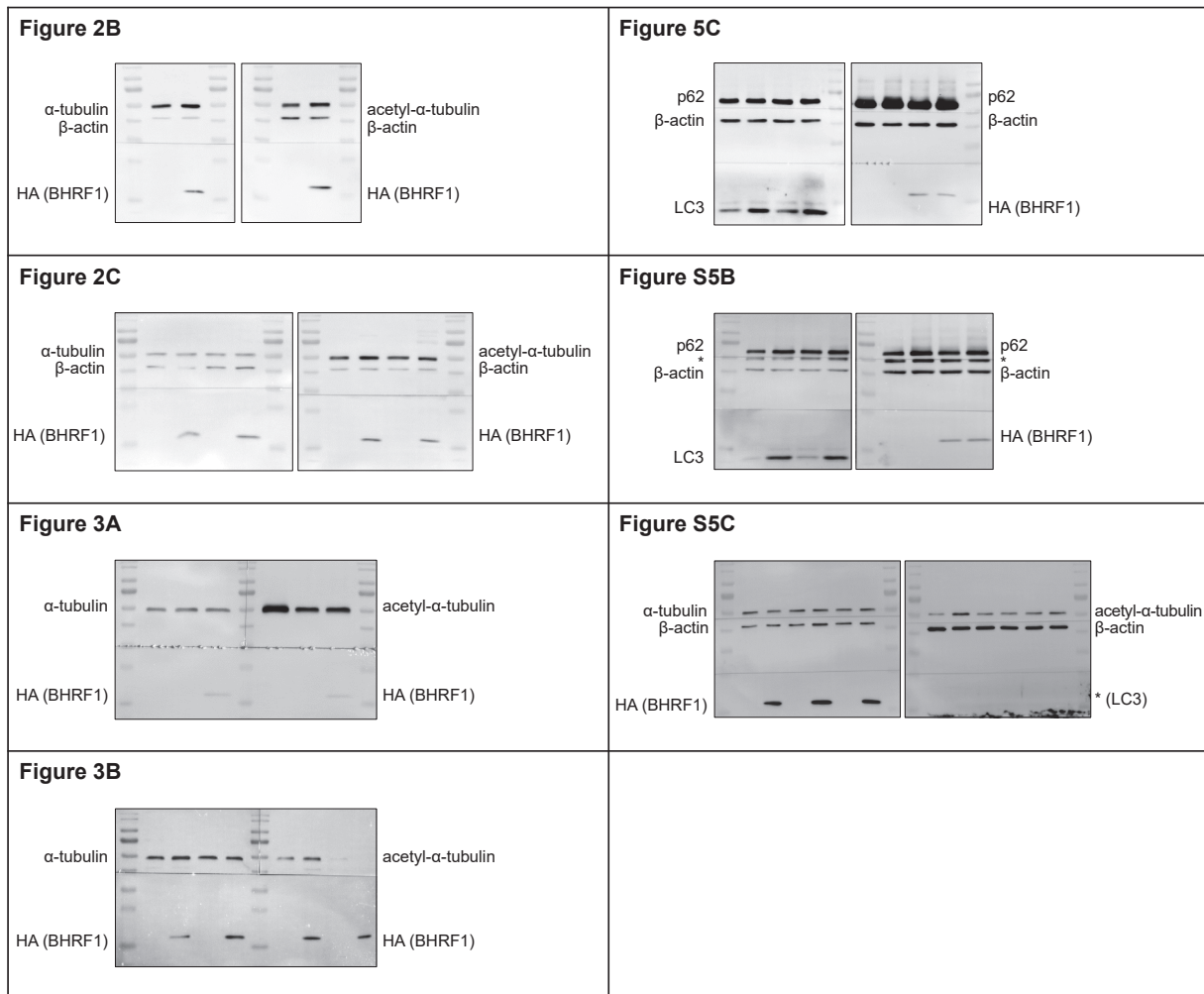


**Supplementary file 4.** Dyneins' inhibition prevents BHRF1-induced mito-aggresomes. **(A)** Expression of p50-dynamitin-myc does not impact the mitochondrial network. Confocal images of HeLa cells co-transfected with plasmids encoding EV and p50-dynamitin-myc (or control) for 24 h. Mitochondria were labeled with MitoTracker CMXRos, and cells were immunostained for c-myc. Nuclei were stained with DAPI. Values of mitochondrial CI are indicated on representative cells. Scale bar: 20  $\mu$ m. **(B-D)** HeLa cells were transfected with BHRF1-HA plasmid (or EV) and treated overnight with ciliobrevin D (40  $\mu$ M). Cells were then fixed 24 h post-transfection. **(A)** Confocal images. Mitochondria were labeled with MitoTracker CMXRos, cells were immunostained for HA and nuclei were stained with DAPI. Values of mitochondrial CI are indicated on representative cells. Scale bar: 20  $\mu$ m. **(C)** Quantification of CI and cells with mito-aggresomes (n = 20 cells). **(D)** Quantification of mitochondrial fission parameters (n = 20 cells). Data represent the mean  $\pm$  SEM of two independent experiments. ns = non-significant; \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001 (one-way ANOVA test).



**Supplementary file 5.** BHRF1 stimulates autophagy when  $\alpha$ -tubulin WT is expressed, and autophagy is required for MT hyperacetylation. (**A and B**) HeLa cells co-transfected for 24 h with plasmids encoding BHRF1-HA (or EV) and mCherry- $\alpha$ -tubulin WT. Cells were treated with CQ when indicated. (**A**) Confocal images. Cells were immunostained for BHRF1 and LC3 and nuclei were stained with DAPI. Scale bar: 20  $\mu$ m. (**B**) Immunoblot analysis of LC3 and BHRF1-HA expression.  $\beta$ -actin was used as loading control. (**C**) Immunoblot analysis of acetyl and total  $\alpha$ -tubulin of HeLa cells transfected by BHRF1 (or EV) and treated or not by autophagic inhibitors (3-MA or Spautin-1).





Supplementary file 6. Full-length western-blot

## References

- Arnoult D, Soares F, Tattoli I, Girardin SE. 2011. Mitochondria in innate immunity. *EMBO Rep* **12**:901–910. doi:10.1038/embor.2011.157
- Castanier C, Garcin D, Vazquez A, Arnoult D. 2010. Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Rep* **11**:133–138. doi:10.1038/embor.2009.258
- Chatel-Chaix L, Cortese M, Romero-Brey I, Bender S, Neufeldt CJ, Fischl W, Scaturro P, Schieber N, Schwab Y, Fischer B, Ruggieri A, Bartenschlager R. 2016. Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell Host Microbe* **20**:342–356. doi:10.1016/j.chom.2016.07.008
- De Vos KJ, Allan VJ, Grierson AJ, Sheetz MP. 2005. Mitochondrial Function and Actin Regulate Dynamin-Related Protein 1-Dependent Mitochondrial Fission. *Curr Biol* **15**:678–683. doi:10.1016/j.cub.2005.02.064
- Desbien AL, Kappler JW, Marrack P. 2009. The Epstein-Barr virus Bcl-2 homolog, BHRF1, blocks apoptosis by binding to a limited amount of Bim. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:5663–5668. doi:10.1073/pnas.0901036106
- Detmer SA, Chan DC. 2007. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:870–879. doi:10.1038/nrm2275
- Ding B, Zhang L, Li Z, Zhong Y, Tang Q, Qin Y, Chen M. 2017. The Matrix Protein of Human Parainfluenza Virus Type 3 Induces Mitophagy that Suppresses Interferon Responses. *Cell Host & Microbe* **21**:538–547.e4. doi:10.1016/j.chom.2017.03.004
- Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelieres FP, King SJ, Humbert S, Saudou F. 2007. Histone Deacetylase 6 Inhibition Compensates for the Transport Deficit in Huntington's Disease by Increasing Tubulin Acetylation. *J Neurosci* **27**:3571–3583. doi:10.1523/JNEUROSCI.0037-07.2007
- Eshun-Wilson L, Zhang R, Portran D, Nachury MV, Toso DB, Löhr T, Vendruscolo M, Bonomi M, Fraser JS, Nogales E. 2019. Effects of  $\alpha$ -tubulin acetylation on microtubule structure and stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**:10366–10371. doi:10.1073/pnas.1900441116
- Esteves AR, Palma AM, Gomes R, Santos D, Silva DF, Cardoso SM. 2019. Acetylation as a major determinant to microtubule-dependent autophagy: Relevance to Alzheimer's and Parkinson disease pathology. *Biochim Biophys Acta, Post-Translational Modifications In Brain Health And Disease* **1865**:2008–2023. doi:10.1016/j.bbadis.2018.11.014
- Etienne-Manneville S, Hall A. 2001. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC $\zeta$ . *Cell* **106**:489–498. doi:10.1016/s0092-8674(01)00471-8
- Fitzsimmons L, Kelly G. 2017. EBV and Apoptosis: The Viral Master Regulator of Cell Fate? *Viruses* **9**:339–373. doi:10.3390/v9110339
- Fransson Å, Ruusala A, Aspenström P. 2006. The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* **344**:500–510. doi:10.1016/j.bbrc.2006.03.163
- Frederick RL, Shaw JM. 2007. Moving Mitochondria: Establishing Distribution of an Essential Organelle. *Traffic* **8**:1668–1675. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00644.x
- Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. 2011. ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science* **334**:358–362. doi:10.1126/science.1207385
- Friedman JR, Webster BM, Mastronarde DN, Verhey KJ, Voeltz GK. 2010. ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J Cell Biol* **190**:363–375. doi:10.1083/jcb.200911024
- Geeraert C, Ratier A, Pfisterer SG, Perdiz D, Cantaloube I, Rouault A, Pattingre S, Proikas-Cezanne T, Codogno P, Poüs C. 2010. Starvation-induced Hyperacetylation of Tubulin Is Required for the Stimulation of Autophagy by Nutrient Deprivation. *J Biol Chem* **285**:24184–24194. doi:10.1074/jbc.M109.091553

- Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L. 2020. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**:204–224. doi:10.1038/s41580-020-0210-7
- Green DR, Levine B. 2014. To Be or Not to Be? How Selective Autophagy and Cell Death Govern Cell Fate. *Cell* **157**:65–75. doi:10.1016/j.cell.2014.02.049
- Hancock WO. 2014. Bidirectional cargo transport: moving beyond tug of war. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**:615–628. doi:10.1038/nrm3853
- Haneklaus M, Gerlic M, Kurowska-Stolarska M, Rainey A-A, Pich D, McInnes IB, Hammerschmidt W, O'Neill LAJ, Masters SL. 2012. Cutting Edge: miR-223 and EBV miR-BART15 Regulate the NLRP3 Inflammasome and IL-1 $\beta$  Production. *J Immunol* **189**:3795–3799. doi:10.4049/jimmunol.1200312
- Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang X-F, Yao T-P. 2002. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**:455–458. doi:10.1038/417455a
- Janke C, Magiera MM. 2020. The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**:307–326. doi:10.1038/s41580-020-0214-3
- Janke C, Montagnac G. 2017. Causes and Consequences of Microtubule Acetylation. *Curr Biol* **27**:1287–1292. doi:10.1016/j.cub.2017.10.044
- Kaufmann T, Kukolj E, Brachner A, Beltzung E, Bruno M, Kostrhon S, Opravil S, Hudecz O, Mechtler K, Warren G, Slade D. 2016. SIRT2 regulates nuclear envelope reassembly through ANKLE2 deacetylation. *J Cell Sci* **129**:4607–4621. doi:10.1242/jcs.192633
- Khanim F, Mackett M, Young LS, Dawson J, Meseda CA, Dawson C. 1997. BHRF1, a viral homologue of the Bcl-2 oncogene, is conserved at both the sequence and functional level in different Epstein-Barr virus isolates. *J Gen Virol* **78**:2987–2999. doi:10.1099/0022-1317-78-11-2987
- Köchli R, Hu XW, Chan EYW, Tooze SA. 2006. Microtubules Facilitate Autophagosome Formation and Fusion of Autophagosomes with Endosomes: Role of Microtubules in AV Formation. *Traffic* **7**:129–145. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00368.x
- Koopman WJH, Visch H-J, Smeitink JAM, Willems PHGM. 2006. Simultaneous quantitative measurement and automated analysis of mitochondrial morphology, mass, potential, and motility in living human skin fibroblasts. *Cytometry Part A* **69A**:1–12. doi:10.1002/cyto.a.20198
- Kruppa AJ, Buss F. 2021. Motor proteins at the mitochondria-cytoskeleton interface. *J Cell Sci* **134**:1–13. doi:10.1242/jcs.226084
- Kvansakul M, Wei AH, Fletcher JI, Willis SN, Chen L, Roberts AW, Huang DCS, Colman PM. 2010. Structural Basis for Apoptosis Inhibition by Epstein-Barr Virus BHRF1. *PLoS Pathog* **6**:e1001236. doi:10.1371/journal.ppat.1001236
- Lee AJ, Ashkar AA. 2018. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Front Immunol* **9**:2061–2070. doi:10.3389/fimmu.2018.02061
- Lee J-Y, Nagano Y, Taylor JP, Lim KL, Yao T-P. 2010. Disease-causing mutations in Parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *J Cell Biol* **189**:671–679. doi:10.1083/jcb.201001039
- Li L, Yang X-J. 2015. Tubulin acetylation: responsible enzymes, biological functions and human diseases. *Cell Mol Life Sci* **72**:4237–4255. doi:10.1007/s00018-015-2000-5
- López-Doménech G, Covill-Cooke C, Ivankovic D, Halff EF, Sheehan DF, Norkett R, Birsa N, Kittler JT. 2018. Miro proteins coordinate microtubule- and actin-dependent mitochondrial transport and distribution. *EMBO J* **37**:321–336. doi:10.15252/embj.201696380
- Luo S, Garcia-Arencibia M, Zhao R, Puri C, Toh PPC, Sadiq O, Rubinsztein DC. 2012. Bim inhibits autophagy by recruiting Beclin 1 to microtubules. *Mol Cell* **47**:359–370. doi:10.1016/j.molcel.2012.05.040
- Mackeh R, Lorin S, Ratier A, Mejdoubi-Charef N, Baillet A, Bruneel A, Hamaï A, Codogno P, Poüs C, Perdiz D. 2014. Reactive Oxygen Species, AMP-activated Protein Kinase, and the Transcription Cofactor p300 Regulate  $\alpha$ -Tubulin Acetyltransferase-1 ( $\alpha$ TAT-1/MEC-17)-dependent Microtubule Hyperacetylation during Cell Stress. *J Biol Chem* **289**:11816–11828. doi:10.1074/jbc.M113.507400

- Mackeh R, Perdiz D, Lorin S, Codogno P, Pous C. 2013. Autophagy and microtubules - new story, old players. *J Cell Sci* **126**:1071–80. doi:10.1242/jcs.115626
- Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T, Akira S. 2013. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol* **14**:454–460. doi:10.1038/ni.2550
- Mishra SR, Mahapatra KK, Behera BP, Patra S, Bhol CS, Panigrahi DP, Praharaj PP, Singh A, Patil S, Dhiman R, Bhutia SK. 2021. Mitochondrial dysfunction as a driver of NLRP3 inflammasome activation and its modulation through mitophagy for potential therapeutics. *Int J Biochem Cell Biol* **136**:106013–106021. doi:10.1016/j.biocel.2021.106013
- Narendra D, Kane LA, Hauser DN, Fearnley IM, Youle RJ. 2010. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy* **6**:1090–1106. doi:10.4161/auto.6.8.13426
- North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E. 2003. The Human Sir2 Ortholog, SIRT2, Is an NAD<sup>+</sup>-Dependent Tubulin Deacetylase. *Mol Cell* **11**:437–444. doi:10.1016/s1097-2765(03)00038-8
- Nowosad A, Creff J, Jeannot P, Culerrier R, Codogno P, Manenti S, Nguyen L, Besson A. 2021. p27 controls autophagic vesicle trafficking in glucose-deprived cells via the regulation of ATAT1-mediated microtubule acetylation. *Cell Death Dis* **12**:1–18. doi:10.1038/s41419-021-03759-9
- Pagliuso A, Cossart P, Stavru F. 2018. The ever-growing complexity of the mitochondrial fission machinery. *Cell Mol Life Sci* **75**:355–374. doi:10.1007/s00018-017-2603-0
- Perdiz D, Lorin S, Leroy-Gori I, Poüs C. 2017. Stress-induced hyperacetylation of microtubule enhances mitochondrial fission and modulates the phosphorylation of Drp1 at 616 Ser. *Cell Signalling* **39**:32–43. doi:10.1016/j.cellsig.2017.07.020
- Perdiz D, Mackeh R, Poüs C, Baillet A. 2011. The ins and outs of tubulin acetylation: More than just a post-translational modification? *Cell Signalling* **23**:763–771. doi:10.1016/j.cellsig.2010.10.014
- Portran D, Schaedel L, Xu Z, Théry M, Nachury MV. 2017. Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nat Cell Biol* **19**:391–398. doi:10.1038/ncb3481
- Puthalakath H, Huang DCS, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. 1999. The Proapoptotic Activity of the Bcl-2 Family Member Bim Is Regulated by Interaction with the Dynein Motor Complex. *Mol Cell* **3**:287–296. doi:10.1016/S1097-2765(00)80456-6
- Reed NA, Cai D, Blasius TL, Jih GT, Meyhofer E, Gaertig J, Verhey KJ. 2006. Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport. *Curr Biol* **16**:2166–2172. doi:10.1016/j.cub.2006.09.014
- Roberts AJ, Kon T, Knight PJ, Sutoh K, Burgess SA. 2013. Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**:713–726. doi:10.1038/nrm3667
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**:1567–1572. doi:10.1038/nbt1037
- Shida T, Cueva JG, Xu Z, Goodman MB, Nachury MV. 2010. The major  $\alpha$ -tubulin K40 acetyltransferase  $\alpha$ TAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:21517–21522. doi:10.1073/pnas.1013728107
- Singh PK, Weber A, Häcker G. 2018. The established and the predicted roles of dynein light chain in the regulation of mitochondrial apoptosis. *Cell Cycle* **17**:1037–1047. doi:10.1080/15384101.2018.1464851
- Tang B. 2018. Miro—Working beyond Mitochondria and Microtubules. *Cells* **7**:18–24. doi:10.3390/cells7030018
- Vilmen G, Glon D, Siracusano G, Lussignol M, Shao Z, Hernandez E, Perdiz D, Quignon F, Mouna L, Poüs 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* **17**:1296–1315. doi:10.1080/15548627.2020.1758416

- Walker RA, O'Brien E. T, Pryer NK, Soboeiro MF, Voter WA, Erickson HP, Salmon ED. 1988. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol* **107**:1437–1448. doi:10.1083/jcb.107.4.1437
- Wang K, Ma H, Liu H, Ye W, Li Z, Cheng L, Zhang L, Lei Y, Shen L, Zhang F. 2019. The Glycoprotein and Nucleocapsid Protein of Hantaviruses Manipulate Autophagy Flux to Restrain Host Innate Immune Responses. *Cell Reports* **27**:2075–2091.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.04.061
- Wang R, Zhu Y, Ren C, Yang S, Tian S, Chen H, Jin M, Zhou H. 2020. Influenza A virus protein PB1-F2 impairs innate immunity by inducing mitophagy. *Autophagy* 1–16. doi:10.1080/15548627.2020.1725375
- West AP, Shadel GS, Ghosh S. 2011. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol* **11**:389–402. doi:10.1038/nri2975
- Xie R, Nguyen S, McKeehan WL, Liu L. 2010. Acetylated microtubules are required for fusion of autophagosomes with lysosomes. *BMC Cell Biol* **11**:89–100. doi:10.1186/1471-2121-11-89
- Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**:730–737. doi:10.1038/ni1087
- Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Sato M, Ozato K, Fujita T. 1996. Autocrine Amplification of Type I Interferon Gene Expression Mediated by Interferon Stimulated Gene Factor 3 (ISGF3). *J Biochem* **120**:160–169. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021379
- Yoshizumi T, Ichinohe T, Sasaki O, Otera H, Kawabata S, Mihara K, Koshiba T. 2014. Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. *Nat Commun* **5**:4713. doi:10.1038/ncomms5713
- Zhao C, Zhao W. 2020. NLRP3 Inflammasome—A Key Player in Antiviral Responses. *Front Immunol* **11**. doi:10.3389/fimmu.2020.00211
- Zheng K, Jiang Y, He Z, Kitazato K, Wang Y. 2017. Cellular defence or viral assist: the dilemma of HDAC6. *J Gen Virol* **98**:322–337. doi:10.1099/jgv.0.000679
- Zhong Z, Umemura A, Sanchez-Lopez E, Liang S, Shalapour S, Wong J, He F, Boassa D, Perkins G, Ali SR, McGeough MG, Ellisman MH, Seki E, Gustafsson AB, Hoffman HM, Diaz-Meco MT, Moscat J, Karin M. 2016. NF-κB Restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria. *Cell* **164**:896–910. doi:10.1016/j.cell.2015.12.057

## V. 2. C Conclusions, discussions et perspectives

### V. 2. C. (a) La formation des mito-agrèsomes dépend du réseau de MT

Dans cet article, nos premières analyses quant à la localisation du mito-agrèsome ont révélé qu'il se formait autour du centrosome, suggérant l'implication des MTs. Nous avons exploré cette hypothèse et démontré que la formation des mito-agrèsomes nécessite un réseau de MTs fonctionnel puisque le traitement des cellules par du nocodazole, un agent dépolymérisant des MTs, entraîne la dispersion des mitochondries dans le cytoplasme (Figure 1 de l'article). Ce phénomène est réversible puisque rapidement après le retrait de la drogue on observe la reformation des mito-agrèsomes, suggérant l'implication des moteurs moléculaires dans leur mise en place. Plus précisément, nous avons pu identifier le rôle des dynéines dans ce mouvement rétrograde (Figures 5 et S4 de l'article).

Au vu de l'importance de l'actine-F dans l'induction de la fission mitochondriale (Ji *et al.*, 2015; Manor *et al.*, 2015), nous envisagions la possibilité que ce type de cytosquelette ait également un rôle dans la formation des mito-agrèsomes. Cependant, la déstructuration du réseau d'actine après traitement par de la cytochalasin D n'impacte pas le phénotype induit par BHRF1, puisque les paramètres de fission (AR et FF) et d'agrégation des mitochondries (IC) restent inchangés (Figure S2 de l'article). Ce résultat négatif apporte néanmoins une information supplémentaire quant au mécanisme d'induction de la fission par BHRF1 puisqu'il s'avère être indépendant du réseau d'actine.

Afin de mieux comprendre la dynamique et la chronologie de mise en place des mito-agrèsomes, nous souhaiterions réaliser le co-marquage des mitochondries (par du MitoTracker) et de BHRF1. Nous suivrons dans le temps le mouvement des mitochondries, à l'aide d'un microscope confocal à balayage rotatif (*spinning disk*) qui permet des acquisitions rapides et des observations de longue durée. Nous sommes actuellement en train de mettre en place des outils, qui nous permettront de réaliser ces expérimentations, parmi lesquels une construction de BHRF1 fusionnée à la mCherry a d'ores et déjà été générée au laboratoire.

### V. 2. C. (b) BHRF1 induit l'hyperacétylation des MTs

Les propriétés et fonctions des MTs sont régulées par de nombreuses MPT intervenant à la fois sur la tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  (Janke & Magiera, 2020; Janke & Montagnac, 2017). Nous avons observé que l'expression de BHRF1 induit l'hyperacétylation de la tubuline  $\alpha$  en position Lys-40 (Figure 2 de l'article). Les MTs sont des tubes creux formés de protofilaments alternant tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ . Ce phénomène d'acétylation de la tubuline  $\alpha$  intervient dans la lumière des MTs et modifie subtilement leurs structures en déstabilisant l'interaction entre les différents protofilaments (Eshun-Wilson *et al.*,



2019). Cette perte d'interaction affecte la rigidité des MTs en les rendant plus flexibles et donc, plus résistants aux cassures et aux désassemblages (Portran *et al.*, 2017). De plus, la tubuline  $\alpha$  acétylée est davantage présente dans les MTs stables, une population de MTs particulièrement impliquée dans le transport des mitochondries (Friedman *et al.*, 2010). De manière intéressante, nous avons pu montrer que l'hyperacétylation de la tubuline  $\alpha$  est essentielle à la formation des mito-agrèsomes par BHRF1 (Figure 2 de l'article).

Nous avons souhaité caractériser ce mécanisme d'hyperacétylation des MTs, qui peut résulter de deux phénomènes : soit BHRF1 induit l'activation d'une acétyltransférase, soit BHRF1 inhibe l'activité d'une déacétylase (Li & Yang, 2015). Nous avons montré que l'extinction d'ATAT1 dans les cellules BHRF1<sup>+</sup> inhibe totalement l'acétylation de la tubuline  $\alpha$ , ainsi que la formation des mito-agrèsomes (Figure 4 de l'article). Ce résultat est confirmé par celui obtenu en exprimant dans les cellules une forme de tubuline  $\alpha$  non-acétylable (K40A). Nous avons également recherché par un test enzymatique si BHRF1 impactait malgré tout l'activité des déacétylases et nous n'avons observé aucune différence. Nous avons donc conclu que BHRF1 induit l'hyperacétylation des MTs en activant l'acétyltransférase ATAT1.

Nous aimerions par la suite comprendre comment et à quel niveau agit BHRF1 sur ATAT1. La seule information que nous avons pour le moment est que l'autophagie est nécessaire pour l'induction de l'hyperacétylation des MTs. Ainsi, il est probable que l'activation d'ATAT1 soit autophagie dépendante et l'on pourrait imaginer que, par son activité pro-autophagique, BHRF1 induise la dégradation d'un inhibiteur d'ATAT1. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en bloquant la dégradation autophagique par un traitement à la chloroquine, puis en recherchant le niveau d'acétylation dans les cellules exprimant BHRF1. Autrement, il a été très récemment montré que la protéine p27, un régulateur du cycle cellulaire, stimule l'hyperacétylation des MTs (Nowosad *et al.*, 2021). En effet, p27 interagit et stabilise ATAT1 afin d'induire l'acétylation des MTs (Nowosad *et al.*, 2021). Nous souhaitons donc rechercher par des expériences de co-immunoprécipitation et de microscopie confocale si ATAT1 et BHRF1 interagissent ensemble à des fins similaires.

#### V. 2. C. (c) Comment les mitochondries sont-elles prises en charge par les moteurs ?

Il est largement admis que l'acétylation des MTs permet le recrutement des moteurs moléculaires sur les MTs afin d'induire le trafic intracellulaire (Dompierre *et al.*, 2007; Mackeh *et al.*, 2013; Reed *et al.*, 2006). Concernant la mise en place des mito-agrèsomes, nous avons mis en évidence l'implication des dynéines (Figures 5 et S4 de l'article). Cependant, le mécanisme par lequel les mitochondries sont prises en charge par ce type de moteur reste à déterminer.

Le mécanisme de liaison des mitochondries aux MTs le mieux caractérisé implique les protéines mitochondriales Miro1/2 ainsi que l'adaptateur TRAK1/2 (Kruppa & Buss, 2021). Il serait donc

intéressant de voir si en éteignant l'expression de Miro1/2 des cellules par une approche *siRNA* (Morlino *et al.*, 2014), BHRF1 perd sa capacité à induire des mito-agrèsomes.

Nous pourrions également explorer la possibilité d'une interaction des mitochondries avec les dynéines à travers la formation d'un complexe multiprotéique dépendant de BHRF1. Les dynéines forment un complexe comprenant notamment deux chaînes lourdes identiques, impliquées dans la fixation sur les MTs (Figure 43.A) (Janke & Magiera, 2020; Roberts *et al.*, 2013). Le domaine de fixation du cargo est sous-divisé en plusieurs sous-unités, parmi lesquelles DYNLL1. Il a été montré que DYNLL1 interagit avec BIM afin de réguler son activité pro-apoptotique (Puthalakath *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2019). De plus, il a été montré que BIM peut interagir avec BECN1, permettant de lier l'ensemble aux MTs, et que cette interaction entraîne une inhibition de l'autophagie (Luo *et al.*, 2012). Nous savons que BHRF1 interagit avec BIM (Desbien *et al.*, 2009), ainsi qu'avec BECN1 (Vilmen *et al.*, 2020). Par conséquent, nous pouvons émettre l'hypothèse que BIM puisse connecter les mitochondries au réseau de MTs, via les dynéines, en interagissant avec BHRF1 (Figure 43.B). La mise en place d'un tel complexe sera recherchée au laboratoire et pourrait expliquer le mouvement rétrograde des mitochondries tout en participant à la régulation de l'autophagie.

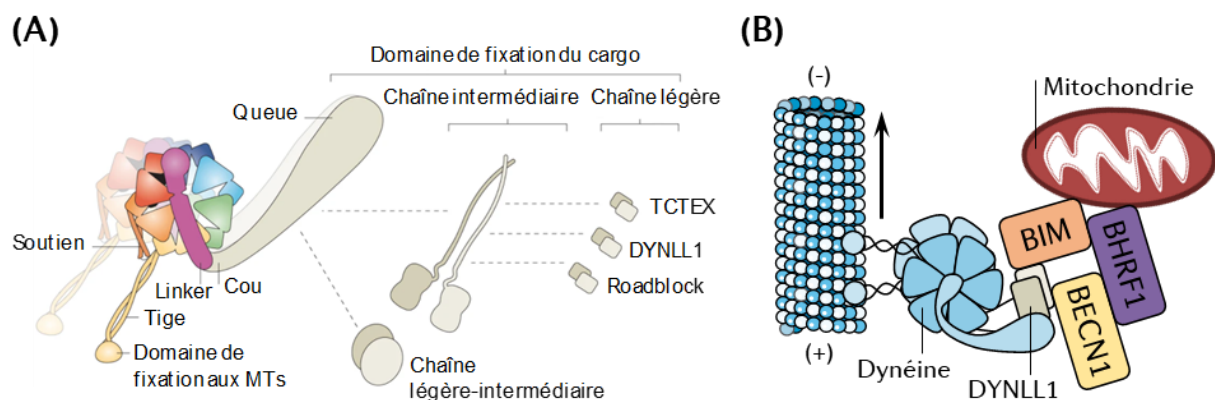


Figure 43 | **Structure des dynéines et hypothèse de liaison des mitochondries aux dynéines par BHRF1**

**(A)** Le complexe dynéine contient deux paires de chaînes lourdes identiques comprenant les six modules moteur AAA<sup>+</sup> (éléments colorés de l'image). Ces chaînes lourdes possèdent à l'extrémité N-terminale une tige portant le domaine de fixation sur les MTs. Au niveau du module AAA1 se lie, grâce au linker, la queue comprenant le domaine de fixation du cargo. La queue est constituée de cinq sous-unités dimériques : la chaîne intermédiaire, la chaîne légère-intermédiaire et trois classes de chaînes légères (TCTEX, DYNLL1 et Roadblock). Adapté de (Roberts *et al.*, 2013). **(B)** Modèle hypothétique de prise en charge des mitochondries par les dynéines en présence de BHRF1. Via son interaction avec BIM et BECN1, deux interactants de DYNLL1, BHRF1 pourrait permettre la prise en charge des mitochondries par les dynéines afin d'assurer leur agrégation à proximité du centrosome.

#### V. 2. C. (d) L'hyperacétylation de la tubuline n'est pas nécessaire à la fission

Il est intéressant de noter que l'hyperacétylation des MTs induite par BHRF1 n'est pas nécessaire à la fragmentation des mitochondries. En effet, on observe que l'expression du mutant de tubuline  $\alpha$  non-

acétylable (K40A) ou que l'extinction d'ATAT1 n'impactent pas la capacité de BHRF1 à induire la fission (Figures 2 et 4 de l'article). D'après notre étude antérieure, nous savons que la fission mitochondriale est dépendante de DRP1 et notamment que BHRF1 induit la déphosphorylation de DRP1 en position Ser-637 (Vilmen *et al.*, 2020). L'absence de lien entre la fission mitochondriale et l'acétylation de la tubuline peut paraître surprenante car il avait précédemment été montré que l'hyperacétylation des MTs, consécutive à un stress aigu (choc hyperosmotique), augmente la fission mitochondriale (Perdiz *et al.*, 2017). Cependant, lors d'un tel stress il est observé que la fission serait due à la phosphorylation de DRP1 en position Ser-616. Il s'agit donc d'une MPT activatrice de DRP1 différente de celle que l'on observe avec BHRF1. De plus, nous avons observé que BHRF1 n'impactait pas le niveau de phosphorylation de la Ser-616 (résultat non montré). Ainsi, nous pensons que l'implication de l'hyperacétylation des MTs dans l'induction de la fission mitochondriale pourrait dépendre du type de stress cellulaire.

Nous pourrions également rechercher si à l'inverse l'induction de la fission mitochondriale par BHRF1 est requise pour stimuler l'hyperacétylation des MTs. Pour cela nous envisageons d'exprimer BHRF1 dans des cellules HeLa déficientes pour DRP1 (Vilmen *et al.*, 2020), puis d'étudier l'impact sur le niveau d'acétylation de la tubuline  $\alpha$ . Cette expérience devrait nous permettre de conclure si dans notre contexte, il y a absence totale de lien entre fission mitochondriale et hyperacétylation des MTs.

#### V. 2. C. (e) L'autophagie participe à l'induction de l'hyperacétylation des MTs

Dans cet article, nous observons que la stimulation de l'autophagie est en amont de la modification des MTs par BHRF1. En effet, l'inhibition pharmacologique de l'autophagie fait perdre l'hyperacétylation des MTs tandis que l'hyperacétylation n'est pas nécessaire à l'activité pro-autophagique de BHRF1 (Figures 6 et S5 de l'article). Ce type de lien n'était pas forcément attendu, puisque plusieurs études avaient précédemment relayé que l'acétylation des MTs est importante pour la formation et la maturation des autophagosomes, mais également pour le flux autophagique (Esteves *et al.*, 2019; Geeraert *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010). Il est par exemple montré qu'en condition de carence nutritive l'initiation de l'autophagie requiert l'acétylation des MTs (Geeraert *et al.*, 2010). En effet, ce phénomène permet le recrutement des dynéines et des kinésines pour activer JNK, conduisant à la perte de l'interaction inhibitrice entre BECN1 et BCL-2 et à la stimulation de l'autophagie (Geeraert *et al.*, 2010). Plus récemment, il a été montré que p27, un régulateur du cycle cellulaire, induit de l'autophagie en réponse à une carence en glucose (Nowosad *et al.*, 2021). Les auteurs montrent, dans ce contexte, que la stimulation de l'autophagie est directement liée au niveau d'acétylation des MTs et que p27 induit l'acétylation via ATAT1 afin de rassembler les autophagosomes près du noyau pour augmenter leur fusion avec les lysosomes (Nowosad *et al.*, 2021). De manière similaire à ces travaux,

nous observons que BHRF1 induit l'accumulation des vésicules autophagiques (LC3<sup>+</sup> et LAMP1<sup>+</sup>) à proximité du noyau, où le mito-agrésome se forme (Vilmen *et al.*, 2020). Nous savons que l'augmentation du nombre de vésicules autophagiques est indépendante de l'hyperacétylation des MTs. En revanche, concernant leur adressage périnucléaire nous n'avons pas évalué l'implication du réseau de MTs. Il semblerait néanmoins que les cellules co-exprimant BHRF1 et le mutant de tubuline  $\alpha$  K40A ne présentent pas cette relocalisation périnucléaire des autophagosomes (Figure 6 de l'article). Il pourrait donc être intéressant de quantifier la distance au noyau des vésicules LC3<sup>+</sup> afin de mieux caractériser ce phénomène qui serait essentiel à l'induction de la mitophagie.

#### V. 2. C. (f) L'hyperacétylation induit une mitophagie provirale

Bien que l'hyperacétylation des MTs induite par BHRF1 ne soit pas nécessaire à l'induction de l'autophagie non-sélective, nous observons qu'elle est essentielle pour induire la mitophagie. En effet, en prévenant ce phénomène d'hyperacétylation nous n'observons plus la séquestration de mitochondries dans les autophagosomes (Figure 6 de l'article). Ce résultat suggère que la formation des membranes autophagosomales autour des mitochondries requiert l'acétylation des MTs. Il serait possible que BHRF1 induise donc la formation de deux types d'autophagosomes : une première population indépendante du niveau d'acétylation des MTs et n'étant pas impliquée dans l'autophagie sélective, puis une seconde population dont la formation serait dépendante de l'hyperacétylation des MTs et étant impliquée dans la mitophagie. Il pourrait donc être intéressant de parvenir à purifier les autophagosomes afin d'étudier leur composition lipidique ainsi que les éventuels récepteurs autophagiques qui leurs sont associés, suivant que les MTs soient hyperacétylés ou non. Ces données pourraient nous permettre de mieux caractériser la mitophagie induite par BHRF1.

Les virus ont développé de nombreuses stratégies leur permettant d'échapper aux défenses de la cellule, notamment par la stimulation de la mitophagie (Ding *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019, 2020b). Pour l'ensemble de ces études l'implication du niveau d'acétylation des MTs n'a jamais été explorée. Ainsi, dans notre article nous démontrons pour la première fois l'implication du niveau d'acétylation des MTs dans l'inhibition des étapes précoces de la production d'IFNs, via l'induction de la mitophagie (Figures 3 et 7 de l'article).

#### V. 2. C. (g) BHRF1 aurait-elle un rôle dans l'inflammasome NLRP3 ?

Les réponses antivirales de la cellule n'impliquent pas seulement la production d'IFNs, puisque l'inflammasome NLRP3 joue également un rôle important en permettant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Zhao & Zhao, 2020). La mitochondrie joue un rôle fondamental dans la régulation de l'inflammasome (Holley & Schroder, 2020) car, en réponse à des dysfonctions mitochondriales,

l'inflammasome NLRP3 s'assemble à proximité des mitochondries, via l'interaction de NLRP3 avec les protéines ASC ou MAVS, permettant d'induire une réponse inflammatoire (Holley & Schroder, 2020; Park *et al.*, 2013). De plus, la dynamique et les mouvements mitochondriaux régulent l'inflammasome puisqu'il a été montré que l'induction pharmacologique de la fission réduit l'assemblage et l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Park *et al.*, 2015). Une étude antérieure rapporte que l'acétylation des MTs et l'activité des dynéines sont essentielles à la relocalisation des mitochondries dans la région périnucléaire, pour que le complexe inflammasome se forme (Misawa *et al.*, 2013). Dans cette étude, les auteurs ne décrivent pas un mito-agrésome comme nous le faisons dans les cellules BHRF1<sup>+</sup>, mais le phénotype qu'ils observent s'en rapproche fortement. Il serait donc intéressant pour nous d'étudier si BHRF1 régule la mise en place de l'inflammasome, car pour l'heure aucune donnée n'est disponible à ce niveau. En revanche, en élargissant à l'EBV, il a été rapporté que le miR-*BART15* cible la région 3'UTR de l'ARNm *NLRP3* diminuant l'activation de NLRP3 et la production d'IL-1 $\beta$  (Haneklaus *et al.*, 2012).

Plusieurs études ont montré que l'induction de la mitophagie bloque la formation de l'inflammasome NLRP3 en prévenant la libération d'ADNmt et de ROSmt (Mishra *et al.*, 2021; Zhong *et al.*, 2016). Dans un cadre viral, il est décrit que l'expression de PB1-F2 régule négativement l'inflammasome NLRP3 (Yoshizumi *et al.*, 2014), ce qui pourrait être relié à sa capacité à stimuler la mitophagie (Wang *et al.*, 2020b), mais pour l'heure ce lien n'a pas été formellement montré. Ainsi, nous envisageons la possibilité que la mitophagie induite par BHRF1 puisse bloquer l'immunité antivirale au niveau de la synthèse de cytokines à la fois antivirales et pro-inflammatoires.

#### V. 2. C. (h) [Quid du rôle des MTs en contexte infectieux ?](#)

Il serait intéressant d'explorer si le phénomène d'hyperacétylation des MTs est retrouvé en contexte infectieux. Les premiers éléments que nous avons font état, lors de la réactivation de l'EBV dans des cellules épithéliales ou des lymphocytes B, d'une formation de mito-agrésomes (Vilmen *et al.*, 2020). Il est donc fortement probable que ce phénotype soit consécutif à l'induction de l'hyperacétylation des MTs, et au vu de son rôle dans l'immunité innée, l'expression précoce de BHRF1 au cours de la réactivation serait résolument favorable à la réplication virale.

## V. 3 Résultats complémentaires : « L'expression de BHRF1 en latence Wp : un facteur favorisant la lymphomagenèse de l'EBV ? »

### V. 3. A Introduction

Les virus ont développé des stratégies leur permettant de manipuler la mort cellulaire afin de contrôler le devenir de l'hôte, un processus particulièrement pertinent dans le cas de virus oncogènes tels que l'EBV (Fitzsimmons & Kelly, 2017). Ce dernier infecte plus de 90% des adultes à travers le monde et chaque année on dénombre plus de 200 000 cancers lui étant imputables (Cohen *et al.*, 2011; Kieff *et al.*, 2007). Ces tumeurs affectent le plus souvent les lymphocytes B avec, par exemple, le LB endémique qui est fortement associé aux infections latentes à l'EBV, notamment chez les enfants d'Afrique subsaharienne (Molyneux *et al.*, 2012).

Du point de vue génétique, les cellules de LB se caractérisent par l'expression dérégulée du facteur de transcription c-MYC en raison d'une translocation chromosomique affectant la position de son gène (Magrath, 1990). De manière analogue aux autres lymphomes causés par cet évènement génétique, les cellules de LB prolifèrent rapidement mais restent sensibles à l'apoptose en condition de stress (Pelengaris *et al.*, 2002). Malgré ces connaissances, les mécanismes conduisant au LB ne sont pas totalement connus, comme par exemple le rôle exact que joue l'EBV dans ces cancers. La majorité des cellules de LB EBV<sup>+</sup> présentent une L-I, se caractérisant uniquement par l'expression de la protéine EBNA-1 et des ARN non-codants *EBERs* et *BARTs*. Dans un peu plus de 15% des LB associés à l'EBV, le programme de latence est du type L-Wp et se caractérise par l'expression d'un nombre plus important de protéines de latence, à savoir EBNA-1, -LP, -3A, -3B, -3C et BHRF1 ainsi que les ARN non-codants *EBERs* et *BARTs* (Amoroso *et al.*, 2011; Fitzsimmons & Kelly, 2017). L'EBV est essentiel à la survie des cellules de LB puisqu'il a été montré, *in vivo*, que la perte de l'épisome conduit à une sensibilité accrue à l'apoptose et à une diminution de la tumorigénicité (Fitzsimmons *et al.*, 2018). Le nombre de gènes viraux s'exprimant au cours du LB est restreint et le rôle de ces gènes n'est pas encore clairement établi. Cependant, le consensus veut que ces gènes contribuent à surmonter les effets pro-apoptotiques de l'expression dérégulée de c-MYC (Fitzsimmons *et al.*, 2018).

Dans ce contexte, nous avons souhaité étudier le rôle de BHRF1 en s'intéressant aux conséquences de son expression lors de la phase de latence de l'EBV. Nous avons choisi comme modèle d'étude la lignée cellulaire P3HR-1 qui est issue d'un patient atteint de LB, associé à l'EBV, dont le sous-type viral présente une délétion de son génome au niveau de la région codant l'EBNA-2 (Rabson *et al.*, 1982). Ainsi, la latence résultant de l'infection par ce virus est du type Wp.



Les cellules EBV<sup>+</sup> en L-Wp sont particulièrement résistantes à l'apoptose par rapport à des cellules infectées par un EBV sauvage (Anderton *et al.*, 2008). Les raisons de cette diminution de la sensibilité à la mort ne sont pas totalement comprises et semblent multifactorielles. Il a initialement été proposé que la résistance à l'apoptose serait associée à l'expression d'EBNA-3, qui réprimerait l'expression du pro-apoptotique BIM (Anderton *et al.*, 2008; Kelly *et al.*, 2005). Cependant, quelques années plus tard, il fut rapporté que cet effet serait plutôt dû à l'expression de BHRF1 en latence (Kelly *et al.*, 2009). Une seconde étude étaye cette hypothèse en montrant que l'extinction de BHRF1 dans des cellules P3HR-1 accentue la mort cellulaire (Watanabe *et al.*, 2010), confirmant que BHRF1 constitue un facteur pro-survie (Watanabe *et al.*, 2010). BHRF1 étant connue pour sa capacité à inhiber l'apoptose (Altmann & Hammerschmidt, 2005; Henderson *et al.*, 1993), il n'est pas surprenant que son expression pendant la latence soit associée à une augmentation de la résistance à la mort. Cependant, deux études antérieures montrent que la protéine tronquée EBNA-LP protège les cellules P3HR-1 de l'apoptose dépendante des caspases, en inhibant l'activité de la phosphatase 2A (Garibal *et al.*, 2007, 2010).

Nous avons démontré précédemment que BHRF1 modifie la morphodynamique mitochondriale et stimule l'autophagie à des fins provirales (Glon *et al.*, 2021; Vilmen *et al.*, 2020). Dans cette étude préliminaire nous avons recherché si ces nouvelles fonctions de BHRF1 étaient retrouvées lors de son expression pendant la L-Wp, mais également si elles avaient une implication dans la résistance à la mort cellulaire. Nous avons observé des mito-agrésomes dans les cellules P3HR-1, qui se forment grâce à l'expression de BHRF1 et de l'autophagie. De plus, l'activité pro-autophagique de BHRF1 serait cytoprotectrice vis-à-vis de l'apoptose induite par des drogues. Ainsi, les fonctions de BHRF1 que nous démontrons pourraient s'inscrire dans un processus pro-lymphomagenèse et éclaircir le rôle de l'EBV dans la pathogenèse du LB.

### V. 3. B Matériels et méthodes

#### **Anticorps, colorants et drogues**

Cette étude a nécessité les anticorps primaires suivants : anti-actine- $\beta$  (Merck Millipore, #MAB1501), anti-ATG5 (Sigma-Aldrich, #A0731), anti-BECN1 (BD Biosciences #612112), anti-BHRF1 (Merck Millipore, #MAB8188), anti-DRP1 (Cell Signaling Technology, #8570), anti-Ea-D (Santa Cruz Biotechnology, #58121), anti-LC3B (Sigma-Aldrich, #L7543), anti-PARP1 (Santa-Cruz Biotechnology, #80007), anti-TOM20 (BD Biosciences, #612278) et anti-ZEBRA (Santa Cruz Biotechnology, #53904). Les anticorps secondaires utilisés sont les suivants : Alexa Fluor 488 anti-souris (Jackson ImmunoResearch, #115-545-003), Alexa Fluor 555 anti-souris (Life technology, #A21424), anticorps couplés à la HRP (*Horseradish Peroxidase*) anti-lapin et anti-souris (Jackson ImmunoResearch Laboratories, #111-035-003 et #115-035-003).

Le réseau mitochondrial est marqué par le colorant MitoTracker Red CMXRos provenant de chez Life Technologies (#M7512) et utilisé à 100 nM pendant 30 min avant la fixation des cellules. Le noyau des cellules est coloré à l'aide de DAPI (Di Aminido Phenyl Indol) provenant de chez Thermo Fisher Scientific (#D1306) et utilisé à 300 nM pendant 10 min.

Le flux autophagique est évalué en traitant les cellules par de la chloroquine (Sigma-Aldrich, #C6628) à 50  $\mu$ M pendant 4 h. Afin de bloquer l'autophagie, les cellules ont été traitées par deux inhibiteurs pharmacologiques différents, soit par la 3-MA (Sigma-Aldrich, #M9281) à 5 mM pendant 8 h, soit par la spautin-1 (Sigma-Aldrich, #SML0440) à 20  $\mu$ M pendant 8 h.

Le traitement des cellules par le Mdivi-1 (*Mitochondrial division inhibitor-1* ; Sigma-Aldrich, #M0199), pendant 1 h à 50  $\mu$ M, permet l'inhibition spécifique de DRP1.

### **Construction et production de lentivirus hébergeant le shRNA dirigé contre BHRF1**

Les oligonucléotides formant les shRNA ciblant le gène *BHRF1* ont été dessinés par Frédérique Quignon (CRSA, Paris, France). Tout d'abord, les oligonucléotides sens et antisens ont été hybridés pendant 4 min à 95°C, puis redescendus lentement à température ambiante durant au moins 4 h. Ces derniers ont ensuite été clonés dans un vecteur pLK0.1 TRC, entre les sites de restriction *AgeI* et *EcoRI*. Les plasmides obtenus ont été amplifiés par transformation de bactéries *Escherichia coli DH5 $\alpha$*  pendant 2 min à 42°C. Après une première vérification par PCR sur colonies, les ADN plasmidiques extraits (Macherey-Nagel, #740410.50) ont été séquencés et validés.

Les plasmides ont ensuite été empaquetés en particules lentivirales en suivant les recommandations du fournisseur Addgene. Pour la production des vecteurs lentiviraux, nous utilisons des cellules HEK293T cultivées en plaque 6 puits. Les cellules sont transfectées, à l'aide de Fugène HD (Promega, #E2311), par les plasmides pMD2.G, psPAX2 et pLK0.1/*sh-BHRF1*. Le lendemain (15 h maximum après transfection), le milieu de culture est aspiré et remplacé par du milieu de culture complet. La production des particules lentivirales est poursuivie pendant 48 h. Le surnageant de culture, contenant les particules lentivirales, est récupéré et centrifugé 5 min à 1500 rpm afin d'éliminer d'éventuelles cellules en suspension. Le surnageant est filtré (0.45  $\mu$ m) et la suspension lentivirale ainsi obtenue est directement utilisée pour transduire les cellules cibles.

### **Culture cellulaire**

Les cellules P3HR-1 proviennent du laboratoire de Joëlle Wiels (IGR, Villejuif, France) et sont cultivées à 37°C sous atmosphère humide contrôlée en CO<sub>2</sub> (5%) dans du milieu RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Gibco, #A10491-01) supplémenté avec 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal, Dominique Dutscher, #S181B-500) et 20 mM de L-Glutamine (ThermoFisher Scientific, #2503081). Tous les deux jours, les cellules sont diluées au maximum à 3.10<sup>5</sup> cellules/mL. Pour la culture des différentes lignées stables de cellules P3HR-1 hébergeant des shRNA (voir paragraphe spécifique sur

leur construction), le milieu est additionné de Puromycine (Invivogen, #ant-pr-1) à 50 µg/mL. Les cellules HEK293T (ATCC, #CRL11268), utilisées pour la production des particules lentivirales, sont cultivées à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> et dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco, #41965-09) supplémenté de 10% de SFV.

#### **Estimation de la viabilité cellulaire par le test MTT**

Le taux de viabilité des cellules P3HR-1, traitées par des inducteurs apoptotiques, est estimé en mesurant l'activité mitochondriale par un test MTT. Les cellules sontensemencées en plaque 96 puits sous un volume de 100 µL. À la suite des traitements, 10 µL de solution MTT (Sigma-Aldrich, #M5655) à 5 mg/mL sont ajoutés directement aux cellules. Après 3 h d'incubation à 37°C, les cristaux de formazan préalablement formés sont resuspendus dans 200 µL de DMSO. La plaque est incubée à température ambiante pendant 3 h à l'obscurité, puis l'absorbance est mesurée à 550 (et 620 nm en tant que référence) à l'aide d'un lecteur de plaque Infinite F50 (Tecan Group Ltd, Männedorf, Suisse). Chaque condition est réalisée en triplicata.

#### **Génération des lignées P3HR-1 déficientes**

Pour l'obtention des différentes lignées stables P3HR-1 déficientes, des cellules sauvages (WT) sont transduites par des lentivirus hébergeant des *shRNA* ciblant l'ARNm codant les protéines ciblées. Les lentivirus exprimant les *sh-NT*, *ATG5*, *BECN1* et *DRP1* sont commerciaux (Sigma-Aldrich, *Lentiviral Particles – MISSION® shRNA*), tandis que les *sh-SCR* et *LC3B* nous ont été fournis par Arnaud Moris (I2BC/CIMI, Paris, France) et les *sh-BHRF1* ont été mis au point au laboratoire (voir plus haut).

Les cellules sont centrifugées 5 min à 1500 rpm et le culot repris dans du milieu complet additionné d'un volume de suspension lentivirale amenant à une MOI (*Multiplicity Of Infection*) de 1. Les cellules sont de nouveau centrifugées à 2000 rpm pendant 30 min à 32°C. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot repris dans du milieu complet. Trois jours post-transduction, le milieu de culture est remplacé par du milieu de sélection (Puromycine [5 µg/mL]). Les cellules sont maintenues en milieu de sélection jusqu'à la mort de l'ensemble des cellules n'ayant pas été transduites. La validité des différentes lignées cellulaires a été confirmée en vérifiant l'extinction de l'expression des gènes ciblés par immunoblot (Figure 44).

#### **Immunoblot**

Les cellules sont centrifugées 5 min à 1500 rpm afin d'éliminer le surnageant de culture. Les culots sont repris dans du tampon de lyse (65 mM Tris pH 6,8, 4% SDS, 1,5% β-mercaptoéthanol et un cocktail d'inhibiteurs de protéases [Sigma-Aldrich, #P8340]) puis incubés à 100°C pendant 10 min. Les protéines ainsi extraites sont séparées sur gel SDS-PAGE (10 ou 12,5% de poly-acrylamide selon la taille des protéines recherchées), puis électro transférées sur des membranes de PVDF (Amersham, #10600002), préalablement activées au méthanol absolu pendant 20 s. Les membranes sont ensuite

incubées pendant 1 h à température ambiante dans un tampon de saturation (PBS, 0,1% Tween20 [Euromedex, #2001] et 5 % de lait), puis incubées sur la nuit à 4°C avec les solutions contenant les anticorps primaires. Le lendemain, les membranes sont incubées 1 h à température ambiante avec des solutions contenant les anticorps secondaires, couplés à l'enzyme HRP. La révélation est effectuée par ajout de la solution de détection ECL (Merck Millipore, #WBKLS0500), selon les indications du fournisseur, puis l'acquisition des images est réalisée avec un appareil Fusion X (Vilbert Lourmat). La quantification de l'expression des différentes protéines est réalisée en utilisant le logiciel Image J (Fiji), puis normalisée grâce au contrôle de charge représenté par l'actine- $\beta$ .

### **Immunofluorescence**

Les cellules sont centrifugées pendant 5 min à 1500 rpm, puis lavées une fois dans du tampon PBS. À cette étape, les cellules sont éventuellement traitées par du MitoTracker Red CMXRos pour marquer le réseau mitochondrial (voir plus haut). Les cellules sont ajustées à la concentration de  $2.10^6$  cellules/mL dans du PBS, puis 15  $\mu$ L de cette suspension sont déposés sur une lamelle de verre (ThermoFisher Scientific, #7107). La goutte est séchée 10 min dans une étuve sèche à 37°C, puis l'empreinte de la goutte est marquée à l'aide d'un stylo PAP-Pen (Kicker, #D48565). Les cellules sont fixées dans du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde (PFA) puis lavées dans du PBS. L'action du PFA est neutralisée par l'ajout d'une solution concentrée à 50 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pendant 10 min, puis les cellules sont perméabilisées pendant 4 min dans du PBS 0,2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, #T8787). Les cellules sont ensuite incubées 1 h dans du PBS 0.2% gélatine (Sigma-Aldrich, #G7765) supplémenté de 5% de SVF afin de permettre la saturation, suivi de l'incubation pendant 1 h avec les anticorps primaires. Les cellules sont lavées trois fois dans du PBS, dans une boîte de coloration Coplin, pendant 5 min, puis incubées avec les anticorps secondaires appropriés. Après un nouveau lavage des cellules, les noyaux sont colorés par du DAPI, puis une lamelle de verre (DeckGläser, #WQ0687) est montée sur la lame à l'aide du milieu de montage Glycergel (Dako, #C0563). Les photos sont acquises en utilisant le microscope à épifluorescence Nikon Eclipse 80i. Les images sont redimensionnées, organisées, légendées ainsi qu'analysées grâce au logiciel Image J (Fiji).

### **Quantification du phénotype mitochondrial**

La formation de mito-agrèsomes dans les cellules est évaluée en mesurant l'indice de compaction (IC) du marquage mitochondrial, comme décrit précédemment (Narendra *et al.*, 2010; Vilmen *et al.*, 2020). Une cellule présente un mito-agrèsome lorsque la valeur d'IC est supérieure à 0,4. Le pourcentage de cellule ayant un mito-agrèsome est ainsi déterminé en quantifiant l'IC d'au moins 30 cellules par expérience, sur trois expériences indépendantes.

## Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  l'erreur standard de la moyenne (SEM), et sont analysés à l'aide du logiciel Prism (GraphPad 7.00) en utilisant les tests d'analyse de Student ou d'ANOVA. Une valeur P inférieure à 0,05 entre deux conditions est considérée comme une différence statistiquement significative. Les données statistiques sont seulement données sur les expériences qui ont été répliquées au moins trois fois de manière indépendante.

### V. 3. C Résultats

#### V. 3. C. (a) Caractérisation de la lignée cellulaire EBV<sup>+</sup> P3HR-1

Nous avons tout d'abord contrôlé l'expression de BHRF1 dans les cellules P3HR-1, ainsi que l'expression de certaines protéines virales par immunoblot. Les protéines très précoces Ea-D (*Early antigen-D*) et ZEBRA ne sont pas détectées, confirmant le maintien en latence de l'EBV dans ces cellules (Figure 44.A). En revanche, nous détectons bien la présence de BHRF1 (Figure 44.A). Nous avons confirmé ces résultats par immunofluorescence, car quasiment aucune cellule n'est positive pour l'expression des protéines lytiques, tandis que plus de 50% des cellules sont positives pour BHRF1 (Figure 44.A).

BHRF1 étant connue pour induire la formation de mito-agrèsomes au cours de la réactivation de l'EBV (Vilmen *et al.*, 2020), nous nous sommes interrogés sur sa capacité à modifier la morphodynamique mitochondriale lors de son expression en phase de latence dans les cellules P3HR-1. Nous avons donc étudié par microscopie la répartition des mitochondries dans le cytoplasme. On peut s'apercevoir qu'en majorité les mitochondries se concentrent à un pôle de la cellule (Figure 44.B). La mesure de l'IC rend compte de l'agrégation des mitochondries. En effet, les cellules présentent en moyenne une valeur d'IC d'environ 0,55 (Figure 44.C). Or, nous avons précédemment défini qu'une valeur d'IC supérieure à 0,4 reflète la présence d'un mito-agrèsome (Vilmen *et al.*, 2020). Cette quantification nous a permis d'établir que plus de 60% des cellules présentent un mito-agrèsome (Figure 44.C), ce qui est similaire à la proportion de cellules exprimant BHRF1, suggérant le rôle de la protéine dans l'établissement de ce phénotype.

#### V. 3. C. (b) BHRF1 et DRP1 sont nécessaires à la formation des mito-agrèsomes

Afin d'explorer le rôle de BHRF1 sur la formation des mito-agrèsomes, nous avons entrepris la génération d'une lignée cellulaire P3HR-1 déficiente pour l'expression de cette protéine virale. Pour y parvenir, nous avons mis au point au laboratoire des lentivirus exprimant un *shRNA* interférant avec l'ARNm *BHRF1*. Après transduction des cellules, le niveau d'extinction a été vérifié par immunoblot

(Figure 44.D). D'autres lignées déficientes, soit en fission mitochondriale (*sh-DRP1*) soit en autophagie (*sh-ATG5*, *BECN1* et *LC3B*), ont été mises au point afin de caractériser au mieux le rôle de BHRF1 dans les cellules P3HR-1 (Figure 44.D).

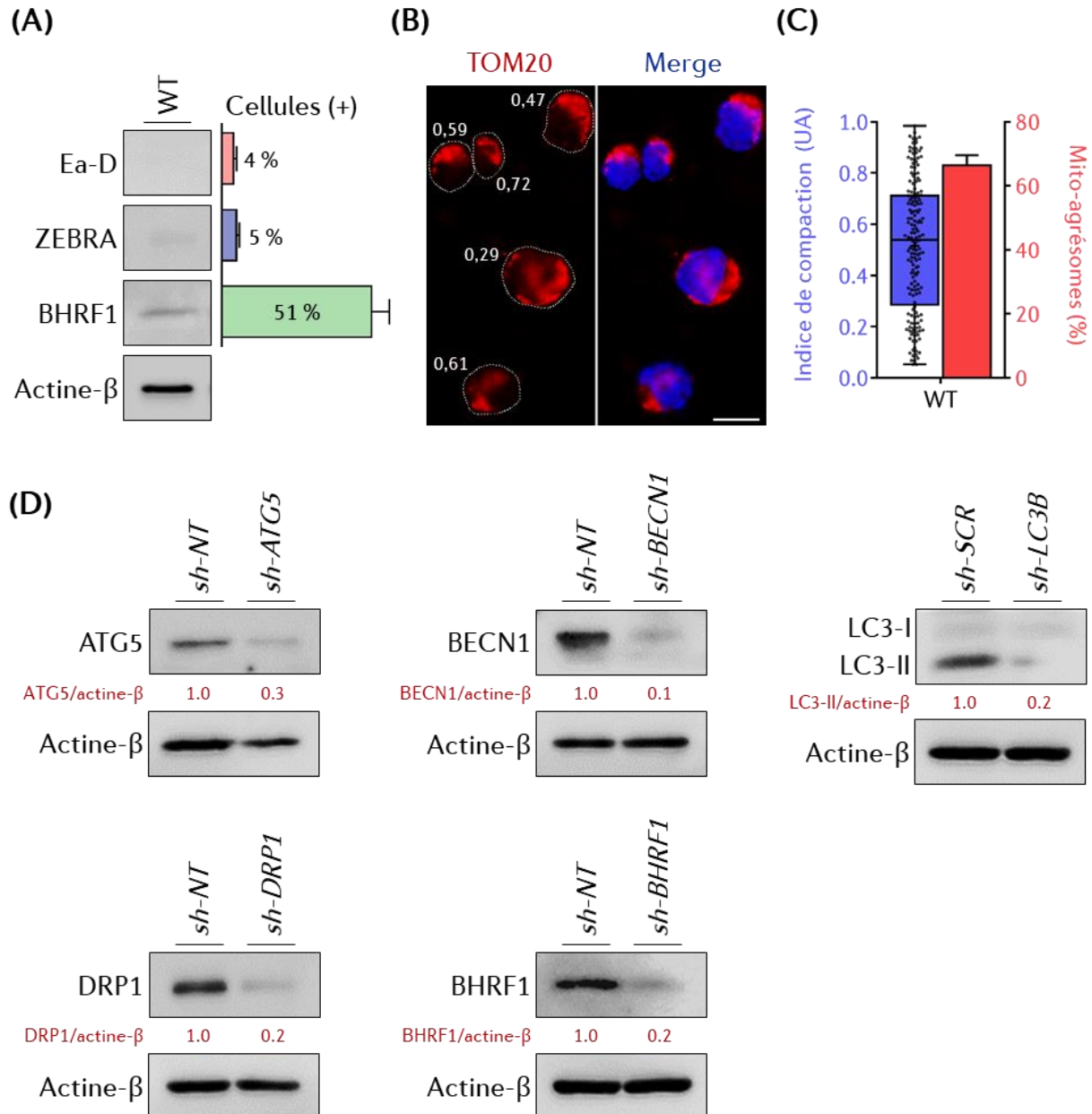


Figure 44 | **Caractérisation de la lignée cellulaire P3HR-1 et validation des lignées déficientes**

**(A)** Analyse de l'expression de différentes protéines virales (Ea-D, ZEBRA et BHRF1) dans les cellules P3HR-1 WT par immunoblot. Le taux de cellules exprimant chaque protéine étudiée est donné à titre indicatif et a été évalué par immunofluorescence. **(B)** Caractérisation du phénotype mitochondrial des cellules P3HR-1 WT par microscopie à épifluorescence. Les cellules sont immunomarquées à l'aide d'un anticorps anti-TOM20 (mitochondries) et les noyaux sont colorés par du DAPI. Pour chaque cellule, le contour a été dessiné et la valeur de l'IC mitochondrial est donnée. Barre = 20  $\mu$ m. **(C)** Quantification de l'IC ainsi que du taux de mito-agrégates. Les résultats sont donnés pour trois expériences indépendantes (n = 40 cellules). **(D)** Détection par immunoblot du niveau d'expression des protéines ciblées par une approche *shRNA* dans les différentes lignées P3HR-1 déficientes, par comparaison à leurs contrôles respectifs. Les ratios normalisés, par rapport aux niveaux d'expression de l'actine- $\beta$ , sont donnés.



Nous avons premièrement étudié par microscopie l'impact de la déficience en BHRF1 sur la morphodynamique mitochondriale (Figure 45). Dans les cellules *sh-NT* on observe que BHRF1 est localisée au niveau des mito-agrèsomes (Figure 45.A). En revanche, l'absence de BHRF1 se traduit par une diminution significative de l'agrégation des mitochondries qui se répartissent de manière plus homogène dans le cytoplasme (Figure 45.A). Ces observations sont confirmées par la mesure de l'IC mitochondrial qui passe de 0,51 en condition contrôle à 0,32 dans les cellules *sh-BHRF1* (Figure 45.B). Ainsi, la présence d'un mito-agrèsome dans les cellules P3HR-1 est bien due à l'expression de BHRF1 puisqu'en son absence le pourcentage de cellules ayant un mito-agrèsome diminue de moitié (Figure 45.B).

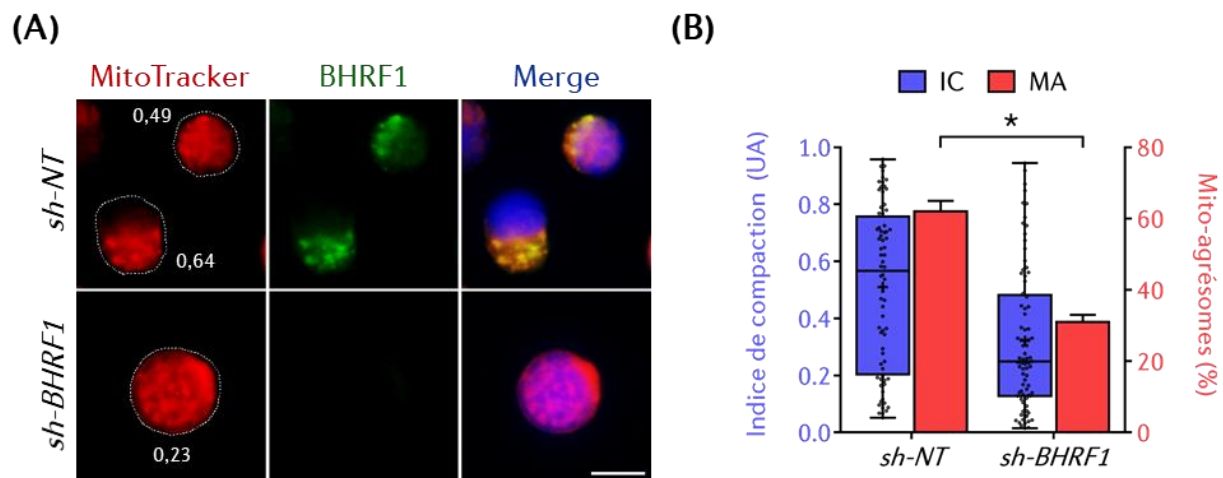


Figure 45 | BHRF1 est responsable de la formation de mito-agrèsomes dans les cellules P3HR-1

(A) Images de microscopie à épifluorescence de cellules P3HR-1 contrôles (*sh-NT*) et déficientes pour BHRF1 (*sh-BHRF1*). Les mitochondries sont marquées par du MitoTracker et l'expression de BHRF1 est détectée en utilisant un anticorps spécifique. Les noyaux sont colorés par du DAPI. Pour chaque cellule, le contour a été dessiné et la valeur de l'IC mitochondrial est donnée. Barre = 20  $\mu$ m. (B) Quantification de l'IC ainsi que du taux de mito-agrèsomes (MA) pour chaque condition. Les résultats sont donnés pour trois expériences indépendantes (n = 40 cellules). Analyse statistique : \* P < 0.05 (Test de Student).

Lors de l'expression ectopique de BHRF1 dans des cellules épithéliales, nous avons montré que la mise en place du mito-agrèsome est consécutive à l'induction de la fission mitochondriale dépendante de DRP1 (Vilmen *et al.*, 2020). Les cellules P3HR-1 disposent d'un rapport nucléo/cytoplasme élevé rendant difficile d'observer et de quantifier les phénomènes de fission. Ainsi, en l'état il nous est difficile de conclure que l'expression de BHRF1 en L-Wp induit de la fission mitochondriale. Cependant, afin de définir si la fragmentation des mitochondries est impliquée dans l'induction de leur agrégation, nous avons recherché la présence de mito-agrèsomes dans des cellules P3HR-1 déficientes en fission mitochondriale. La déficience en fission mitochondriale est induite par deux approches ciblant DRP1. La première vise à éteindre l'expression de son gène par une approche *shRNA* (lignée P3HR-1 *sh-DRP1*) (Figure 44.D) ; la seconde consiste à inhiber spécifiquement l'activité de la protéine en traitant les cellules par du Mdivi-1. Dans la lignée *sh-DRP1*, on observe que BHRF1 est toujours associée aux

mitochondries (Figure 46.A). Cependant, comparativement aux cellules contrôles (*sh-NT*), aussi bien les mitochondries que BHRF1 sont réparties de manière plus homogène autour des noyaux (Figure 46.A). La quantification de l'IC renseigne sur une diminution très importante du taux de mito-agrèsomes en absence de DRP1 (Figure 46.B). Les mêmes observations peuvent être faites en inhibant l'activité de DRP1 par une approche pharmacologique (Figures 46.C et D). Ainsi, nous pouvons conclure que la fission mitochondriale est nécessaire à la formation de mito-agrèsomes.

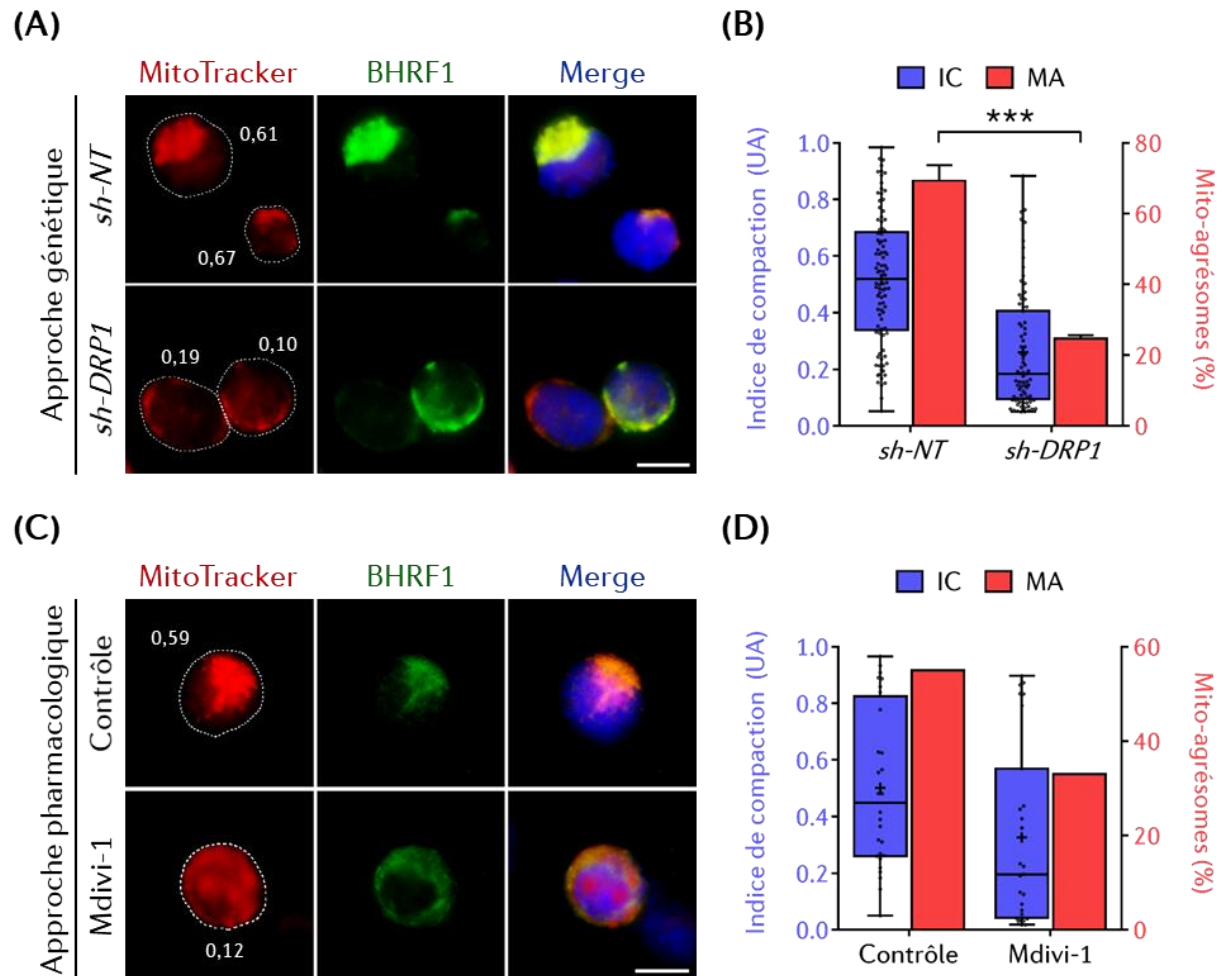


Figure 46 | **L'absence d'activité DRP1 prévient la formation des mito-agrèsomes des cellules P3HR-1**

**(A)** Images de microscopie à épifluorescence de cellules P3HR-1 contrôles (*sh-NT*) et déficientes pour DRP1 (*sh-DRP1*). Les mitochondries sont marquées par du MitoTracker et l'expression de BHRF1 est détectée en utilisant un anticorps spécifique. Les noyaux sont colorés par du DAPI. Pour chaque cellule, le contour a été dessiné et la valeur de l'IC mitochondrial est donnée. Barre = 20  $\mu$ m. **(B)** Quantification de l'IC ainsi que du taux de mito-agrèsomes (MA) pour chaque condition. Les résultats sont donnés pour trois expériences indépendantes ( $n = 40$  cellules). Analyse statistique : \*\*\*  $P < 0.001$  (Test de Student). **(C)** Images de microscopie à épifluorescence de cellules P3HR-1 sauvages traitées ou non (contrôle) par du Mdivi-1, un inhibiteur pharmacologique de DRP1. Les mitochondries sont marquées par du MitoTracker et l'expression de BHRF1 est détectée en utilisant un anticorps spécifique. Les noyaux sont colorés par du DAPI. Pour chaque cellule, le contour a été dessiné et la valeur de l'IC mitochondrial est donnée. Barre = 20  $\mu$ m. **(D)** Quantification de l'IC ainsi que du taux de mito-agrèsomes (MA) pour chaque condition ( $n = 30$  cellules).

## V. 3. C. (c) L'autophagie et la mitophagie sont fonctionnelles dans les cellules P3HR-1

En tant qu'orthologue de BCL-2, nous avons précédemment recherché l'implication de BHRF1 sur la régulation de l'autophagie et démontré qu'elle possède une activité pro-autophagique (Vilmen *et al.*, 2020). Plus précisément, nous avons démontré que BHRF1 induit la mitophagie (Vilmen *et al.*, 2020). Cette forme d'autophagie sélective peut conduire à réduire la voie intrinsèque de l'apoptose et ainsi à améliorer la survie cellulaire. Les cellules P3HR-1 étant connue pour être particulièrement résistantes à l'apoptose, nous nous sommes intéressés à une potentielle induction de la mitophagie par BHRF1. Nous avons tout d'abord étudié le niveau d'autophagie des cellules P3HR-1 *sh-NT*. Pour cela, les cellules ont été placées en carence nutritive (EBSS pour *Earle's Balanced Salt Solution*), afin de stimuler l'autophagie, un stress se traduisant par une augmentation de la forme lipidée de LC3-II (Figure 47.A). En bloquant le flux autophagique par un traitement à la chloroquine, on observe une accumulation de LC3-II, qui est plus élevée en condition de carence nutritive (Figure 47.A). Ainsi nous pouvons conclure que les cellules P3HR-1 présentent une autophagie fonctionnelle et qu'elles répondent à la carence nutritive. Le même type d'expérience a été mené pour les cellules déficientes en BHRF1, où l'on observe la même tendance qu'en cellules contrôles (*sh-NT*) mais avec un ralentissement du flux autophagique ainsi qu'une diminution de la quantité de LC3-II en carence nutritive (Figure 47.A). Ces observations mènent à la conclusion que BHRF1 aurait également une activité pro-autophagique lors de la latence de l'EBV dans les cellules P3HR-1.

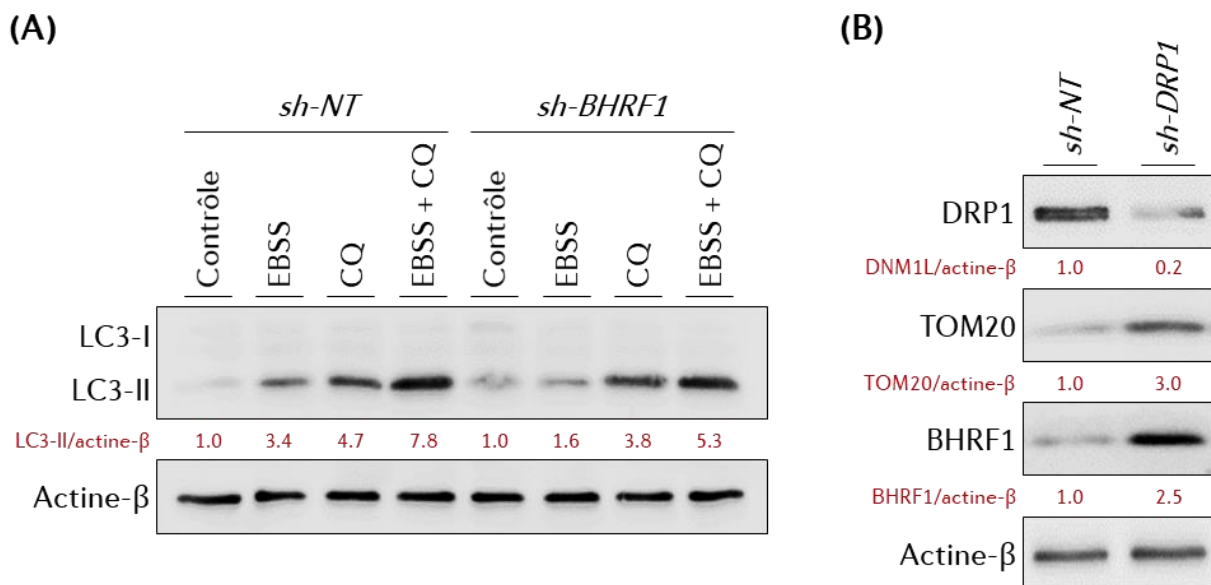


Figure 47 | Étude de l'autophagie et de la mitophagie dans les cellules P3HR-1

**(A)** Étude du niveau d'autophagie dans la lignée cellulaire P3HR-1 déficiente pour BHRF1 par rapport aux cellules contrôles (*sh-NT*). Les différentes conditions de traitement sont indiquées. Les ratios LC3-II/actine-β sont normalisés par rapport à la condition contrôle de chaque lignée cellulaire. **(B)** Analyse du niveau d'expression de différentes protéines (DRP1, TOM20 et BHRF1) dans les cellules P3HR-1 déficientes pour DRP1. Les ratios d'expression des différentes protéines étudiées sont normalisés par rapport aux cellules contrôles *sh-NT*.

Afin de rechercher si les cellules P3HR-1 présentent un niveau constitutif de mitophagie, dû à l'expression de BHRF1, nous avons étudié le niveau d'expression de TOM20, un marqueur mitochondrial, par immunoblot. Pour cela, nous avons utilisé des cellules déficientes en fission mitochondriale (*sh-DRP1*), et donc par extension déficientes en mitophagie, puisque la fission est un évènement connu pour précéder l'induction de la mitophagie (Burman *et al.*, 2017). Dans les cellules *sh-DRP1*, on observe l'accumulation d'un facteur trois de TOM20 par rapport à la condition contrôle, suggérant bien que dans les cellules *sh-NT*, il y aurait une dégradation des mitochondries. De plus, dans les cellules *sh-DRP1* on observe l'accumulation de BHRF1 (Figure 47.B), qui est probablement due à l'accumulation de TOM20. En effet, le défaut de mitophagie permet d'accumuler des mitochondries sur lesquelles BHRF1 est associée. Ces premiers résultats devront être confirmés en montrant de manière plus directe l'induction de la mitophagie dans les cellules P3HR-1, par exemple en inhibant la dégradation autophagique par une approche pharmacologique. Le rôle de BHRF1 dans la mitophagie sera également exploré grâce aux cellules déficientes pour BHRF1 et la quantité de TOM20 sera recherchée par immunoblot.

#### V. 3. C. (d) L'autophagie est nécessaire à la formation des mito-agrèsomes

Nous avons ensuite recherché si l'autophagie était un facteur nécessaire à l'induction des mito-agrèsomes, comme c'est le cas lors de l'expression de BHRF1 dans les cellules HeLa (Vilmen *et al.*, 2020). Dans un premier temps, nous avons inhibé pharmacologiquement l'autophagie dans les cellules P3HR-1 en les traitant soit par de la spautin-1, soit par de la 3-MA. L'observation microscopique des cellules traitées semble indiquer une réduction de la formation des mito-agrèsomes (Figure 48.A). Cette tendance est confirmée en quantifiant la compaction des mitochondries. En effet, le traitement par de la spautin-1 ou du 3-MA réduit significativement le taux de cellules présentant un mito-agrèsome (Figure 48.B).

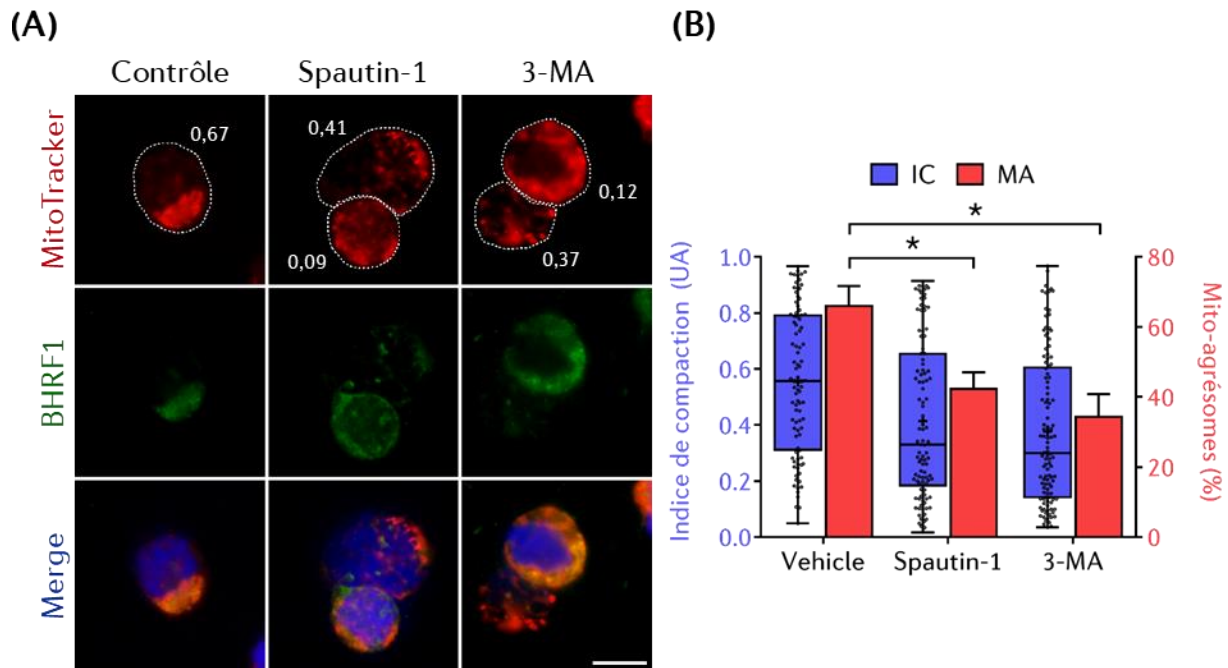


Figure 48 | **L'inhibition pharmacologique de l'autophagie diminue la formation des mito-agrèsomes**

**(A)** Images de microscopie à épifluorescence de cellules P3HR-1 sauvages traitées ou non (contrôle) par des inhibiteurs autophagiques (spautin-1 et 3-MA). Les mitochondries sont marquées par du MitoTracker et l'expression de BHRF1 est détectée en utilisant un anticorps spécifique. Les noyaux sont colorés par du DAPI. Pour chaque cellule, le contour a été dessiné et la valeur de l'IC mitochondrial est donnée. Barre = 20  $\mu$ m. **(B)** Quantification de l'IC ainsi que du taux de mito-agrèsomes (MA) pour chaque condition. Les résultats sont donnés pour trois expériences indépendantes (n = 40 cellules). Analyse statistique : \* P < 0.05 (Test ANOVA).

Pour confirmer ces premiers résultats, nous avons également inhibé l'autophagie par une approche génétique en ciblant différentes protéines autophagiques. Nous avons éteint l'expression de BECN1, qui appartient au complexe d'initiation de l'autophagie et qui interagit avec BHRF1 ; de LC3B, qui est retrouvée dans les membranes autophagosomales ; et d'ATG5, qui est impliquée dans le système de conjugaison permettant la lipidation des LC3. La validation des lignées est présentée en Figure 44.D. L'absence d'ATG5 ou de BECN1 prévient la formation des mito-agrèsomes (Figure 49.A). En effet, dans les cellules *sh-BECN1* et *sh-ATG5* le taux de mito-agrèsomes (respectivement 36 et 28%) est significativement réduit par comparaison aux cellules contrôles qui présentent dans environ 70% des cas un mito-agrèsome. En revanche, l'effet de l'extinction de LC3B est moindre puisque près de 40% des cellules ont un mito-agrèsome, mais le résultat est à confirmer sur d'autres expériences. Néanmoins, l'ensemble de ces résultats indique que l'autophagie est impliquée dans la formation des mito-agrèsomes.

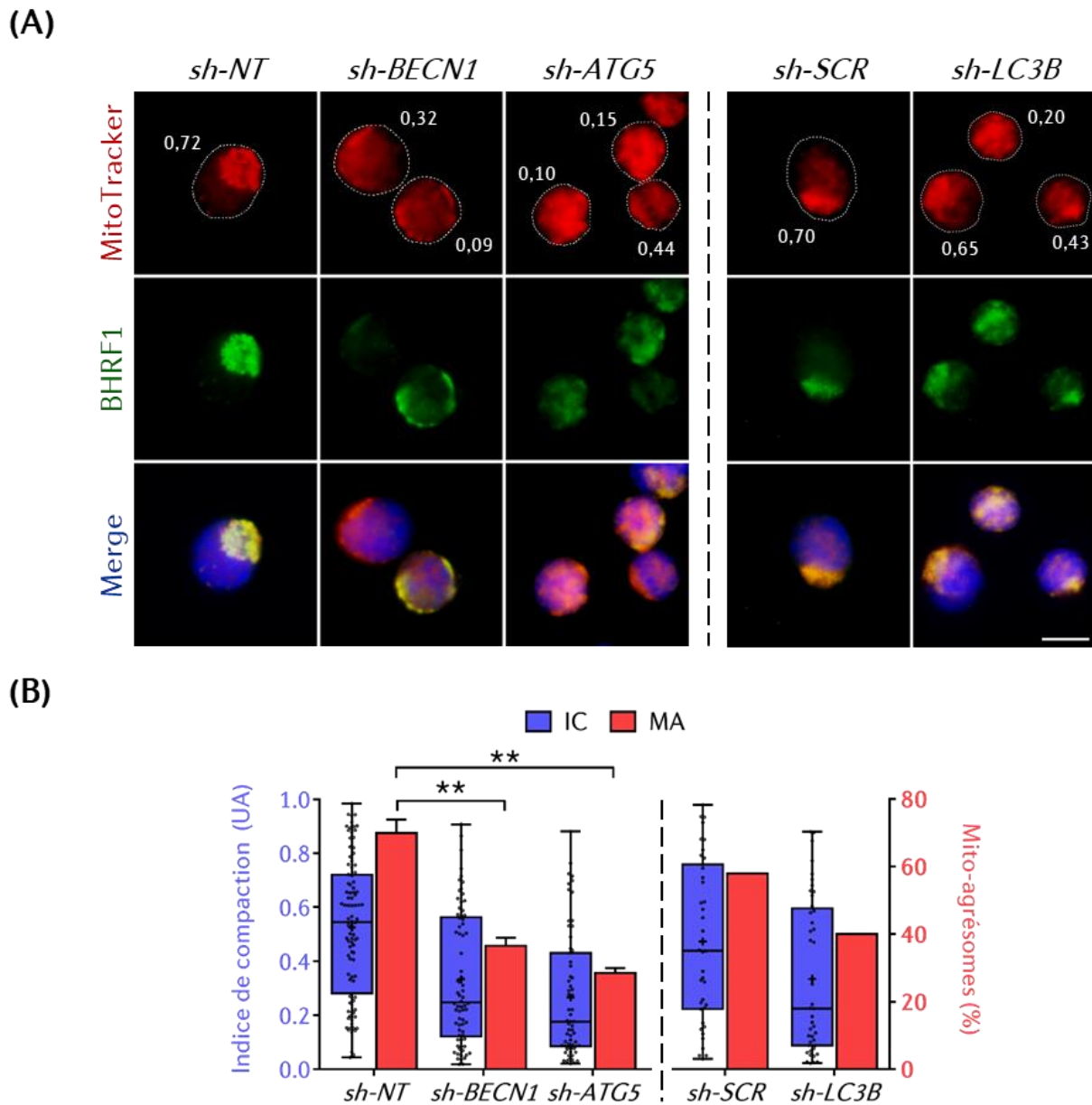


Figure 49 | L'extinction de gènes autophagiques prévient la formation des mito-agrèsomes

**(A)** Images de microscopie à épifluorescence de cellules P3HR-1 contrôles (*sh-NT* et *SCR*) ou déficientes pour diverses protéines autophagiques (*sh-BECN1*, *ATG5* et *LC3B*). Les mitochondries sont marquées par du MitoTracker et l'expression de BHRF1 est détectée en utilisant un anticorps spécifique. Les noyaux sont colorés par du DAPI. Pour chaque cellule, le contour a été dessiné et la valeur de l'IC mitochondrial est donnée. Barre = 20  $\mu$ m. **(B)** Quantification de l'IC ainsi que du taux de mito-agrèsomes (MA) pour chaque condition. Les résultats sont donnés pour trois expériences indépendantes ( $n = 40$  cellules), sauf avec les lignées *sh-SCR* et *LC3B* où seule une expérience a été réalisée. Analyse statistique : \*\*  $P < 0.01$  (Test ANOVA).

### V. 3. C. (e) L'autophagie est cytoprotectrice dans les cellules P3HR-1

Au vu de la résistance à l'apoptose ainsi que du rôle pro-survie déjà attribué à BHRF1 dans les cellules P3HR-1 (Watanabe *et al.*, 2010), nous avons voulu étudier si l'autophagie jouait un rôle dans ce phénotype. En effet, de manière complémentaire à son activité anti-apoptotique, BHRF1 pourrait



induire une autophagie cytoprotectrice vis-à-vis de la mort induite par apoptose. Dans ce but, nous avons étudié la viabilité de cellules déficientes en autophagie à la suite de traitements pro-apoptotiques. Pour cela, les cellules P3HR-1 *sh-NT* ou *sh-BECN1* ont été traitées par de l'étoposide (ETP) ou de la staurosporine (STS), puis la viabilité des cellules a été estimée par un test MTT qui permet de mesurer la viabilité cellulaire (Figure 50.A).

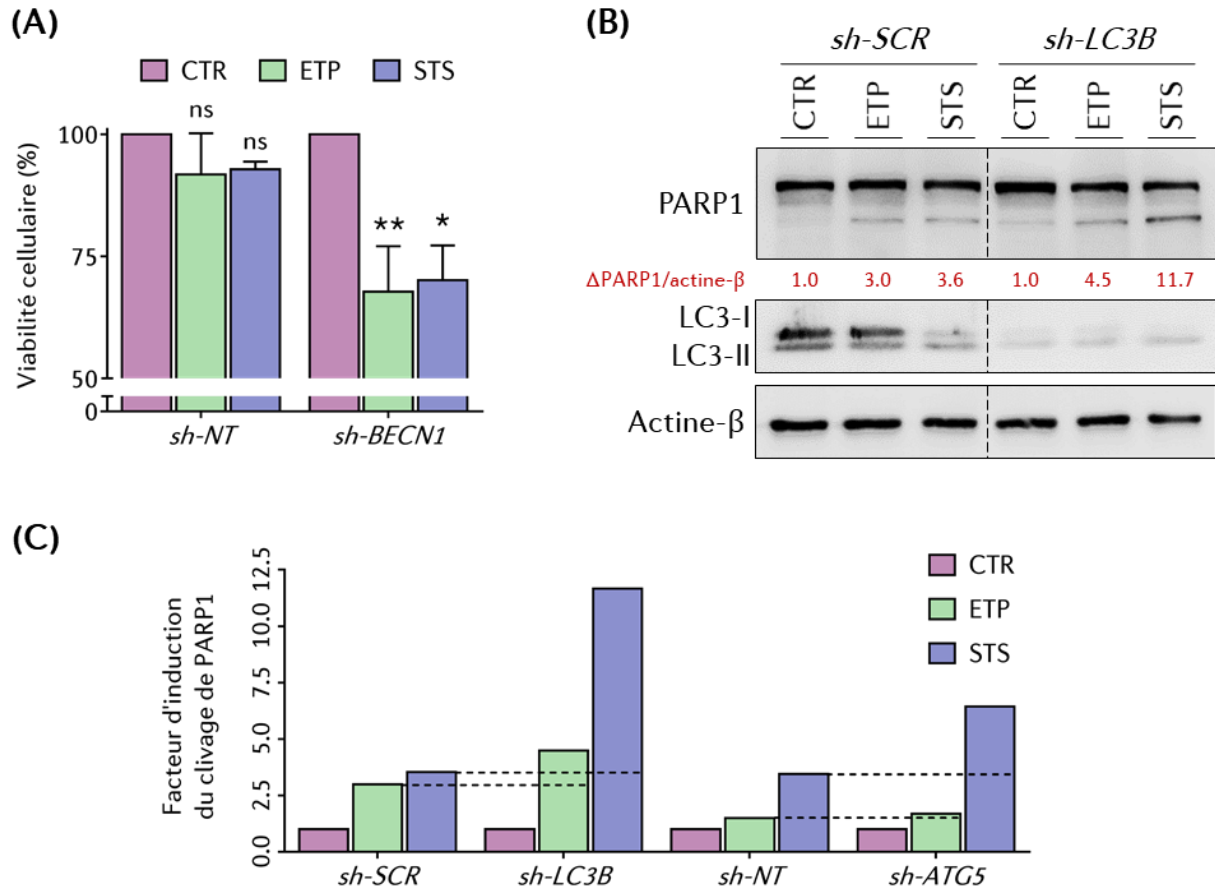


Figure 50 | L'autophagie est cytoprotectrice pour les cellules P3HR-1

**(A)** Évaluation de la viabilité des cellules P3HR-1 *sh-BECN1* et *sh-NT* par un test MTT. Les cellules sont traitées par de l'étoposide (ETP) ou de la staurosporine (STS) afin d'induire l'apoptose. La viabilité des cellules est normalisée par rapport à la condition non traitée (CTR) de chaque lignée. Les résultats sont donnés pour trois expériences indépendantes. Analyse statistique : ns, non significatif ; \*  $P < 0.05$  ; \*\*  $P < 0.01$  (Test ANOVA). **(B-C)** Analyse par immunoblot du clivage de PARP1 dans des cellules P3HR-1 déficientes en autophagie (*sh-LC3B* et *sh-ATG5*) et traitées par des inducteurs de l'apoptose. **(B)** Exemple d'immunoblot sur les cellules P3HR-1 *sh-ATG5*. Les ratios d'expression de la forme clivée de PARP1 ( $\Delta$ PARP1) sont normalisés par rapport à la condition non traitée (CTR) de chaque lignée. **(C)** Représentation graphique du facteur d'induction du clivage de PARP1 dans les différentes lignées cellulaires testées.

Tout d'abord, en accord avec ce qui était décrit précédemment, le traitement de cellules contrôles (*sh-NT*) par de l'ETP ou de la STS n'induit pas la mort des cellules (Figure 50.A). Les cellules sont donc bien résistantes à l'apoptose induite par drogues. En revanche, en absence de BECN1 on observe que les traitements induisent une diminution significative de la viabilité cellulaire (Figure 50.A). Ainsi, un

défaut d'autophagie semble resensibiliser les cellules à la mort induite par apoptose. Il serait intéressant de faire la même expérience avec les cellules déficientes pour ATG5 ou LC3B.

Afin de vérifier si cette diminution de la viabilité est bien due à l'entrée en apoptose des cellules déficientes en autophagie, nous avons analysé par immunoblot le clivage protéolytique de PARP1 (*Poly[ADP-Ribose] Polymerase 1*). En effet, PARP1 fait partie des substrats clivés par la caspase 3, lorsque l'apoptose est induite (D'Amours *et al.*, 2001). Ainsi, dans les cellules contrôles (*sh-SCR*) on détecte assez peu la forme clivée de PARP1 après traitement par l'ETP ou la STS (Figure 50.B). En revanche, dans les cellules déficientes en autophagie (*sh-LC3B*), la forme clivée de PARP1 est davantage détectée après traitement, démontrant une entrée en apoptose (Figure 50.B). Le même résultat s'observe lorsque la déficience en autophagie est due à un défaut d'ATG5 (Figure 50.C). Il serait intéressant de le confirmer dans les cellules P3HR-1 *sh-BECN1*.

L'ensemble de ces résultats nous montre que l'autophagie induite par BHRF1 joue bien un rôle cytoprotecteur, en inhibant l'apoptose induite pharmacologiquement dans les cellules P3HR-1.

### V. 3. D Conclusions, discussions et perspectives

Il était connu que les cellules de LB EBV<sup>+</sup> en L-Wp présentent une résistance à l'apoptose accrue, rendant les cancers plus difficiles à traiter (Kelly *et al.*, 2009). Depuis de nombreuses années, l'implication de BHRF1 en tant que facteur pro-survie est connue (Watanabe *et al.*, 2010). Initialement, cette augmentation de la survie des cellules était entièrement associée à l'activité anti-apoptotique de BHRF1. Cependant, grâce à nos travaux préliminaires, nous envisageons la possibilité que les nouvelles fonctions de BHRF1 que nous avons identifiées s'inscrivent également dans un processus pro-survie et suggèrent un rôle pour BHRF1 dans la lymphomagenèse associée à l'EBV.

#### V. 3. D. (a) L'autophagie cytoprotectrice est-elle induite par BHRF1 ?

Nous démontrons ici que l'inhibition de l'autophagie, par la déplétion de protéines ATG, permet de resensibiliser les cellules P3HR-1 à la mort, notamment induite par un traitement à la STS (Figure 50). L'autophagie joue donc un rôle cytoprotecteur. Étant donné que l'extinction de BHRF1 réduit le flux autophagique (Figure 47) ainsi que la survie cellulaire (Watanabe *et al.*, 2010), nous pensons que l'autophagie cytoprotectrice observée serait due à l'expression de BHRF1.

Afin d'explorer cette hypothèse, il nous faudra dans un premier temps étayer les résultats montrant que BHRF1 possède une activité pro-autophagique dans les cellules P3HR-1. Notre hypothèse étant que BHRF1 induirait l'autophagie via son interaction avec BECN1 (Vilmen *et al.*, 2020), nous

envisageons de réaliser des expériences de co-immunoprécipitation afin de vérifier si cette interaction existe dans les cellules P3HR-1.

#### V. 3. D. (b) L'interaction BHRF1-BECN1 importante pour l'autophagie cytoprotectrice ?

En 2009 les travaux de Desbien *et al.*, démontrent que l'inhibition de l'apoptose par BHRF1 passerait par son interaction avec BIM (Desbien *et al.*, 2009). Pour le montrer différents résidus de la boucle hydrophobe de BHRF1 (Leu-98, Gly-99 et Arg-100), impliqués dans l'interaction avec les protéines à domaines BH3, ont été mutés et les auteurs ont observé une diminution de la résistance à l'apoptose chez ces mutants. L'effet est même potentialisé lorsque les trois résidus sont simultanément mutés (mutations 3XA). De plus, BHRF1 n'interagit qu'avec une faible quantité de protéines BIM par rapport à la quantité de BIM induite lors de l'apoptose (Desbien *et al.*, 2009). Les récents travaux de Fitzsimmons *et al.*, montrent qu'au cours du LB, BHRF1 induirait la chimiorésistance et la lymphomagenèse même en absence de BIM, confirmant que cette interaction n'explique pas à elle seule la fonction protectrice de BHRF1 vis-à-vis de la mort (Fitzsimmons *et al.*, 2020). En effet, BHRF1 interagit également avec PUMA et BAK suggérant que son activité dépend de l'interaction avec plusieurs membres de la famille BCL-2 (Fitzsimmons *et al.*, 2020).

Nous pensons que les mutations 3XA pourraient altérer les autres fonctions de BHRF1. Pour cela nous avons reproduit au laboratoire le mutant 3XA et nous observons que son expression ectopique dans des cellules HeLa diminue significativement la proportion de mito-agrésomes (Figures 51.A et B). Selon notre modèle, la formation des mito-agrésomes par BHRF1 est nécessaire à l'inhibition de l'immunité innée. Nous confirmons ce lien puisque le mutant BHRF1-3XA ne bloque plus la production d'IFNs, contrairement à la version WT de BHRF1 (Figure 51.C).

L'une des hypothèses pouvant expliquer la perte du phénotype serait que la mutation des résidus Leu-98, Gly-99 et Arg-100 conduirait à la perte d'interaction de BHRF1 avec BECN1, une protéine *BH3-only*, tout comme BIM et PUMA. Nous envisageons donc d'étudier par co-immunoprécipitation si les mutations 3XA de BHRF1 impactent son interaction avec BECN1, ainsi que son activité pro-autophagique. Si tel est le cas, le regain de sensibilité à la mort des cellules exprimant BHRF1-3XA pourrait également passer par une diminution de l'autophagie cytoprotectrice consécutive à cette perte d'interaction.

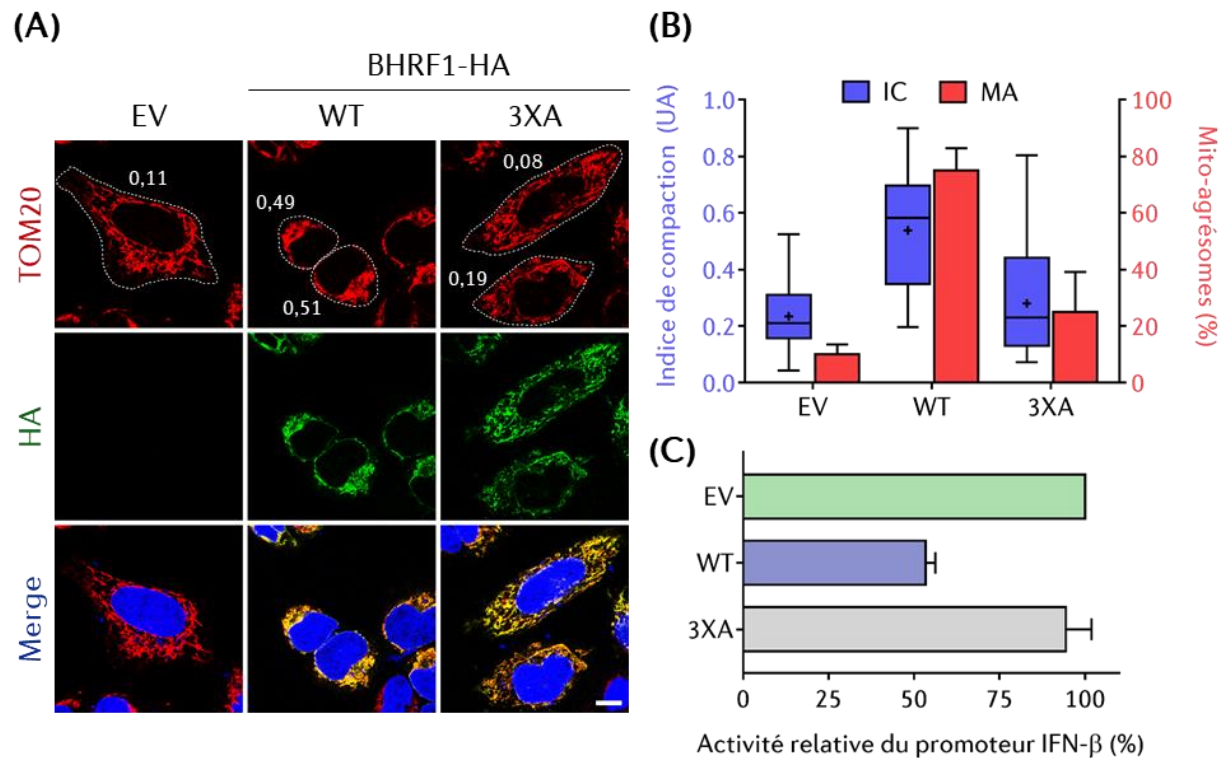


Figure 51 | Les mutations 3XA de BHRF1 entraînent sa perte de fonctions

**(A)** Images de microscopie confocale montrant des cellules HeLa transfectées pour 24 h par un plasmide codant BHRF1-WT, BHRF1-3XA ou un vecteur vide (EV). Les mitochondries sont immunomarquées par un anticorps anti-TOM20 et les cellules exprimant BHRF1-HA sont détectées grâce à un anticorps anti-HA. Les noyaux sont colorés par du DAPI. Pour chaque cellule, le contour a été dessiné et la valeur de l'IC mitochondrial est donnée. Barre = 20 µm. **(B)** Quantification de l'IC ainsi que du taux de mito-agrèsomes (MA) pour chaque condition (n = 40 cellules). **(C)** Test luciférase de mesure de l'activité du promoteur IFN-β sur des cellules HEK293T transfectées pour 24 h par un plasmide codant BHRF1-WT, BHRF1-3XA ou un EV. L'activité relative a été déterminée par rapport à la condition contrôle (EV). Les résultats sont donnés pour deux expériences indépendantes.

### V. 3. D. (c) BHRF1 bloque-elle l'apoptose en induisant la mitophagie ?

Nous observons qu'au cours de la L-Wp, l'expression de BHRF1 induit des mito-agrèsomes (Figure 45). Leur présence ne semble pas délétère pour le devenir des cellules, puisqu'elles présentent une importante résistance à la mort. De plus, cette agrégation des mitochondries permettrait l'élimination d'une part d'entre elles par autophagie. En effet, l'extinction de DRP1 prévient la formation des mito-agrèsomes et augmente l'expression du marqueur mitochondrial TOM20, suggérant une perte de la dégradation (Figures 46 et 47). Au vu de ces résultats et de nos connaissances sur le mode d'induction de la mitophagie par BHRF1, nous pensons qu'au cours de la L-Wp, BHRF1 induirait une mitophagie constitutive.

En lien avec l'induction d'une autophagie cytoprotectrice, cette stimulation de la mitophagie pourrait participer à l'amélioration de la survie cellulaire en bloquant la voie intrinsèque de l'apoptose, une connexion précédemment démontrée (Bloemberg & Quadrilatero, 2019). En effet, la mitophagie

permettrait l'élimination de mitochondries potentiellement endommagées et inductrices de médiateurs pro-apoptotiques. Ainsi, BHRF1 disposerait d'un autre moyen d'inhibition de l'apoptose, indirect cette fois, via la formation de mito-agrèsome permettant d'induire la mitophagie.

#### V. 3. D. (d) BHRF1 inhibe-elle l'immunité innée lors de la latence Wp ?

La mitophagie induite par BHRF1 est provirale puisque nous démontrons qu'elle réduit l'induction de la réponse IFN de type I dans les cellules BHRF1<sup>+</sup> (Glon *et al.*, 2021; Vilmen *et al.*, 2020). Ainsi, il serait envisageable que l'expression de BHRF1 dans les cellules P3HR-1 puisse inhiber les défenses antivirales de la cellule afin d'assurer la maintenance de l'EBV. Nous souhaitons donc étudier le niveau de l'immunité innée des cellules P3HR-1 déficientes pour BHRF1, par comparaison aux cellules contrôles. Pour cela, nous envisageons d'infecter les cellules par le virus Sendai, une approche classiquement utilisée pour activer la voie RLR de l'immunité innée, puis d'extraire les ARN pour y réaliser une RT-PCR permettant de mesurer l'expression des IFNs de type I. Nous évaluerons également la production des IFNs de type I par ELISpot (*Enzyme-Linked ImmunoSpot*). Ces approches devraient nous permettre d'évaluer si l'expression de BHRF1 en L-Wp impacte le niveau de production des IFNs de type I.

#### V. 3. D. (e) BHRF1 un facteur accélérant la lymphomagenèse ?

BHRF1 est une protéine initialement associée au cycle productif de l'EBV au cours duquel son rôle est de faciliter la progression du cycle viral. Cependant, BHRF1 s'exprime également au cours de certains programmes de latence, particulièrement en L-Wp, où ses multiples fonctions permettent d'améliorer la survie cellulaire (Figure 52). En effet, BHRF1 interagit avec diverses protéines pro-apoptotiques afin de bloquer la voie intrinsèque de l'apoptose (Kvansakul *et al.*, 2010). De plus, BHRF1 inhiberait également l'entrée en apoptose via l'induction d'une autophagie dite cytoprotectrice. Enfin, la mitophagie qui serait induite par BHRF1 constituerait un troisième moyen de contrôler l'apoptose en éliminant des mitochondries potentiellement génératrices de signaux pro-apoptotiques. Cette capacité de BHRF1 à agir sur plusieurs niveaux dans l'inhibition de l'apoptose renforce son rôle dans la lymphomagenèse associée aux LB EBV<sup>+</sup>.

Les IFNs de type I sont des cytokines largement documentées pour leurs propriétés antivirales, mais elles bénéficient également de propriétés anti-prolifératives et anti-tumorales (Bekisz *et al.*, 2010). Nous montrons que BHRF1 bloque la production de telles molécules en induisant la mitophagie (Glon *et al.*, 2021; Vilmen *et al.*, 2020). Si nous parvenons à démontrer le même effet inhibiteur de BHRF1 pendant la latence, cela constituerait un mécanisme supplémentaire pour l'EBV favorisant la lymphomagenèse. En effet, BHRF1 favoriserait d'une part la survie et d'autre part la prolifération cellulaire, deux mécanismes impliqués dans la biologie des cancers (Figure 52).

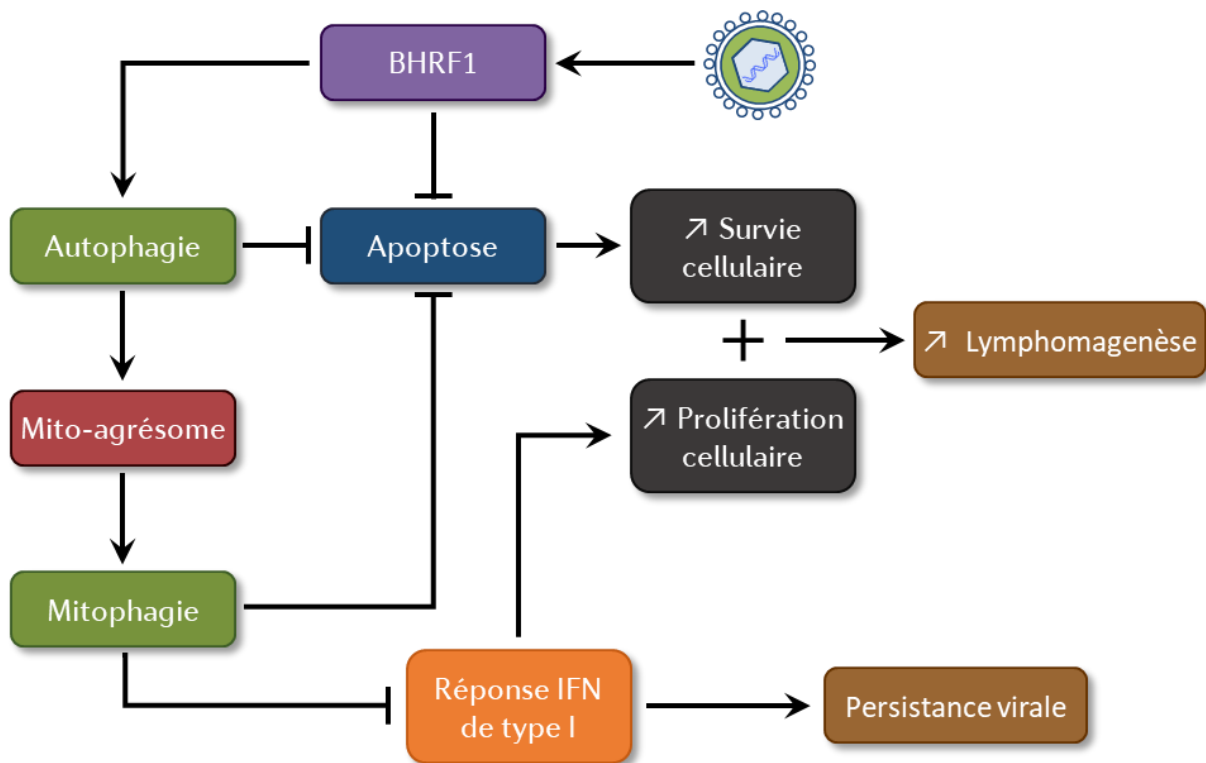


Figure 52 | **Modèle des fonctions potentielles de BHRF1 au cours de la L-Wp**

L'EBV exprime au cours de la L-Wp la protéine BHRF1 lui permettant d'augmenter la chimiorésistance et la lymphomagenèse. En effet, BHRF1 améliore la survie cellulaire en inhibant l'apoptose par différents mécanismes. Premièrement décrit, BHRF1 interagit avec certaines protéines *BH3-only* afin d'inhiber directement l'induction de la voie intrinsèque de l'apoptose. Plus récemment, nous avons montré que BHRF1 possède également une activité pro-autophagique, qui serait cytoprotectrice vis-à-vis de l'apoptose. Enfin, BHRF1 induit la formation de mito-agrèsomes constituant la première étape à l'induction de la mitophagie. Cette induction pourrait participer au contrôle de l'apoptose en éliminant des mitochondries potentiellement endommagées. De plus, la mitophagie induite par BHRF1 inhibe l'induction de la réponse IFN de type I. Cette inhibition revêtirait une double fonction : assurer la persistance virale et augmenter la prolifération cellulaire. L'ensemble de ces fonctions convergent vers la lymphomagenèse, permettant de mieux comprendre la pathogenèse des LB associés à l'EBV.

#### V. 3. D. (f) Ouverture vers de nouvelles perspectives thérapeutiques contre le LB ?

Pour conclure, BHRF1 est une protéine multifonctionnelle qui, au cours de LB EBV<sup>+</sup> particulièrement agressifs, est associée à des processus de chimiorésistance et de lymphomagenèse (Fitzsimmons *et al.*, 2020; Kelly *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2010). BHRF1 constitue donc une cible potentielle dans le traitement de ces LB. Dans ce contexte, un peptide antagoniste de BHRF1, appelé BINDI, a d'ores et déjà été mis au point, *in silico* (Procko *et al.*, 2014). Ce peptide reconnaît la poche hydrophobe de BHRF1 et établit des contacts supplémentaires avec cette dernière afin d'augmenter l'affinité et la spécificité de l'interaction. De plus, les auteurs ont montré que BINDI permet de resensibiliser les cellules cancéreuses EBV<sup>+</sup> à l'apoptose et d'inhiber la croissance des lymphomes dans un modèle de xénotransgreffe de LB EBV<sup>+</sup> (Procko *et al.*, 2014). Ces résultats montrent pour la première fois que la mise au point d'une molécule BH3-mimétique ciblant BHRF1 serait intéressante dans le traitement du LB.



Une telle molécule pourrait effectivement présenter en clinique une bonne tolérance puisqu'elle affecterait uniquement les cellules infectées par le virus, conduisant à inhiber les activités anti-apoptotiques et pro-autophagiques de BHRF1, permettant ainsi la mort des cellules cancéreuses.

Autrement, il est largement admis que l'autophagie joue un rôle majeur dans le développement de différents type de cancer, via ses propriétés pro- ou anti-tumorales (Galluzzi *et al.*, 2015). Par conséquent, suivant le contexte, inhiber ou stimuler l'autophagie peut constituer un levier majeur sur lequel s'appuyer afin de lutter contre les cancers (Mulcahy Levy *et al.*, 2017; Pérez-Hernández *et al.*, 2019). Au vu du rôle prépondérant que jouerait l'autophagie dans les phénotypes induits par BHRF1, notamment pour l'amélioration de la survie cellulaire, il serait envisageable qu'utiliser des inhibiteurs autophagiques puisse avoir un intérêt dans le traitement du LB, en resensibilisant les cellules infectées à la mort induite par chimiothérapie.

En essai clinique, la chloroquine était initialement le seul inhibiteur autophagique utilisé en association avec des molécules anti-cancéreuses (Solomon & Lee, 2009). Cet inhibiteur des enzymes lysosomales, donc des étapes tardives de l'autophagie, qui est utilisé en clinique chez les patients depuis des années, présente peu de toxicité, mais sa spécificité et sa capacité à moduler l'autophagie au sein des tumeurs reste faible. Le développement de nouveaux inhibiteurs de l'autophagie est donc un enjeu important pour l'industrie pharmaceutique. À l'heure actuelle, plusieurs inhibiteurs des étapes précoces de l'autophagie sont en phase d'étude clinique, ouvrant des perspectives quant à l'utilisation future de nouvelles combinaisons thérapeutiques dans le traitement des cancers (Chude & Amaravadi, 2017; Mulcahy Levy & Thorburn, 2020). L'utilisation de ce type d'inhibiteurs, contrairement à la chloroquine, pourrait être intéressante dans le traitement des LB EBV<sup>+</sup>. En effet, le traitement par la chloroquine de cellules BHRF1<sup>+</sup> ne permet pas de prévenir toutes les fonctions induites par l'expression de BHRF1, puisque par exemple les mito-agrèsomes continuent d'être observés, supposant que la chloroquine ne sensibiliserait pas à la mort les cellules de LB EBV<sup>+</sup>. En revanche, nous avons observé que l'utilisation d'inhibiteurs des étapes précoces de l'autophagie, comme la 3-MA, prévient totalement la formation des mito-agrèsomes dans des cellules BHRF1<sup>+</sup>, en contexte de transfection ou infectieux (réactivation et latence). En conclusion, si la bonne tolérance des inhibiteurs précoces de l'autophagie est vérifiée lors des essais cliniques, ce type de molécules pourrait être à considérer pour le traitement du LB EBV<sup>+</sup> en L-Wp.

## VI Conclusions générales

Au cours de cette thèse, nous nous sommes attachés à mieux caractériser le rôle de la protéine BHRF1 de l'EBV en utilisant dans un premier temps un système artificiel, où nous exprimions ectopiquement la protéine virale dans des cellules épithéliales humaines. Dans un second temps, nous avons souhaité vérifier si ces fonctions de BHRF1 étaient retrouvées en contexte infectieux, lors de la réactivation de l'EBV et au cours de la latence virale. L'ensemble de ce travail de thèse aura permis au laboratoire d'identifier de nouvelles fonctions pour BHRF1 qui, additionnées à celles déjà connues, pourraient permettre d'éclaircir la pathogenèse des LB EBV<sup>+</sup>. Nous espérons également qu'à l'avenir ces découvertes pourraient servir à la recherche de nouvelles thérapeutiques dans le traitement de ces cancers.

### ***BHRF1 une protéine multifonctionnelle ...***

BHRF1 est un homologue viral de BCL-2 initialement connu pour son activité anti-apoptotique (Altmann & Hammerschmidt, 2005; Henderson *et al.*, 1993), sans qu'aucune information n'ait été publiée quant à son rôle au niveau de l'autophagie. Notre laboratoire s'intéressant au détournement de l'autophagie par les *Herpesviridae*, le projet fut initié par le questionnement suivant : « les vBCL-2 de l'EBV sont-ils impliqués dans la régulation autophagique ? ». La réponse à cette question fut explorée par Gabriel Siracusano, au cours de son post-doc, et Géraldine Vilmen, au cours de sa thèse, qui ont démontré une activité pro-autophagique de BHRF1. Ce résultat était inattendu car, au vu de son homologie avec BCL-2, il était plutôt supposé que BHRF1 puisse bloquer l'autophagie (Cirone, 2018). Nous avons également démontré que BHRF1 interagit avec BECN1 et nous proposons que cette interaction explique la stimulation de l'autophagie, une hypothèse qui devra être confirmée.

Tout comme BCL-2, BHRF1 possède une localisation mitochondriale (Bellows *et al.*, 2002; Hickish *et al.*, 1994). Cette localisation de BHRF1 entraîne une modification profonde de la morphodynamique des mitochondries. Nous observons en effet que BHRF1 induit la formation de mito-agrèsomes, caractérisés par la fragmentation des mitochondries et leur agrégation dans la région périnucléaire. Nous avons caractérisé ce phénotype mitochondrial en nous intéressant dans un premier temps au phénomène de fission mitochondriale. Nous avons identifié qu'elle dépend de l'activité de DRP1 puisqu'en déplaçant cette protéine, BHRF1 n'impacte plus la morphodynamique mitochondriale. Nous aimerions à terme identifier précisément par quel moyen BHRF1 active DRP1. Concernant l'agrégation périnucléaire des mitochondries fragmentées, nous avons démontré qu'elle dépend du réseau de MTs et qu'elle correspond à un mouvement rétrograde dépendant des dynéines. De plus, nous avons identifié que BHRF1 induit l'hyperacétylation des MTs en activant l'acétyltransférase ATAT1. Il est déjà documenté que cette MPT permet le recrutement des moteurs moléculaires aux MTs (Dompierre *et*

*al.*, 2007; Mackeh *et al.*, 2013; Reed *et al.*, 2006). Puisque nous observons qu'en bloquant l'hyperacétylation nous perdons le phénotype mitochondrial, il est probable que l'hyperacétylation de la tubuline  $\alpha$  permette le recrutement des dynéines afin d'induire le phénotype. Cependant, pour l'heure nous n'avons pas mis en évidence le moyen par lequel les mitochondries sont prises en charge par ces moteurs moléculaires. Ce mécanisme pourrait dépendre de Miro1/2 ou bien d'un complexe multiprotéique impliquant BHRF1.

Nous avons pu mettre en évidence l'existence d'un lien entre le phénotype mitochondrial induit par BHRF1 et l'autophagie, puisqu'en inhibant pharmacologiquement ce processus nous n'observons plus de mito-agrèsomes. Ceci s'expliquerait notamment par la perte d'hyperacétylation des MTs. Il serait donc intéressant d'explorer à quel niveau l'autophagie intervient pour permettre l'hyperacétylation. L'hypothèse la plus probable serait que BHRF1 utilise l'autophagie pour l'activation d'ATAT1.

Au vu du double rôle de BHRF1 sur l'induction de l'autophagie et sur la morphodynamique mitochondriale, nous avons pu démontrer que BHRF1 induit de la mitophagie. En effet, nous observons la séquestration des mitochondries dans des vésicules autophagiques, ainsi que la dégradation d'une part d'entre elles. Le mécanisme exact permettant cette forme de mitophagie n'est pas caractérisé, mais nous souhaiterions explorer l'implication potentielle des récepteurs de l'autophagie sélective.

De manière générale, la mitophagie est essentielle à la cellule pour le maintien de son homéostasie. Concernant la mitophagie induite par BHRF1, elle s'avère être plutôt favorable pour l'EBV. En effet, la mitochondrie agit en tant que plateforme de signalisation des réponses immunitaires innées de la cellule (Arnoult *et al.*, 2011; West *et al.*, 2011). Nous avons démontré que la stimulation de la mitophagie par BHRF1 diminue significativement l'induction de la production d'IFN de type I. Initialement, nous pensions que l'étape de dégradation était fondamentale pour l'inhibition de l'immunité antivirale, mais en réalité, il s'avère que ce serait plutôt la séquestration mitochondriale qui empêcherait la transduction du signal. Il nous faudra par la suite caractériser à quelle étape exacte intervient BHRF1 dans ce contrôle de l'immunité innée.

### ***... dont les nouvelles fonctions sont retrouvées en contexte infectieux***

Au vu des multiples fonctions que nous démontrons pour BHRF1, il était intéressant d'étudier si elles étaient transposables en contexte infectieux. BHRF1 s'exprime au cours des étapes précoces du cycle productif (Pearson *et al.*, 1987). Il a donc été intéressant d'observer que lors de la réactivation de l'EBV, quel que soit le tropisme cellulaire, des mito-agrèsomes se forment dépendamment de l'expression de BHRF1. De plus, à cette étape du cycle, BHRF1 aurait une activité pro-autophagique, suggérant l'induction de la mitophagie. Si notre hypothèse est vérifiée, en plus d'inhiber l'apoptose, l'expression

de BHRF1 apporterait un moyen supplémentaire à l'EBV d'assurer sa réplication en bloquant la synthèse de cytokines antivirales via l'induction de la mitophagie.

En latence, BHRF1 s'exprime lors du programme restreint-Wp (Fitzsimmons & Kelly, 2017) au cours duquel elle induit des mito-agrésomes, qui permettraient l'induction d'une mitophagie constitutive. Il faudrait davantage s'intéresser à cette possibilité puisqu'elle pourrait participer à la persistance de l'EBV en réduisant la production des cytokines antivirales. Les cellules de LB, infectées par un EBV en L-Wp, sont connues pour leur plus haute résistance à la mort cellulaire (Garibal *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2009). Cette faculté serait, entre autres, associée à l'activité anti-apoptotique de BHRF1 (Fitzsimmons *et al.*, 2020). Nos recherches démontrent que BHRF1 induirait également une autophagie cytoprotectrice vis-à-vis de l'apoptose, appuyant les propriétés pro-survie de BHRF1 dans ce modèle.

Ce travail de thèse apporte donc de nouveaux éléments quant au rôle prépondérant que joue BHRF1 dans la chimiorésistance et la lymphomagenèse des LB EBV<sup>+</sup>. Ainsi, l'activité pro-autophagique de BHRF1 et son implication dans l'augmentation de la survie des cellules cancéreuses pourraient ouvrir la porte à de nouvelles pistes thérapeutiques, ciblant l'autophagie, dans le traitement des LB résistants aux traitements.

**Données supplémentaires**

## VII Annexe

Cette annexe correspond à la rédaction d'une nouvelle intitulée « La mitophagie : une stratégie du virus d'Epstein-Barr pour échapper à l'immunité innée » et publiée dans la revue *Médecine/science* en 2020.

### NOUVELLE

#### La mitophagie : une stratégie du virus d'Epstein-Barr pour échapper à l'immunité innée

Damien Glon, Marion Lussignol, Audrey Esclatine

Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institut de biologie intégrative de la cellule (I2BC), 5 rue Jean-Baptiste Clément, 91198 Gif-sur-Yvette, France.  
[audrey.esclatine@universite-paris-saclay.fr](mailto:audrey.esclatine@universite-paris-saclay.fr)

> Les virus ont développé différentes stratégies pour échapper à l'immunité cellulaire afin d'assurer leur survie au cours de l'évolution. Les virus de la famille des *Herpesviridae* en sont un bon exemple : ces virus persistent à vie dans l'organisme hôte grâce à leur faculté à entrer dans une phase de latence dans les cellules qu'ils infectent. Sous l'effet de divers stress, ces virus peuvent ensuite se réactiver et reprendre un cycle productif. Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un *γ-herpesvirinae* ubiquitaire, car on estime qu'environ 90 % de la population mondiale a développé des anticorps contre ce virus. L'EBV infecte principalement les cellules épithéliales de l'oropharynx ainsi que les lymphocytes B. Il est l'agent causal de la mononucléose infectieuse, et peut également être responsable de certains cancers, comme le lymphome de Burkitt ou le carcinome du nasopharynx.

La protéine BHRF1 (*BamHI right forward 1*), codée par l'EBV, est un homologue de Bcl-2, une protéine impliquée dans divers processus cellulaires, comme

l'apoptose ou l'autophagie [1]. La première fonction connue de BHRF1 est sa capacité à bloquer l'apoptose, en relation avec sa localisation mitochondriale [2], mais nous avons récemment montré, avec nos collaborateurs, que BHRF1 perturbe aussi la dynamique et le fonctionnement des mitochondries [3]. Les mitochondries sont des organites dynamiques qui subissent des processus de fission et de fusion afin de former un réseau et de maintenir leur homéostasie [4]. Lorsque le réseau mitochondrial est altéré, certaines fonctions mitochondriales le sont également. Les mitochondries jouent un rôle important lors de l'induction de l'immunité innée antivirale [5]. La protéine virale BHRF1, en agissant sur les mitochondries, est capable d'inhiber cette immunité [3].

#### BHRF1 perturbe l'organisation des mitochondries pour former des mito-agrèsomes

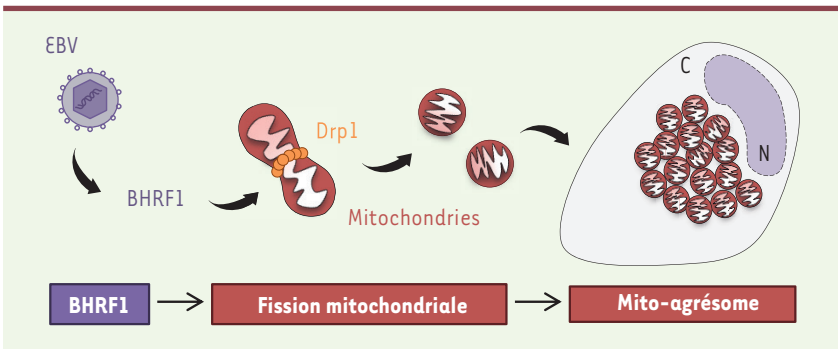
Lorsque la protéine BHRF1 est exprimée dans des cellules épithéliales, elle

entraîne d'importantes modifications de la longueur des mitochondries et de leur organisation dans la cellule. En effet, BHRF1 induit la fragmentation des mitochondries par un processus de fission impliquant, entre autres, la protéine Drp1 (*dynamamin-related protein 1*) [6]. BHRF1 induit également l'agrégation des mitochondries à proximité du noyau, sous la forme de structures appelées mito-agrèsomes (*Figure 1*). Cette agrégation des mitochondries est aussi observée en contexte infectieux, lorsque le cycle productif de l'EBV est réactivé dans des cellules épithéliales ou des lymphocytes B infectés par le virus de manière latente.

#### Les mito-agrèsomes permettent l'induction de la mitophagie

L'autophagie est un mécanisme, conservé chez tous les organismes eucaryotes, qui permet la dégradation de constituants cellulaires, tels que des protéines de longue durée de vie et des organites. Elle se déroule en plusieurs





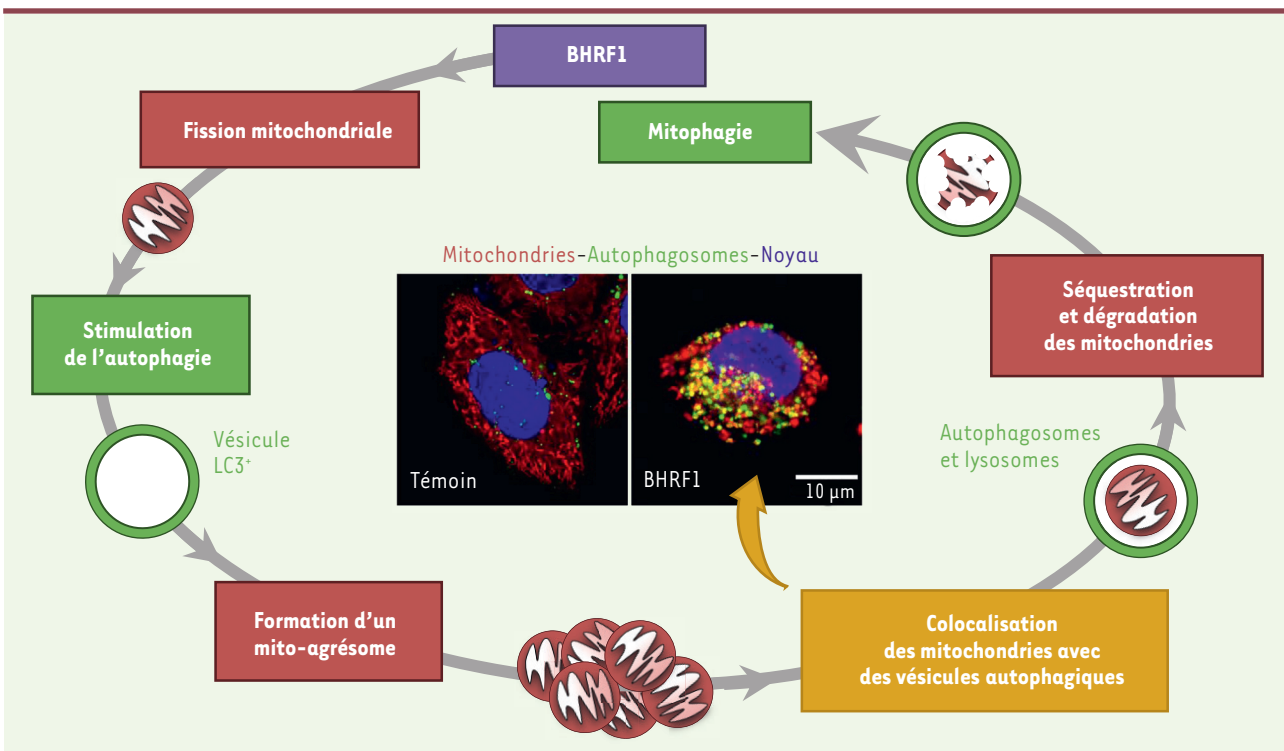
**Figure 1. BHRF1 induit la formation de mito-agrésomes.** BHRF1, une protéine codée par l'EBV, se localise au niveau des mitochondries pour en modifier l'organisation. Cette protéine virale induit tout d'abord la fragmentation des mitochondries en recrutant et activant Drp1. Elle entraîne ensuite l'agrégation des mitochondries à proximité du noyau, formant ainsi des mito-agrésomes. N : noyau ; C : cytoplasme.

étapes, et implique des vésicules à double membrane (autophagosomes) capables d'englober des portions de cytoplasme, qui seront dégradées à la suite de la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (→). Des protéines de la famille Bcl-2 sont connues pour

(→) Voir le numéro thématique *Autophagie*, m/s n° 3, mars 2017, pages 213-340

moduler l'autophagie. La plupart l'inhibent, comme Bcl-2 ou Bcl-X<sub>L</sub>, en interagissant avec le régulateur bécline 1, tandis que d'autres l'activent, comme BAD, Bim ou PUMA [1]. BHRF1, qui possède deux domaines d'homologie à Bcl-2, stimule l'autophagie, entraînant une importante accumulation de vésicules autophagiques [3]. Cette induction de l'auto-

phagie est nécessaire pour la formation des mito-agrésomes. L'homéostasie mitochondriale implique le processus autophagique, notamment pour dégrader des mitochondries surnuméraires ou endommagées [7]. Cette dégradation sélective des mitochondries est appelée mitophagie [8]. Certaines études ont montré que la fission mitochondriale ainsi que la formation de



**Figure 2. BHRF1 induit la mitophagie.** À la suite de la fission mitochondriale, BHRF1 stimule l'autophagie en accumulant des autophagosomes (vésicules LC3<sup>+</sup>), ce qui est nécessaire à la formation des mito-agrésomes. Dans ces mito-agrésomes, une partie des mitochondries est contenue dans des vésicules qui ont un pH acide. En microscopie confocale, on observe que certaines mitochondries sont colocalisées avec des autophagosomes (marquage jaune sur la photo ; échelle = 10 µm) et des lysosomes. Les mitochondries sont donc contenues dans des vésicules autophagiques. De plus, cette séquestration des mitochondries est suivie de la dégradation d'une partie d'entre elles.

mito-agrésomes facilitaient l'induction de la mitophagie [9, 10]. Compte tenu de l'impact de BHRF1 sur les mitochondries et l'autophagie, une potentielle activation de la mitophagie par BHRF1 a été explorée. Grâce à des sondes fluorescentes sensibles au pH, on peut observer qu'une partie des mitochondries, sous forme de mito-agrésomes induits par BHRF1, est présente dans des compartiments qui ont un pH acide et identifiés comme étant des vésicules autophagiques (autophagosomes et lysosomes). Certaines de ces mitochondries sont dégradées, confirmant l'induction de la mitophagie par BHRF1 (Figure 2).

### Inhibition de la réponse antivirale par BHRF1

Les mitochondries possèdent à leur surface des récepteurs MAVS (*mitochondrial antiviral signaling*) qui sont indirectement impliqués dans la détection des infections virales. Ainsi, ces récepteurs MAVS peuvent être activés à la suite de la détection par l'hélicase RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) de la présence d'ARN viraux dans le cytoplasme de la cellule. Après son activation, MAVS induit une cascade de signalisation qui aboutit à la synthèse d'interférons (IFN), cytokines aux propriétés antivirales [11]. Ainsi, les mitochondries sont des organites pivots dans l'établissement de la réponse immunitaire innée.

La séquestration des mitochondries dans des vésicules autophagiques et leur dégradation sont autant d'éléments suggérant que BHRF1 pouvait altérer la réponse cellulaire induite par l'EBV. Cette hypothèse a été testée, notamment en mesurant le niveau de la réponse IFN grâce à un système rapporteur permettant d'évaluer l'activation du promoteur du gène codant l'IFN- $\beta$ . Nous avons ainsi pu montrer que BHRF1 bloque l'initiation de la réponse IFN. De plus, cet effet inhibiteur dépend à la fois de l'autophagie et de la fission mitochondriale (Figure 3).

La protéine BHRF1 joue donc un rôle important dans l'infection par l'EBV en lui permettant d'échapper aux

défenses immunitaires innées de la cellule infectée. Cette découverte étaye l'hypothèse selon laquelle BHRF1 pourrait participer à la tumorigenèse associée aux infections par EBV. En effet, l'expression de BHRF1 au cours de la période de latence a été associée à une plus grande résistance des cellules aux traitements anti-tumoraux [12]. Compte tenu des propriétés antiprolifératives des IFN de type I et II [13], BHRF1, en inhibant la production de l'IFN- $\beta$  (appartenant aux IFN de type I) pourrait favoriser le développement de cancers.

### Détruire pour survivre : une stratégie commune à différents virus

Plusieurs autres études ont révélé comment différents virus modulent la dynamique et le devenir des mitochondries afin de contrecarrer l'immunité innée. Le virus de l'hépatite C, notamment, induit d'importantes modifications mitochondriales dans les cellules qu'il infecte afin de réduire la défense antivirale et améliorer sa réplication [14]. La protéine non structurale PB1-F2 du virus de la grippe A induit la dégradation de MAVS par mitophagie pour atténuer l'immunité innée [15]. L'ensemble de ces découvertes suggère que la dégradation des mitochondries induite à la suite d'une infection virale constituerait un mécanisme proviral, car elle permettrait d'atténuer les défenses innées de la cellule et d'assurer la persistance virale.  $\diamond$

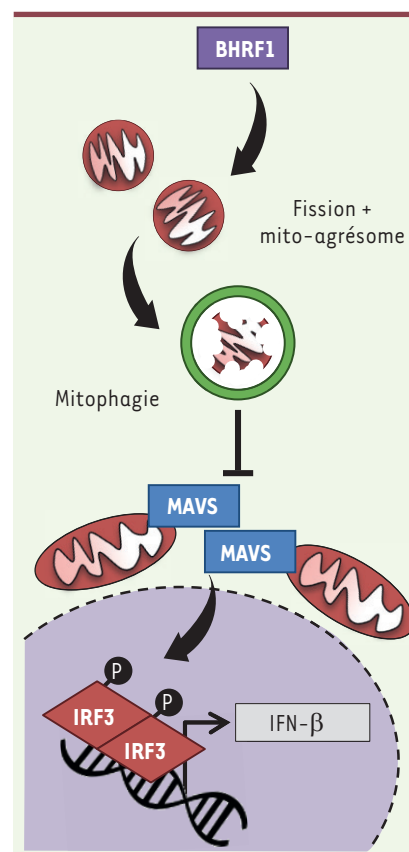
### Mitophagy: a strategy of the Epstein-Barr virus to evade innate immunity

#### REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés grâce à des financements provenant du CNRS, de l'université Paris-Saclay, du DIM MALINF Région Île-de-France, et de l'agence nationale de la recherche (ANR-14-CE14-0022).

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.



**Figure 3. La mitophagie induite par BHRF1 est à l'origine de l'inhibition de la réponse interféron.** La présence du récepteur MAVS à la surface des mitochondries en fait des organites essentiels dans le déclenchement de l'immunité innée. En induisant la mitophagie, BHRF1 réduit cette défense antivirale car la séquestration des mitochondries ainsi que leur dégradation limitent l'activité de MAVS, qui n'est alors plus en mesure d'activer le facteur de transcription IRF3 (*interferon regulatory factor 3*). Ce dernier ne parvient donc plus au noyau cellulaire, et ne stimule plus la transcription du gène codant IFN- $\beta$ .

#### RÉFÉRENCES

- Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members. *Autophagy* 2008 ; 4 : 600-6.
- Henderson S, Huen D, Rowe M, et al. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 8479-83.
- Vilmen G, Glon D, Siracusano G, et al. BHRF1, a BCL2 viral homolog, disturbs mitochondrial dynamics and stimulates mitophagy to dampen type I IFN induction. *Autophagy* 2020 ; may 13 : 1-20.

## RÉFÉRENCES

4. Liesa M, Palacín M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 2009 ; 89 : 799-845.
5. Arnoult D, Soares F, Tattoli I, et al. Mitochondria in innate immunity. *EMBO Rep* 2011 ; 12 : 901-10.
6. Chang CR, Blackstone C. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann N Y Acad Sci* 2010 ; 1201 : 34-9.
7. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018 ; 19 : 121-35.
8. Green DR, Levine B. To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate. *Cell* 2014 ; 157 : 65-75.
9. Burman J, Pickles S, Wang C, et al. Mitochondrial fission facilitates the selective mitophagy of protein aggregates. *J Cell Biol* 2017 ; 216 : 3231-47.
10. Randow F, Youle RJ. Self and non-self: How autophagy targets mitochondria and bacteria. *Cell Host Microbe* 2014 ; 15 : 403-11.
11. Vazquez C, Horner SM. MAVS Coordination of antiviral innate immunity. *J Virol* 2015 ; 89 : 6974-7.
12. Watanabe A, Maruo S, Ito T, et al. Epstein-Barr virus-encoded Bcl-2 homologue functions as a survival factor in Wp-restricted Burkitt lymphoma cell line P3HR-1. *J Virol* 2010 ; 84 : 2893-901.
13. Bekisz J, Baron S, Balinsky C, et al. Antiproliferative properties of type I and type II interferon. *Pharmaceuticals (Basel)* 2010 ; 3 : 994-1015.
14. Kim S-J, Syed GH, Siddiqui A. Hepatitis C virus induces the mitochondrial translocation of Parkin and subsequent mitophagy. *PLoS Pathog* 2013 ; 9:e1003285.
15. Wang R, Zhu Y, Ren C, et al. Influenza A virus protein PB1-F2 impairs innate immunity by inducing mitophagy. *Autophagy* 2020 ; Feb 11 : 1-16.



## VIII Références

### A

- Ablasser A., Bauernfeind F., Hartmann G., Latz E., Fitzgerald K.A., Hornung V.** (2009). RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* *10*, 1065–1072.
- Aguirre S., Luthra P., Sanchez-Aparicio M.T., Maestre A.M., Patel J., Lamothe F., Fredericks A.C., Tripathi S., Zhu T., Pintado-Silva J., Webb L.G., Bernal-Rubio D., Solovyov A., Greenbaum B., Simon V., et al.** (2017). Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. *Nat Microbiol* *2*, 1–11.
- Akella J.S., Wloga D., Kim J., Starostina N.G., Lyons-Abbott S., Morrissette N.S., Dougan S.T., Kipreos E.T., Gaertig J.** (2010). MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature* *467*, 218–222.
- Akira S., Takeda K.** (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* *4*, 499–511.
- Al Tabaa Y., Tuailon E., Bollore K., Foulongne V., Petitjean G., Seigneurin J.-M., Duperray C., Desgranges C., Vendrell J.-P.** (2009). Functional Epstein-Barr virus reservoir in plasma cells derived from infected peripheral blood memory B cells. *Blood* *113*, 604–611.
- Allday M.J., Bazot Q., White R.E.** (2015). The EBNA3 Family: Two Oncoproteins and a Tumour Suppressor that Are Central to the Biology of EBV in B Cells. *Curr Top Microbiol Immunol* *391*, 61–117.
- Allen U., Alfieri C., Preiksaitis J., Humar A., Moore D., Tapiero B., Tellier R., Green M., Davies D., Hébert D., Weitzman S., Petric M., Jacobson K.** (2002). Epstein-Barr virus infection in transplant recipients: Summary of a workshop on surveillance, prevention and treatment. *Can J Infect Dis* *13*, 89–99.
- Altmann M., Hammerschmidt W.** (2005). Epstein-Barr Virus Provides a New Paradigm: A Requirement for the Immediate Inhibition of Apoptosis. *PLoS Biol* *3*, e404.
- Amoroso R., Fitzsimmons L., Thomas W.A., Kelly G.L., Rowe M., Bell A.I.** (2011). Quantitative Studies of Epstein-Barr Virus-Encoded MicroRNAs Provide Novel Insights into Their Regulation. *J Virol* *85*, 996–1010.
- Anagnostopoulos I., Hummel M., Kreschel C., Stein H.** (1995). Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* *85*, 744–750.
- Anderson L.J., Longnecker R.** (2008). EBV LMP2A provides a surrogate pre-B cell receptor signal through constitutive activation of the ERK/MAPK pathway. *J Gen Virol* *89*, 1563–1568.
- Anderton E., Yee J., Smith P., Crook T., White R.E., Allday M.J.** (2008). Two Epstein-Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumour-suppressor Bim: clues to the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Oncogene* *27*, 421–433.
- Aouacheria A., Navratil V., Combet C.** (2019). Database and Bioinformatic Analysis of BCL-2 Family Proteins and BH3-Only Proteins. *Methods Mol Biol* *1877*, 23–43.
- Arnoult D., Soares F., Tattoli I., Girardin S.E.** (2011). Mitochondria in innate immunity. *EMBO Rep* *12*, 901–910.
- Aubrey B.J., Kelly G.L., Janic A., Herold M.J., Strasser A.** (2018). How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ* *25*, 104–113.
- Aubry V., Mure F., Mariamé B., Deschamps T., Wyrwicz L.S., Manet E., Gruffat H.** (2014). Epstein-Barr virus late gene transcription depends on the assembly of a virus-specific preinitiation complex. *J Virol* *88*, 12825–12838.

**Austin P.J., Flemington E., Yandava C.N., Strominger J.L., Speck S.H.** (1988). Complex transcription of the Epstein-Barr virus BamHI fragment H rightward open reading frame 1 (BHRF1) in latently and lytically infected B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 3678–3682.

---

## B

---

**Babcock G.J., Decker L.L., Volk M., Thorley-Lawson D.A.** (1998). EBV Persistence in Memory B Cells In Vivo. *Immunity* *9*, 395–404.

**Babcock G.J., Hochberg D., Thorley-Lawson A.D.** (2000). The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* *13*, 497–506.

**Baer R., Bankier A.T., Biggin M.D., Deininger P.L., Farrell P.J., Gibson T.J., Hatfull G., Hudson G.S., Satchwell S.C., Séguin C., Tuffnell P.S., Barrell B.G.** (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein–Barr virus genome. *Nature* *310*, 207–211.

**Bajaj B.G., Murakami M., Cai Q., Verma S.C., Lan K., Robertson E.S.** (2008). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with and enhances the stability of the c-Myc oncoprotein. *J Virol* *82*, 4082–4090.

**Barbier V., Lang D., Valois S., Rothman A.L., Medin C.L.** (2017). Dengue virus induces mitochondrial elongation through impairment of Drp1-triggered mitochondrial fission. *Virology* *500*, 149–160.

**Basit F., Cristofanon S., Fulda S.** (2013). Obatoclox (GX15-070) triggers necroptosis by promoting the assembly of the necrosome on autophagosomal membranes. *Cell Death Differ* *20*, 1161–1173.

**Basso V., Marchesan E., Peggion C., Chakraborty J., von Stockum S., Giacomello M., Ottolini D., Debattisti V., Caicci F., Tasca E., Pegoraro V., Angelini C., Antonini A., Bertoli A., Brini M., et al.** (2018). Regulation of ER-mitochondria contacts by Parkin via Mfn2. *Pharmacol Res* *138*, 43–56.

**Bauernfeind F., Horvath G., Stutz A., Alnemri E.S., MacDonald K., Speert D., Fernandes-Alnemri T., Wu J., Monks B.G., Fitzgerald K.A., Hornung V., Latz E.** (2009). NF- $\kappa$ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* *183*, 787–791.

**Baumann M., Mischak H., Dammeier S., Kolch W., Gires O., Pich D., Zeidler R., Delecluse H.J., Hammerschmidt W.** (1998). Activation of the Epstein-Barr virus transcription factor BZLF1 by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced phosphorylation. *J Virol* *72*, 8105–8114.

**Beau I., Esclatine A., Codogno P.** (2008). Lost to translation: when autophagy targets mature ribosomes. *Trends Cell Biol* *18*, 311–314.

**Bekisz J., Baron S., Balinsky C., Morrow A., Zoon K.C.** (2010). Antiproliferative Properties of Type I and Type II Interferon. *Pharmaceuticals (Basel)* *3*, 994–1015.

**Bellot G., Garcia-Medina R., Gounon P., Chiche J., Roux D., Pouyssegur J., Mazure N.M.** (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* *29*, 2570–2581.

**Bellows D.S., Howell M., Pearson C., Hazlewood S.A., Hardwick J.M.** (2002). Epstein-Barr virus BALF1 is a BCL-2-like antagonist of the herpesvirus antiapoptotic BCL-2 proteins. *J Virol* *76*, 2469–2479.

**Bentz G.L., Liu R., Hahn A.M., Shackelford J., Pagano J.S.** (2010). Epstein–Barr virus BRLF1 inhibits transcription of IRF3 and IRF7 and suppresses induction of interferon- $\beta$ . *Virology* *402*, 121–128.

**Bernhardt K., Haar J., Tsai M.-H., Poirey R., Feederle R., Delecluse H.-J.** (2016). A Viral microRNA Cluster Regulates the Expression of PTEN, p27 and of a bcl-2 Homolog. *PLoS Pathogens* *12*, e1005405.

- Bhat N., Fitzgerald K.A.** (2014). Recognition of Cytosolic DNA by cGAS and other STING-dependent sensors. *Eur J Immunol* **44**, 634–640.
- Bhattacharjee S., Bose P., Patel K., Roy S.G., Gain C., Gowda H., Robertson E.S., Saha A.** (2018). Transcriptional and epigenetic modulation of autophagy promotes EBV oncoprotein EBNA3C induced B-cell survival. *Cell Death & Disease* **9**, 1–18.
- Bhende P.M., Seaman W.T., Delecluse H.-J., Kenney S.C.** (2004). The EBV lytic switch protein, Z, preferentially binds to and activates the methylated viral genome. *Nat Genet* **36**, 1099–1104.
- Bigalke J.M., Heldwein E.E.** (2015). Structural basis of membrane budding by the nuclear egress complex of herpesviruses. *EMBO J* **34**, 2921–2936.
- Bloemberg D., Quadrilatero J.** (2019). Autophagy, apoptosis, and mitochondria: molecular integration and physiological relevance in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **317**, 111–130.
- Boya P., González-Polo R.-A., Casares N., Perfettini J.-L., Dessen P., Larochette N., Métivier D., Meley D., Souquere S., Yoshimori T., Pierron G., Codogno P., Kroemer G.** (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* **25**, 1025–1040.
- Boya P., Reggiori F., Codogno P.** (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol* **15**, 713–720.
- Brady G., MacArthur G.J., Farrell P.J.** (2007). Epstein–Barr virus and Burkitt lymphoma. *J Clin Pathol* **60**, 1397–1402.
- Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A.** (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394–424.
- Bronner D.N., Abuaita B.H., Chen X., Fitzgerald K.A., Nuñez G., He Y., Yin X.-M., O’Riordan M.X.D.** (2015). Endoplasmic Reticulum Stress Activates the Inflammasome via NLRP3- and Caspase-2-Driven Mitochondrial Damage. *Immunity* **43**, 451–462.
- Brown H.J., Song M.J., Deng H., Wu T.-T., Cheng G., Sun R.** (2003). NF- $\kappa$ B Inhibits Gammaherpesvirus Lytic Replication. *J Virol* **77**, 8532–8540.
- Broz P., Dixit V.M.** (2016). Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol* **16**, 407–420.
- Brubaker S.W., Gauthier A.E., Mills E.W., Ingolia N.T., Kagan J.C.** (2014). A bicistronic MAVS transcript highlights a class of truncated variants in antiviral immunity. *Cell* **156**, 800–811.
- Burdette D.L., Vance R.E.** (2013). STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat Immunol* **14**, 19–26.
- Burkitt D.** (1958). A Sarcoma Involving the Jaws in African Children. *Br J Surg* **22**, 349–355.
- Burkitt D., O’conor G.T.** (1961). Malignant lymphoma in African children. I. A clinical syndrome. *Cancer* **14**, 258–269.
- Burman J., Pickles S., Wang C., Sekine S., Vargas J.N., Zhang Z., Youle A., Nezich C., Wu X., Hammer J., Youle R.** (2017). Mitochondrial fission facilitates the selective mitophagy of protein aggregates. *J Cell Biol* **216**, 3231–3247.
- Buskiewicz I.A., Montgomery T., Yasewicz E.C., Huber S.A., Murphy M.P., Hartley R.C., Kelly R., Crow M.K., Perl A., Budd R.C., Koenig A.** (2016). Reactive oxygen species induce virus-independent MAVS oligomerization in systemic lupus erythematosus. *Sci Signal* **9**, 115.
- 
- C**
- 
- Cai Q., Chen K., Young K.H.** (2015). Epstein–Barr virus-positive T/NK-cell lymphoproliferative disorders. *Exp Mol Med* **47**, e133.
- Caldwell R.G., Wilson J.B., Anderson S.J., Longnecker R.** (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* **9**, 405–411.



- Campbell K.J., Tait S.W.G.** (2018). Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol* **8**, e180002.
- Cao X.** (2016). Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease. *Nat Rev Immunol* **16**, 35–50.
- Cao Y.-L., Meng S., Chen Y., Feng J.-X., Gu D.-D., Yu B., Li Y.-J., Yang J.-Y., Liao S., Chan D.C., Gao S.** (2017). MFN1 structures reveal nucleotide-triggered dimerization critical for mitochondrial fusion. *Nature* **542**, 372–376.
- Castanier C., Garcin D., Vazquez A., Arnoult D.** (2010). Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Rep* **11**, 133–138.
- Castanier C., Zemirli N., Portier A., Garcin D., Bidère N., Vazquez A., Arnoult D.** (2012). MAVS ubiquitination by the E3 ligase TRIM25 and degradation by the proteasome is involved in type I interferon production after activation of the antiviral RIG-I-like receptors. *BMC Biol* **10**, 44.
- Castro-Castro A., Janke C., Montagnac G., Paul-Gilloteaux P., Chavrier P.** (2012). ATAT1/MEC-17 acetyltransferase and HDAC6 deacetylase control a balance of acetylation of alpha-tubulin and cortactin and regulate MT1-MMP trafficking and breast tumor cell invasion. *Eur J Cell Biol* **91**, 950–960.
- Cervantes-Silva M.P., Cox S.L., Curtis A.M.** (2021). Alterations in mitochondrial morphology as a key driver of immunity and host defence. *EMBO Rep* e53086.
- Chakrabarti R., Ji W.-K., Stan R.V., de Juan Sanz J., Ryan T.A., Higgs H.N.** (2018). INF2-mediated actin polymerization at the ER stimulates mitochondrial calcium uptake, inner membrane constriction, and division. *J Cell Biol* **217**, 251–268.
- Chang C.-R., Blackstone C.** (2007). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem* **282**, 21583–21587.
- Chang E.T., Ye W., Zeng Y.-X., Adami H.-O.** (2021). The evolving epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1–13.
- Chang L.-S., Wang J.-T., Doong S.-L., Lee C.-P., Chang C.-W., Tsai C.-H., Yeh S.-W., Hsieh C.-Y., Chen M.-R.** (2012). Epstein-Barr Virus BGLF4 Kinase Downregulates NF- $\kappa$ B Transactivation through Phosphorylation of Coactivator UXT. *Journal of Virology* **86**, 12176–12186.
- Chaplin D.D.** (2010). Overview of the Immune Response. *J Allergy Clin Immunol* **125**, 3–23.
- Chatel-Chaix L., Cortese M., Romero-Brey I., Bender S., Neufeldt C.J., Fischl W., Scaturro P., Schieber N., Schwab Y., Fischer B., Ruggieri A., Bartenschlager R.** (2016). Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell Host Microbe* **20**, 342–356.
- Chen A., Divisconte M., Jiang X., Quink C., Wang F.** (2005). Epstein-Barr virus with the latent infection nuclear antigen 3B completely deleted is still competent for B-cell growth transformation in vitro. *J Virol* **79**, 4506–4509.
- Chen G., Han Z., Feng D., Chen Y., Chen L., Wu H., Huang L., Zhou C., Cai X., Fu C., Duan L., Wang X., Liu L., Liu X., Shen Y., et al.** (2014). A regulatory signaling loop comprising the PGAM5 phosphatase and CK2 controls receptor-mediated mitophagy. *Mol Cell* **54**, 362–377.
- Chen Q., Sun L., Chen Z.J.** (2016). Regulation and function of the cGAS–STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat Immunol* **17**, 1142–1149.
- Cheng E.H.-Y., Nicholas J., Bellows D.S., Hayward G.S., Guo H.-G., Reitz M.S., Hardwick J.M.** (1997). A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 690–694.
- Chevallier-Greco A., Manet E., Chavrier P., Mosnier C., Daillie J., Sergeant A.** (1986). Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate

transcription from an EBV early promoter. *EMBO J* 5, 3243–3249.

**Chiu Y.-F., Sugden B.** (2016). Epstein-Barr Virus: The Path from Latent to Productive Infection. *Annu Rev Virol* 3, 359–372.

**Cho D.-H., Kim Y.S., Jo D.S., Choe S.-K., Jo E.-K.** (2018). Pexophagy: Molecular Mechanisms and Implications for Health and Diseases. *Mol Cells* 41, 55–64.

**Cho D.-H., Kim J.K., Jo E.-K.** (2020). Mitophagy and Innate Immunity in Infection. *Mol Cells* 43, 10–22.

**Choi H. jin, Park A., Kang S., Lee E., Lee T.A., Ra E.A., Lee J., Lee S., Park B.** (2018). Human cytomegalovirus-encoded US9 targets MAVS and STING signaling to evade type I interferon immune responses. *Nature Communications* 9.

**Chowdhury D., Lieberman J.** (2008). Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 26, 389–420.

**Chu C.T., Ji J., Dagda R.K., Jiang J.F., Tyurina Y.Y., Kapralov A.A., Tyurin V.A., Yanamala N., Shrivastava I.H., Mohammadyani D., Wang K.Z.Q., Zhu J., Klein-Seetharaman J., Balasubramanian K., Amoscato A.A., et al.** (2013). Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol* 15, 1197–1205.

**Chude C.I., Amaravadi R.K.** (2017). Targeting Autophagy in Cancer: Update on Clinical Trials and Novel Inhibitors. *Int J Mol Sci* 18, 1279.

**Chung J.Y.-M., Steen J.A., Schwarz T.L.** (2016). Phosphorylation-Induced Motor Shedding Is Required at Mitosis for Proper Distribution and Passive Inheritance of Mitochondria. *Cell Rep* 16, 2142–2155.

**Cirone M.** (2018). EBV and KSHV Infection Dysregulates Autophagy to Optimize Viral Replication, Prevent Immune Recognition and Promote Tumorigenesis. *Viruses* 10.

**Cleary M.L., Smith S.D., Sklar J.** (1986). Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47, 19–28.

**Cohen J.I.** (2000). Epstein–Barr Virus Infection. *N Engl J Med* 343(7), 481–492.

**Cohen J.I., Lekstrom K.** (1999). Epstein-Barr virus BARF1 protein is dispensable for B-cell transformation and inhibits alpha interferon secretion from mononuclear cells. *J Virol* 73, 7627–7632.

**Cohen J.I., Fauci A.S., Varmus H., Nabel G.J.** (2011). Epstein-Barr Virus: An Important Vaccine Target for Cancer Prevention. *Sci Transl Med* 3, 107–105.

**Collins T.J., Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D.** (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J* 21, 1616–1627.

**Crotzer V.L., Blum J.S.** (2009). Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation. *J Immunol* 182, 3335–3341.

**Crow Y.J., Manel N.** (2015). Aicardi-Goutières syndrome and the type I interferonopathies. *Nat Rev Immunol* 15, 429–440.

---

## D

---

**D’Addario M., Libermann T.A., Xu J., Ahmad A., Menezes J.** (2001). Epstein-Barr Virus and its glycoprotein-350 upregulate IL-6 in human B-lymphocytes via CD21, involving activation of NF-kappaB and different signaling pathways. *J Mol Biol* 308, 501–514.

**Daibata M., Humphreys R.E., Takada K., Sairenji T.** (1990). Activation of latent EBV via anti-IgG-triggered, second messenger pathways in the Burkitt’s lymphoma cell line Akata. *J Immunol* 144, 4788–4793.

**D’Amours D., Sallmann F.R., Dixit V.M., Poirier G.G.** (2001). Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci* 114, 3771–3778.

- Davies M.L., Xu S., Lyons-Weiler J., Rosendorff A., Webber S.A., Wasil L.R., Metes D., Rowe D.T.** (2010). Cellular factors associated with latency and spontaneous Epstein-Barr virus reactivation in B-lymphoblastoid cell lines. *Virology* **400**, 53–67.
- De Brito O.M., Scorrano L.** (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* **456**, 605–610.
- De Duve C., Wattiaux R.** (1966). Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* **28**, 435–492.
- Denton D., Kumar S.** (2019). Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ* **26**, 605–616.
- Deretic V., Levine B.** (2018). Autophagy balances inflammation in innate immunity. *Autophagy* **14**, 243–251.
- Deretic V., Saitoh T., Akira S.** (2013). Autophagy in infection, inflammation, and immunity. *Nat Rev Immunol* **13**, 722–737.
- Deretic V., Kimura T., Timmins G., Moseley P., Chauhan S., Mandell M.** (2015). Immunologic manifestations of autophagy. *J Clin Invest* **125**, 75–84.
- Desbien A.L., Kappler J.W., Marrack P.** (2009). The Epstein-Barr virus Bcl-2 homolog, BHRF1, blocks apoptosis by binding to a limited amount of Bim. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 5663–5668.
- Deschamps T., Bazot Q., Leske D.M., MacLeod R., Mompelat D., Tafforeau L., Lotteau V., Maréchal V., Baillie G.S., Gruffat H., Wilson J.B., Manet E.** (2017). Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 interacts with regulator of chromosome condensation 1 dynamically throughout the cell cycle. *J Gen Virol* **98**, 251–265.
- Deter R.L., Baudhuin P., De Duve C.** (1967). Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *J Cell Biol* **35**, 11–16.
- 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**, 563–566.
- Dice J.F.** (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci* **15**, 305–309.
- Dikic I., Elazar Z.** (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 349–364.
- Dinarello C.A.** (2009). Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu Rev Immunol* **27**, 519–550.
- 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**, 564–577.
- Ding B., Zhang L., Li Z., Zhong Y., Tang Q., Qin Y., Chen M.** (2017). The Matrix Protein of Human Parainfluenza Virus Type 3 Induces Mitophagy that Suppresses Interferon Responses. *Cell Host & Microbe* **21**, 538–547.e4.
- Dompierre J.P., Godin J.D., Charrin B.C., Cordelieres F.P., King S.J., Humbert S., Saudou F.** (2007). Histone Deacetylase 6 Inhibition Compensates for the Transport Deficit in Huntington's Disease by Increasing Tubulin Acetylation. *J Neurosci* **27**, 3571–3583.
- Dong M., Chen J., Huang J., Gong L., Shao C.** (2019). The roles of EBV-encoded microRNAs in EBV-associated tumors. *Cri Rev Onc/Hem* **135**, 30–38.
- Dooley H.C., Razi M., Polson H.E.J., Girardin S.E., Wilson M.I., Tooze S.A.** (2014). WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol Cell* **55**, 238–252.

---

## E

---

- Edlich F., Banerjee S., Suzuki M., Cleland M.M., Arnoult D., Wang C., Neutzner A., Tjandra N., Youle R.J.** (2011). Bcl-xL retrotranslocates Bax

from the mitochondria into the cytosol. *Cell* **145**, 104–116.

**Epstein M.A., Henle G., Achong B.G., Barr Y.M.** (1964). Morphological and Biological Studies on a Virus in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *J Exp Med* **121**, 761–770.

**Erster S., Moll U.M.** (2005). Stress-induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem Biophys Res Commun* **331**, 843–850.

**Eshun-Wilson L., Zhang R., Portran D., Nachury M.V., Toso D.B., Löhr T., Vendruscolo M., Bonomi M., Fraser J.S., Nogales E.** (2019). Effects of  $\alpha$ -tubulin acetylation on microtubule structure and stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 10366–10371.

**Esteves A.R., Palma A.M., Gomes R., Santos D., Silva D.F., Cardoso S.M.** (2019). Acetylation as a major determinant to microtubule-dependent autophagy: Relevance to Alzheimer's and Parkinson disease pathology. *Biochim Biophys Acta* **1865**, 2008–2023.

---

## F

---

**Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L., Henson P.M.** (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **148**, 2207–2216.

**Fahmi H., Cochet C., Hmama Z., Opolon P., Joab I.** (2000). Transforming growth factor beta 1 stimulates expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA by an indirect mechanism which requires the MAPK kinase pathway. *J Virol* **74**, 5810–5818.

**Feederle R., Kost M., Baumann M., Janz A., Drouet E., Hammerschmidt W., Delecluse H.-J.** (2000). The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *EMBO J* **19**, 3080–3089.

**Feederle R., Haar J., Bernhardt K., Linnstaedt S.D., Bannert H., Lips H., Cullen B.R., Delecluse H.-J.** (2011). The Members of an Epstein-Barr

Virus MicroRNA Cluster Cooperate To Transform B Lymphocytes  $\nabla$ . *J Virol* **85**, 9801–9810.

**Fish K., Comoglio F., Shaffer A.L., Ji Y., Pan K.-T., Scheich S., Oellerich A., Doebele C., Ikeda M., Schaller S.J., Nguyen H., Muppidi J., Wright G.W., Urlaub H., Serve H., et al.** (2020). Rewiring of B cell receptor signaling by Epstein-Barr virus LMP2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 26318–26327.

**Fitzsimmons L., Kelly G.** (2017). EBV and Apoptosis: The Viral Master Regulator of Cell Fate? *Viruses* **9**, 339–373.

**Fitzsimmons L., Boyce A.J., Wei W., Chang C., Croom-Carter D., Tierney R.J., Herold M.J., Bell A.I., Strasser A., Kelly G.L., Rowe M.** (2018). Coordinated repression of BIM and PUMA by Epstein-Barr virus latent genes maintains the survival of Burkitt lymphoma cells. *Cell Death Differ* **25**, 241–254.

**Fitzsimmons L., Cartlidge R., Chang C., Sejic N., Galbraith L.C.A., Suraweera C.D., Croom-Carter D., Dewson G., Tierney R.J., Bell A.I., Shannon-Lowe C., Herold M.J., Rickinson A.B., Colman P.M., Huang D.C.S., et al.** (2020). EBV BCL-2 homologue BHRF1 drives chemoresistance and lymphomagenesis by inhibiting multiple cellular pro-apoptotic proteins. *Cell Death Differ* **27**, 1554–1568.

**Flanagan A.M., Letai A.** (2008). BH3 domains define selective inhibitory interactions with BHRF-1 and KSHV BCL-2. *Cell Death Differ* **15**, 580–588.

**Foghsgaard L., Jäättelä M.** (1997). The ability of BHRF1 to inhibit apoptosis is dependent on stimulus and cell type. *J Virol* **71**, 7509–7517.

**Fonseca T.B., Sánchez-Guerrero Á., Milosevic I., Raimundo N.** (2019). Mitochondrial fission requires DRP1 but not dynamins. *Nature* **570**, 34–42.

**Fortin A., Cregan S.P., MacLaurin J.G., Kushwaha N., Hickman E.S., Thompson C.S., Hakim A., Albert P.R., Cecconi F., Helin K., Park D.S., Slack R.S.** (2001). APAF1 is a key transcriptional target

for p53 in the regulation of neuronal cell death. *J Cell Biol* 155, 207–216.

**Frederick R.L., Shaw J.M.** (2007). Moving Mitochondria: Establishing Distribution of an Essential Organelle. *Traffic* 8, 1668–1675.

**Friedman J.R., Webster B.M., Mastronarde D.N., Verhey K.J., Voeltz G.K.** (2010). ER sliding dynamics and ER–mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J Cell Biol* 190, 363–375.

**Friedman J.R., Lackner L.L., West M., DiBenedetto J.R., Nunnari J., Voeltz G.K.** (2011). ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science* 334, 358–362.

**Fritz J.H., Ferrero R.L., Philpott D.J., Girardin S.E.** (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* 7, 1250–1257.

---

## G

---

**Galluzzi L., Pietrocola F., Bravo-San Pedro J.M., Amaravadi R.K., Baehrecke E.H., Cecconi F., Codogno P., Debnath J., Gewirtz D.A., Karantza V., Kimmelman A., Kumar S., Levine B., Maiuri M.C., Martin S.J., et al.** (2015). Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J* 34, 856–880.

**Galluzzi L., Baehrecke E.H., Ballabio A., Boya P., Bravo-San Pedro J.M., Cecconi F., Choi A.M., Chu C.T., Codogno P., Colombo M.I., Cuervo A.M., Debnath J., Deretic V., Dikic I., Eskelinen E.-L., et al.** (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J* 36, 1811–1836.

**Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E.S., Altucci L., Amelio I., Andrews D.W., Annicchiarico-Petruzzelli M., Antonov A.V., Arama E., Baehrecke E.H., Barlev N.A., et al.** (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 25, 486–541.

**Galmes R., Houcine A., van Vliet A.R., Agostinis P., Jackson C.L., Giordano F.** (2016). ORP5/ORP8

localize to endoplasmic reticulum–mitochondria contacts and are involved in mitochondrial function. *EMBO Rep* 17, 800–810.

**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. *J Biol Chem* 284, 12297–12305.

**Gao A., Jiang J., Xie F., Chen L.** (2020). Bnip3 in mitophagy: Novel insights and potential therapeutic target for diseases of secondary mitochondrial dysfunction. *Clin Chim Acta* 506, 72–83.

**Garibal J., Hollville E., Bell A.I., Kelly G.L., Renouf B., Kawaguchi Y., Rickinson A.B., Wiels J.** (2007). Truncated form of the Epstein-Barr virus protein EBNA-LP protects against caspase-dependent apoptosis by inhibiting protein phosphatase 2A. *J Virol* 81, 7598–7607.

**Garibal J., Hollville É., Renouf B., Tétaud C., Wiels J.** (2010). Caspase-8-mediated cleavage of Bid and protein phosphatase 2A-mediated activation of Bax are necessary for Verotoxin-1-induced apoptosis in Burkitt’s lymphoma cells. *Cell Signalling* 22, 467–475.

**Gatica D., Lahiri V., Klionsky D.J.** (2018). Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat Cell Biol* 20, 233–242.

**Gaur U., Aggarwal B.B.** (2003). Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 66, 1403–1408.

**Ge Y., Shi X., Boopathy S., McDonald J., Smith A.W., Chao L.H.** (2020). Two forms of Opa1 cooperate to complete fusion of the mitochondrial inner-membrane. *ELife* 9, e50973.

**Geeraert C., Ratier A., Pfisterer S.G., Perdiz D., Cantaloube I., Rouault A., Patingre S., Proikas-Cezanne T., Codogno P., Poüs C.** (2010). Starvation-induced Hyperacetylation of Tubulin Is Required for the Stimulation of Autophagy by Nutrient Deprivation. *J Biol Chem* 285, 24184–24194.

**Geisler S., Holmström K.M., Skujat D., Fiesel F.C., Rothfuss O.C., Kahle P.J., Springer W.** (2010).

- PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 12, 119–131.
- Georgakopoulos N.D., Wells G., Campanella M.** (2017). The pharmacological regulation of cellular mitophagy. *Nat Chem Biol* 13, 136–146.
- Ghosh S.K., Perrine S.P., Williams R.M., Faller D.V.** (2012). Histone deacetylase inhibitors are potent inducers of gene expression in latent EBV and sensitize lymphoma cells to nucleoside antiviral agents. *Blood* 119, 1008–1017.
- Giacomello M., Pyakurel A., Glytsou C., Scorrano L.** (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 204–224.
- Gires O., Zimmer-Strobl U., Gonnella R., Ueffing M., Marschall G., Zeidler R., Pich D., Hammerschmidt W.** (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J* 16, 6131–6140.
- Given D., Yee D., Griem K., Kieff E.** (1979). DNA of Epstein-Barr virus. V. Direct repeats of the ends of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* 30, 852–862.
- Glickman J.N., Howe J.G., Steitz J.A.** (1988). Structural analyses of EBER1 and EBER2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol* 62, 902–911.
- Glon D., Lussignol M., Esclatine A.** (2020). [Mitophagy: a strategy of the Epstein-Barr virus to evade innate immunity]. *Med Sci (Paris)* 36, 990–993.
- Glon D., Vilmen G., Perdiz D., Hernandez E., Beauclair G., Maréchal V., Poüs C., Lussignol M., Esclatine A.** (2021). Essential role of hyperacetylated microtubules in innate immunity escape orchestrated by the EBV-encoded BHRF1 protein. *BioRxiv* 1–31.
- Gomes L.C., Di Benedetto G., Scorrano L.** (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 13, 589–598.
- Gomes L.R., Menck C.F.M., Leandro G.S.** (2017). Autophagy Roles in the Modulation of DNA Repair Pathways. *Int J Mol Sci* 18, 204–224.
- Gou H., Zhao M., Xu H., Yuan J., He W., Zhu M., Ding H., Yi L., Chen J.** (2017). CSFV induced mitochondrial fission and mitophagy to inhibit apoptosis. *Oncotarget* 8, 39382–39400.
- Goubau D., Deddouche S., Reis e Sousa C.** (2013). Cytosolic Sensing of Viruses. *Immunity* 38, 855–869.
- Gram A.M., Sun C., Landman S.L., Oosenbrug T., Koppejan H.J., Kwakkenbos M.J., Hoeben R.C., Paludan S.R., Rensing M.E.** (2017). Human B cells fail to secrete type I interferons upon cytoplasmic DNA exposure. *Mol Immunol* 91, 225–237.
- 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, 12715–12726.
- Gratama J.W., Oosterveer M.A., Zwaan F.E., Lepoutre J., Klein G., Ernberg I.** (1988). Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8693–8696.
- Gratama J.W., Oosterveer M.A., Klein G., Ernberg I.** (1990). EBNA size polymorphism can be used to trace Epstein-Barr virus spread within families. *J Virol* 64, 4703–4708.
- Green D.R., Galluzzi L., Kroemer G.** (2011). Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* 333, 1109–1112.
- Greenspan J.S., Greenspan D., Lennette E.T., Abrams D.I., Conant M.A., Petersen V., Freese U.K.** (1985). Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral “hairy” leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *N Engl J Med* 313, 1564–1571.
- Gross A., Katz S.G.** (2017). Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins. *Cell Death Differ* 24, 1348–1358.



- Gru A.A., Haverkos B.H., Freud A.G., Hastings J., Nowacki N.B., Barrionuevo C., Vigil C.E., Rochford R., Natkunam Y., Baiocchi R.A., Porcu P.** (2015). The Epstein-Barr Virus (EBV) in T Cell and NK Cell Lymphomas: Time for a Reassessment. *Curr Hematol Malig Rep* 10, 456–467.
- Gruffat H., Kadjouf F., Mariamé B., Manet E.** (2012). The Epstein-Barr Virus BcRF1 Gene Product Is a TBP-Like Protein with an Essential Role in Late Gene Expression. *J Virol* 86, 6023–6032.
- Guo J.Y., Chen H.-Y., Mathew R., Fan J., Strohecker A.M., Karsli-Uzunbas G., Kamphorst J.J., Chen G., Lemons J.M.S., Karantza V., Collier H.A., Dipaola R.S., Gelinas C., Rabinowitz J.D., White E.** (2011). Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* 25, 460–470.
- Gupta S., Ylä-Anttila P., Callegari S., Tsai M.-H., Delecluse H.-J., Masucci M.G.** (2018). Herpesvirus deconjugases inhibit the IFN response by promoting TRIM25 autoubiquitination and functional inactivation of the RIG-I signalosome. *PLoS Pathog* 14, e1006852.
- Gutsch D.E., Holley-Guthrie E.A., Zhang Q., Stein B., Blonar M.A., Baldwin A.S., Kenney S.C.** (1994). The bZIP transactivator of Epstein-Barr virus, BZLF1, functionally and physically interacts with the p65 subunit of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 14, 1939–1948.
- 
- H**
- 
- Hahn A.M., Huye L.E., Ning S., Webster-Cyriaque J., Pagano J.S.** (2005). Interferon regulatory factor 7 is negatively regulated by the Epstein-Barr virus immediate-early gene, BZLF-1. *J. Virol.* 79, 10040–10052.
- Hall E.C., Pfeiffer R.M., Segev D.L., Engels E.A.** (2013). Cumulative Incidence of Cancer After Solid Organ Transplantation. *Cancer* 119, 2300–2308.
- Ham S.J., Lee D., Yoo H., Jun K., Shin H., Chung J.** (2020). Decision between mitophagy and apoptosis by Parkin via VDAC1 ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 4281–4291.
- 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, 389–393.
- Hammerschmidt W., Sugden B.** (1988). Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* 55, 427–433.
- Hammerschmidt W., Sugden B.** (2013). Replication of Epstein-Barr Viral DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a013029.
- Han J., Hou W., Goldstein L.A., Stolz D.B., Watkins S.C., Rabinowich H.** (2014). A Complex between Atg7 and Caspase-9: a novel mechanism of cross-regulation between autophagy and apoptosis. *J Biol Chem* 289, 6485–6497.
- Hancock W.O.** (2014). Bidirectional cargo transport: moving beyond tug of war. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 615–628.
- Haneklaus M., Gerlic M., Kurowska-Stolarska M., Rainey A.-A., Pich D., McInnes I.B., Hammerschmidt W., O'Neill L.A.J., Masters S.L.** (2012). Cutting Edge: miR-223 and EBV miR-BART15 Regulate the NLRP3 Inflammasome and IL-1 $\beta$  Production. *J Immunol* 189, 3795–3799.
- Hara T., Nakamura K., Matsui M., Yamamoto A., Nakahara Y., Suzuki-Migishima R., Yokoyama M., Mishima K., Saito I., Okano H., Mizushima N.** (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885–889.
- Harper J.W., Ordureau A., Heo J.-M.** (2018). Building and decoding ubiquitin chains for mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 93–108.
- Henderson S., Huen D., Rowe M., Dawson C., Johnson G., Rickinson A.** (1993). Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8479–8483.

- Henle G., Henle W.** (1966). Immunofluorescence in Cells Derived from Burkitt's Lymphoma. *J Bacteriol* *91*, 1248–1256.
- Henle G., Henle W., Diehl V.** (1968). Relation of Burkitt's tumor-associated herpes- $\gamma$  virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *59*, 94–101.
- Hickish T., Robertson D., Clarke P., Hill M., Stefano F. di, Clarke C., Cunningham D.** (1994). Ultrastructural Localization of BHRF1: An Epstein-Barr Virus Gene Product Which Has Homology with bcl-2. *Cancer Res* *54*, 2808–2811.
- Hochberg D., Middeldorp J.M., Catalina M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Thorley-Lawson D.A.** (2004). Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 239–244.
- Hockenbery D., Nuñez G., Milliman C., Schreiber R.D., Korsmeyer S.J.** (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* *348*, 334–336.
- Hohmann T., Dehghani F.** (2019). The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork. *Cells* *8*, 362–417.
- Holley C.L., Schroder K.** (2020). The rOX-stars of inflammation: links between the inflammasome and mitochondrial meltdown. *Clin Transl Immunology* *9*, e01109.
- Horner S.M., Liu H.M., Park H.S., Briley J., Gale M.** (2011). Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 14590–14595.
- Hou F., Sun L., Zheng H., Skaug B., Jiang Q.-X., Chen Z.J.** (2011). MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* *146*, 448–461.
- Hsu C.-Y., Yi Y.-H., Chang K.-P., Chang Y.-S., Chen S.-J., Chen H.-C.** (2014). The Epstein-Barr Virus-Encoded MicroRNA MiR-BART9 Promotes Tumor Metastasis by Targeting E-Cadherin in Nasopharyngeal Carcinoma. *PLoS Pathog* *10*, e1003974.
- Huang Q., Petros A.M., Virgin H.W., Fesik S.W., Olejniczak E.T.** (2003). Solution Structure of the BHRF1 Protein From Epstein-Barr Virus, a Homolog of Human Bcl-2. *J Mol Biol* *332*, 1123–1130.
- Hudnall S.D., Ge Y., Wei L., Yang N.-P., Wang H.-Q., Chen T.** (2005). Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-infected cells in human pharyngeal tonsils. *Mod Pathol* *18*, 519–527.
- Hung C.-H., Chen L.-W., Wang W.-H., Chang P.-J., Chiu Y.-F., Hung C.-C., Lin Y.-J., Liou J.-Y., Tsai W.-J., Hung C.-L., Liu S.-T.** (2014). Regulation of autophagic activation by Rta of Epstein-Barr virus via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Virol.* *88*, 12133–12145.
- Hurley E.A., Thorley-Lawson D.A.** (1988). B cell activation and the establishment of Epstein-Barr virus latency. *J Exp Med* *168*, 2059–2075.
- Hwang K.Y., Choi Y.B.** (2015). Modulation of Mitochondrial Antiviral Signaling by Human Herpesvirus 8 Interferon Regulatory Factor 1. *J Virol* *90*, 506–520.
- 
- I
- 
- Ichimura Y., Kirisako T., Takao T., Satomi Y., Shimonishi Y., Ishihara N., Mizushima N., Tanida I., Kominami E., Ohsumi M., Noda T., Ohsumi Y.** (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* *408*, 488–492.
- Ichinohe T., Yamazaki T., Koshiba T., Yanagi Y.** (2013). Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 17963–17968.
- Ingerman E., Perkins E.M., Marino M., Mears J.A., McCaffery J.M., Hinshaw J.E., Nunnari J.** (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* *170*, 1021–1027.
- Irmeler M., Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer J.L., Schröter M.,**

**Burns K., Mattmann C., Rimoldi D., French L.E., Tschopp J.** (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**, 190–195.

**Ishikawa H., Barber G.N.** (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**, 674–678.

**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**, 1256–1269.

**Ivashkiv L.B., Donlin L.T.** (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* **14**, 36–49.

---

## J

---

**Janke C., Magiera M.M.** (2020). The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 307–326.

**Janke C., Montagnac G.** (2017). Causes and Consequences of Microtubule Acetylation. *Curr Biol* **27**, 1287–1292.

**Jha H.C., Pei Y., Robertson E.S.** (2016). Epstein–Barr Virus: Diseases Linked to Infection and Transformation. *Front. Microbiol.* **7**.

**Ji W., Hatch A.L., Merrill R.A., Strack S., Higgs H.N.** (2015). Actin filaments target the oligomeric maturation of the dynamin GTPase Drp1 to mitochondrial fission sites. *ELife* **4**, e11553.

**Jiang G.-M., Tan Y., Wang H., Peng L., Chen H.-T., Meng X.-J., Li L.-L., Liu Y., Li W.-F., Shan H.** (2019). The relationship between autophagy and the immune system and its applications for tumor immunotherapy. *Molecular Cancer* **18**, 17.

**Jiang R., Scott R.S., Hutt-Fletcher L.M.** (2006). Epstein-Barr virus shed in saliva is high in B-cell-tropic glycoprotein gp42. *J Virol* **80**, 7281–7283.

**Johannsen E., Luftig M., Chase M.R., Weicksel S., Cahir-McFarland E., Illanes D., Sarracino D., Kieff E.** (2004). Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16286–16291.

**Julien O., Wells J.A.** (2017). Caspases and their substrates. *Cell Death Differ* **24**, 1380–1389.

---

## K

---

**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. *J Cell Sci* **117**, 2805–2812.

**Kahns S., Kalai M., Jakobsen L.D., Clark B.F.C., Vandenabeele P., Jensen P.H.** (2003). Caspase-1 and Caspase-8 Cleave and Inactivate Cellular Parkin \*. *J Biol Chem* **278**, 23376–23380.

**Kale J., Osterlund E.J., Andrews D.W.** (2018). BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ* **25**, 65–80.

**Kamal R.P., Alymova I.V., York I.A.** (2017). Evolution and Virulence of Influenza A Virus Protein PB1-F2. *Int J Mol Sci* **19**.

**Kanegane H., Yachie A., Miyawaki T., Tosato G.** (1998). EBV-NK cells interactions and lymphoproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* **29**, 491–498.

**Kang M.-S., Kieff E.** (2015). Epstein–Barr virus latent genes. *Exp Mol Med* **47**, e131.

**Kang D., Skalsky R.L., Cullen B.R.** (2015). EBV BART MicroRNAs Target Multiple Pro-apoptotic Cellular Genes to Promote Epithelial Cell Survival. *PLOS Pathogens* **11**, e1004979.

**Kang J.-S., Tian J.-H., Pan P.-Y., Zald P., Li C., Deng C., Sheng Z.-H.** (2008). Docking of Axonal Mitochondria by Syntaphilin Controls Their Mobility and Affects Short-Term Facilitation. *Cell* **132**, 137–148.

**Kantari C., Walczak H.** (2011). Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 558–563.

**Kaushik S., Cuervo A.M.** (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 365–381.

**Kawai T., Takahashi K., Sato S., Coban C., Kumar H., Kato H., Ishii K.J., Takeuchi O., Akira S.** (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-

- mediated type I interferon induction. Nat Immunol 6, 981–988.
- Ke F.F.S., Vanyai H.K., Cowan A.D., Delbridge A.R.D., Whitehead L., Grabow S., Czabotar P.E., Voss A.K., Strasser A.** (2018). Embryogenesis and Adult Life in the Absence of Intrinsic Apoptosis Effectors BAX, BAK, and BOK. Cell 173, 1217–1230.
- Keck F., Brooks-Faulconer T., Lark T., Ravishankar P., Bailey C., Salvador-Morales C., Narayanan A.** (2017). Altered mitochondrial dynamics as a consequence of Venezuelan Equine encephalitis virus infection. Virulence 8, 1849–1866.
- Kelly G.L., Rickinson A.B.** (2007). Burkitt lymphoma: revisiting the pathogenesis of a virus-associated malignancy. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 1, 277–284.
- Kelly G.L., Milner A.E., Tierney R.J., Croom-Carter D.S.G., Altmann M., Hammerschmidt W., Bell A.I., Rickinson A.B.** (2005). Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 2 (EBNA2) Gene Deletion Is Consistently Linked with EBNA3A, -3B, and -3C Expression in Burkitt's Lymphoma Cells and with Increased Resistance to Apoptosis. Journal of Virology 79, 10709–10717.
- Kelly G.L., Long H.M., Stylianou J., Thomas W.A., Leese A., Bell A.I., Bornkamm G.W., Mautner J., Rickinson A.B., Rowe M.** (2009). An Epstein-Barr Virus Anti-Apoptotic Protein Constitutively Expressed in Transformed Cells and Implicated in Burkitt Lymphomagenesis: The Wp/BHRF1 Link. PLoS Pathog 5, e1000341.
- Kennedy P.G.E.** (2015). Viruses, apoptosis, and neuroinflammation—a double-edged sword. J Neurovirol 21, 1–7.
- Kennedy G., Komano J., Sugden B.** (2003). Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 14269–14274.
- Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R.** (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. Br J Cancer 26, 239–257.
- Khaminets A., Heinrich T., Mari M., Grumati P., Huebner A.K., Akutsu M., Liebmann L., Stolz A., Nietzsche S., Koch N., Mauthe M., Katona I., Qualmann B., Weis J., Reggiori F., et al.** (2015). Regulation of endoplasmic reticulum turnover by selective autophagy. Nature 522, 354–358.
- Khaminets A., Behl C., Dikic I.** (2016). Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. Trends Cell Biol 26, 6–16.
- Khammissa R.A.G., Fourie J., Chandran R., Lemmer J., Feller L.** (2016). Epstein-Barr Virus and Its Association with Oral Hairy Leukoplakia: A Short Review. Int J Dent 1, 1–6.
- Khan G., Hashim M.J.** (2014). Global burden of deaths from Epstein-Barr virus attributable malignancies 1990-2010. Infect Agent Cancer 9, 38.
- Khanim F., Mackett M., Young L.S., Dawson J., Meseda C.A., Dawson C.** (1997). BHRF1, a viral homologue of the Bcl-2 oncogene, is conserved at both the sequence and functional level in different Epstein-Barr virus isolates. J Gen Virol 78, 2987–2999.
- Kieff E., Levine J.** (1974). Homology Between Burkitt Herpes Viral DNA and DNA in Continuous Lymphoblastoid Cells from Patients with Infectious Mononucleosis. Proc Natl Acad Sci U S A 71, 355–358.
- Kieff E.D., Rickinson A.B., Cohen J.I.** (2007). Epstein-Barr Virus and Its Replication (Chapter 68A). In Fields Virology, 5th Edition, Volume 2, pp. 2603–2700.
- Kim S.-J., Khan M., Quan J., Till A., Subramani S., Siddiqui A.** (2013). Hepatitis B Virus Disrupts Mitochondrial Dynamics: Induces Fission and Mitophagy to Attenuate Apoptosis. PLoS Pathog 9.
- Kim S.-J., Hussain S., Khan M., Chiu W.-W., Sohail M., Gish R., Siddiqui A.** (2014). Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral persistence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111.

- Kleele T., Rey T., Winter J., Zaganelli S., Mahecic D., Perreten Lambert H., Ruberto F.P., Nemir M., Wai T., Pedrazzini T., Manley S.** (2021). Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis. *Nature* 1–9.
- Klionsky D.J., Abdel-Aziz A.K., Abdelfatah S., Abdellatif M., Abdoli A., Abel S., Abeliovich H., Abildgaard M.H., Abudu Y.P., Acevedo-Arozena A., Adamopoulos I.E., Adeli K., Adolph T.E., Adornetto A., Aflaki E., et al.** (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy* 17, 1–382.
- Knorr R.L., Lipowsky R., Dimova R.** (2015). Autophagosome closure requires membrane scission. *Autophagy* 11, 2134–2137.
- Köchl R., Hu X.W., Chan E.Y.W., Tooze S.A.** (2006). Microtubules Facilitate Autophagosome Formation and Fusion of Autophagosomes with Endosomes: Role of Microtubules in AV Formation. *Traffic* 7, 129–145.
- Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C.** (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Rev* 87, 99–163.
- Kroemer G., Mariño G., Levine B.** (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 40, 280–293.
- Kruppa A.J., Buss F.** (2021). Motor proteins at the mitochondria-cytoskeleton interface. *J Cell Sci* 134, 1–13.
- Kruppa A.J., Kishi-Itakura C., Masters T.A., Rorbach J.E., Grice G.L., Kendrick-Jones J., Nathan J.A., Minczuk M., Buss F.** (2018). Myosin VI-Dependent Actin Cages Encapsulate Parkin-Positive Damaged Mitochondria. *Dev Cell* 44, 484–499.
- Kubli D.A., Gustafsson Å.B.** (2012). Mitochondria and Mitophagy: The Yin and Yang of Cell Death Control. *Circ Res* 111, 1208–1221.
- Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Chipuk J.E., Bonzon C., Sullivan B.A., Green D.R., Newmeyer D.D.** (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 17, 525–535.
- Kvansakul M., Wei A.H., Fletcher J.I., Willis S.N., Chen L., Roberts A.W., Huang D.C.S., Colman P.M.** (2010). Structural Basis for Apoptosis Inhibition by Epstein-Barr Virus BHRF1. *PLoS Pathog* 6, e1001236.
- Kvansakul M., Caria S., Hinds M.G.** (2017). The Bcl-2 Family in Host-Virus Interactions. *Viruses* 9, 290–309.
- 
- L**
- 
- Laichalk L.L., Thorley-Lawson D.A.** (2005). Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol* 79, 1296–1307.
- Lamb C.A., Yoshimori T., Tooze S.A.** (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 759–774.
- Lazarou M., Stojanovski D., Frazier A.E., Kotevski A., Dewson G., Craigen W.J., Kluck R.M., Vaux D.L., Ryan M.T.** (2010). Inhibition of Bak Activation by VDAC2 Is Dependent on the Bak Transmembrane Anchor. *J Biol Chem* 285, 36876–36883.
- Leao M., Anderton E., Wade M., Meekings K., Allday M.J.** (2007). Epstein-Barr Virus-Induced Resistance to Drugs That Activate the Mitotic Spindle Assembly Checkpoint in Burkitt's Lymphoma Cells. *J Virol* 81, 248–260.
- LeDizet M., Piperno G.** (1987). Identification of an acetylation site of Chlamydomonas alpha-tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5720–5724.
- Lee J.E., Westrate L.M., Wu H., Page C., Voeltz G.K.** (2016). Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature* 540, 139–143.
- Lee J.-Y., Nagano Y., Taylor J.P., Lim K.L., Yao T.-P.** (2010). Disease-causing mutations in Parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *J Cell Biol* 189, 671–679.

- Lei T., Yuen K.-S., Xu R., Tsao S.W., Chen H., Li M., Kok K.-H., Jin D.-Y.** (2013). Targeting of DICE1 tumor suppressor by Epstein-Barr virus-encoded miR-BART3\* microRNA in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* *133*, 79–87.
- Lei Y., Wen H., Yu Y., Taxman D.J., Zhang L., Widman D.G., Swanson K.V., Wen K.-W., Damania B., Moore C.B., Giguère P.M., Siderovski D.P., Hiscott J., Razani B., Semenkovich C.F., et al.** (2012). The mitochondrial proteins NLRX1 and TUFM form a complex that regulates type 1 interferon and autophagy. *Immunity* *36*, 933–946.
- Lei Y., Kansy B.A., Li J., Cong L., Liu Y., Trivedi S., Wen H., Ting J.P.-Y., Ouyang H., Ferris R.L.** (2016). EGFR-targeted mAb therapy modulates autophagy in head and neck squamous cell carcinoma through NLRX1-TUFM protein complex. *Oncogene* *35*, 4698–4707.
- Lemasters J.J.** (2005). Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res* *8*, 3–5.
- Lescat L., Véron V., Mourot B., Péron S., Chenais N., Dias K., Riera-Heredia N., Beaumatin F., Pinel K., Priault M., Panserat S., Salin B., Guiguen Y., Bobe J., Herpin A., et al.** (2020). Chaperone-Mediated Autophagy in the Light of Evolution: Insight from Fish. *Mol Biol Evol* *37*, 2887–2899.
- Levine B., Klionsky D.J.** (2017). Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. *Proc Natl Acad Sci U S A* *114*, 201–205.
- Levine R., Zhu K., Gu Y., Brann E., Hall I., Caplan L., Baum M.** (1998). Self-reported infectious mononucleosis and 6 cancers: a population-based, case-control study. *Scand J Infect Dis* *30*, 211–214.
- L'Hernault S.W., Rosenbaum J.L.** (1985). Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry* *24*, 473–478.
- Li L., Yang X.-J.** (2015). Tubulin acetylation: responsible enzymes, biological functions and human diseases. *Cell Mol Life Sci* *72*, 4237–4255.
- Li C., Romero-Masters J.C., Huebner S., Ohashi M., Hayes M., Bristol J.A., Nelson S.E., Eichelberg M.R., Sciver N.V., Ranheim E.A., Scott R.S., Johannsen E.C., Kenney S.C.** (2020a). EBNA2-deleted Epstein-Barr virus (EBV) isolate, P3HR1, causes Hodgkin-like lymphomas and diffuse large B cell lymphomas with type II and Wp-restricted latency types in humanized mice. *PLoS Pathog* *16*, e1008590.
- Li L.Y., Shih H.M., Liu M.Y., Chen J.Y.** (2001). The cellular protein PRA1 modulates the anti-apoptotic activity of Epstein-Barr virus BHRF1, a homologue of Bcl-2, through direct interaction. *J Biol Chem* *276*, 27354–27362.
- Li L.-Y., Liu M.-Y., Shih H.-M., Tsai C.-H., Chen J.-Y.** (2006). Human cellular protein VRK2 interacts specifically with Epstein-Barr virus BHRF1, a homologue of Bcl-2, and enhances cell survival. *J Gen Virol* *87*, 2869–2878.
- Li S., Wang J., Zhou A., Khan F.A., Hu L., Zhang S.** (2016). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus triggers mitochondrial fission and mitophagy to attenuate apoptosis. *Oncotarget* *7*, 56002–56012.
- Li S., Xiong G.-J., Huang N., Sheng Z.-H.** (2020b). The crosstalk of energy sensing and mitochondrial anchoring sustains synaptic efficacy by maintaining presynaptic metabolism. *Nat Metab* *2*, 1077–1095.
- Liang C., Feng P., Ku B., Dotan I., Canaani D., Oh B.-H., Jung J.U.** (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* *8*, 688–699.
- Liang X.H., Jackson S., Seaman M., Brown K., Kempkes B., Hibshoosh H., Levine B.** (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* *402*, 672–676.
- Lieberman P.M.** (2013). Keeping it quiet: chromatin control of gammaherpesvirus latency. *Nat Rev Microbiol* *11*, 863–875.



- Lin H.-C., Chang Y., Chen R.-Y., Hung L.-Y., Chen P.C.-H., Chen Y.-P., Medeiros L.J., Chiang P.-M., Chang K.-C.** (2021). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 upregulates autophagy and promotes viability in Hodgkin lymphoma: Implications for targeted therapy. *Cancer Sci* *112*, 1589–1602.
- Liu D., Wu H., Wang C., Li Y., Tian H., Siraj S., Sehgal S.A., Wang X., Wang J., Shang Y., Jiang Z., Liu L., Chen Q.** (2019). STING directly activates autophagy to tune the innate immune response. *Cell Death Differ* *26*, 1735–1749.
- Liu H.M., Loo Y.-M., Horner S.M., Zornetzer G.A., Katze M.G., Gale M.** (2012a). The Mitochondrial Targeting Chaperone 14-3-3 $\epsilon$  Regulates a RIG-I Translocon that Mediates Membrane Association and Innate Antiviral Immunity. *Cell Host Microbe* *11*, 528–537.
- Liu L., Feng D., Chen G., Chen M., Zheng Q., Song P., Ma Q., Zhu C., Wang R., Qi W., Huang L., Xue P., Li B., Wang X., Jin H., et al.** (2012b). Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol* *14*, 177–185.
- Liu M.Y., Shih Y.Y., Chou S.P., Chen C.J., Sheen T.S., Yang C.S., Chen J.Y.** (1998). Antibody against the Epstein-Barr virus BHRF1 protein, a homologue of Bcl-2, in patients with nasopharyngeal carcinoma. *J Med Virol* *56*, 179–185.
- Liu T., Zhang J., Li K., Deng L., Wang H.** (2020). Combination of an Autophagy Inducer and an Autophagy Inhibitor: A Smarter Strategy Emerging in Cancer Therapy. *Front. Pharmacol.* *0*.
- Liu X.-Y., Wei B., Shi H.-X., Shan Y.-F., Wang C.** (2010). Tom70 mediates activation of interferon regulatory factor 3 on mitochondria. *Cell Res* *20*, 994–1011.
- Liu Y., Shoji-Kawata S., Sumpter R.M., Wei Y., Ginet V., Zhang L., Posner B., Tran K.A., Green D.R., Xavier R.J., Shaw S.Y., Clarke P.G.H., Puyal J., Levine B.** (2013). Autosis is a Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia–ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 20364–20371.
- Lo A.K.-F., Dawson C.W., Lung H.L., Wong K.-L., Young L.S.** (2020). The Therapeutic Potential of Targeting BARF1 in EBV-Associated Malignancies. *Cancers* *12*, 1940–1951.
- Longnecker R.M., Kieff E., Cohen J.I.** (2013). Epstein-Barr Virus (Chapter 61). In *Fields Virology*, 6th Edition, Volume 2, pp. 1942–2003.
- Lopez J., Tait S.W.G.** (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer* *112*, 957–962.
- López-Doménech G., Covill-Cooke C., Ivankovic D., Halff E.F., Sheehan D.F., Norkett R., Birsa N., Kittler J.T.** (2018). Miro proteins coordinate microtubule- and actin-dependent mitochondrial transport and distribution. *EMBO J* *37*, 321–336.
- Losón O.C., Song Z., Chen H., Chan D.C.** (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell* *24*, 659–667.
- Lu C.-C., Jeng Y.-Y., Tsai C.-H., Liu M.-Y., Yeh S.-W., Hsu T.-Y., Chen M.-R.** (2006). Genome-wide transcription program and expression of the Rta responsive gene of Epstein–Barr virus. *Virology* *345*, 358–372.
- Lu J., Murakami M., Verma S.C., Cai Q., Haldar S., Kaul R., Wasik M.A., Middeldorp J., Robertson E.S.** (2011). Epstein-Barr Virus nuclear antigen 1 (EBNA1) confers resistance to apoptosis in EBV-positive B-lymphoma cells through up-regulation of survivin. *Virology* *410*, 64–75.
- Lu Y., Qin Z., Wang J., Zheng X., Lu J., Zhang X., Wei L., Peng Q., Zheng Y., Ou C., Ye Q., Xiong W., Li G., Fu Y., Yan Q., et al.** (2017). Epstein-Barr Virus miR-BART6-3p Inhibits the RIG-I Pathway. *JIN* *9*, 574–586.
- Luedde T., Kaplowitz N., Schwabe R.F.** (2014). Cell Death and Cell Death Responses in Liver Disease: Mechanisms and Clinical Relevance. *Gastroenterology* *147*, 765–783.
- Lum J.J., Bauer D.E., Kong M., Harris M.H., Li C., Lindsten T., Thompson C.B.** (2005). Growth

Factor Regulation of Autophagy and Cell Survival in the Absence of Apoptosis. *Cell* 120, 237–248.

**Luo S., Rubinsztein D.C.** (2010). Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. *Cell Death & Differentiation* 17, 268–277.

**Luo S., Garcia-Arencibia M., Zhao R., Puri C., Toh P.P.C., Sadiq O., Rubinsztein D.C.** (2012). Bim inhibits autophagy by recruiting Beclin 1 to microtubules. *Mol Cell* 47, 359–370.

**Luo X., Donnelly C.R., Gong W., Heath B.R., Hao Y., Donnelly L.A., Moghbeli T., Tan Y.S., Lin X., Bellile E., Kansy B.A., Carey T.E., Brenner J.C., Cheng L., Polverini P.J., et al.** (2020). HPV16 drives cancer immune escape via NLRX1-mediated degradation of STING. *J Clin Invest* 130, 1635–1652.

**Lupfer C., Thomas P.G., Anand P.K., Vogel P., Milasta S., Martinez J., Huang G., Green M., Kundu M., Chi H., Xavier R.J., Green D.R., Lamkanfi M., Dinarello C.A., Doherty P.C., et al.** (2013). Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection. *Nat Immunol* 14, 480–488.

**Lynch-Day M.A., Mao K., Wang K., Zhao M., Klionsky D.J.** (2012). The Role of Autophagy in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a009357.

---

## M

---

**Ma K., Zhang Z., Chang R., Cheng H., Mu C., Zhao T., Chen L., Zhang C., Luo Q., Lin J., Zhu Y., Chen Q.** (2020). Dynamic PGAM5 multimers dephosphorylate BCL-xL or FUNDC1 to regulate mitochondrial and cellular fate. *Cell Death Differ* 27, 1036–1051.

**Ma Y., Galluzzi L., Zitvogel L., Kroemer G.** (2013). Autophagy and Cellular Immune Responses. *Immunity* 39, 211–227.

**MacCormac L.P., Muqit M.M.K., Faulkes D.J., Wood N.W., Latchman D.S.** (2004). Reduction in endogenous parkin levels renders glial cells sensitive to both caspase-dependent and

caspase-independent cell death. *Eur J Neurosci* 20, 2038–2048.

**Mackeh R., Perdiz D., Lorin S., Codogno P., Pous C.** (2013). Autophagy and microtubules - new story, old players. *J Cell Sci* 126, 1071–1080.

**Mackeh R., Lorin S., Ratier A., Mejdoubi-Charef N., Baillet A., Bruneel A., Hamai A., Codogno P., Pous C., Perdiz D.** (2014). Reactive Oxygen Species, AMP-activated Protein Kinase, and the Transcription Cofactor p300 Regulate  $\alpha$ -Tubulin Acetyltransferase-1 ( $\alpha$ TAT-1/MEC-17)-dependent Microtubule Hyperacetylation during Cell Stress. *J Biol Chem* 289, 11816–11828.

**MacMicking J.D.** (2012). Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol* 12, 367–382.

**Magrath I.** (1990). The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Adv Cancer Res* 55, 133–270.

**Magri A., Reina S., De Pinto V.** (2018). VDAC1 as Pharmacological Target in Cancer and Neurodegeneration: Focus on Its Role in Apoptosis. *Front Chem* 6, 108–124.

**Mahecic D., Carlini L., Kleele T., Colom A., Goujon A., Matile S., Roux A., Manley S.** (2021). Mitochondrial membrane tension governs fission. *Cell Rep* 35, e108947.

**Maiuri M.C., Le Toumelin G., Criollo A., Rain J.-C., Gautier F., Juin P., Tasdemir E., Pierron G., Troulinaki K., Tavernarakis N., Hickman J.A., Geneste O., Kroemer G.** (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* 26, 2527–2539.

**Mannick J.B., Cohen J.I., Birkenbach M., Marchini A., Kieff E.** (1991). The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J Virol* 65, 6826–6837.

**Manor U., Bartholomew S., Golani G., Christenson E., Kozlov M., Higgs H., Spudich J., Lippincott-Schwartz J.** (2015). A mitochondria-anchored isoform of the actin-nucleating spire protein regulates mitochondrial division. *ELife* 4, e08828.

- Manzetti J., Weissbach F.H., Graf F.E., Unterstab G., Wernli M., Hopfer H., Drachenberg C.B., Rinaldo C.H., Hirsch H.H.** (2020). BK Polyomavirus Evades Innate Immune Sensing by Disrupting the Mitochondrial Network and Promotes Mitophagy. *IScience* 23, 101257.
- Mao K., Klionsky D.J.** (2017). Xenophagy: A battlefield between host and microbe, and a possible avenue for cancer treatment. *Autophagy* 13, 223–224.
- Maria Fimia G., 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, 1121–1125.
- Mariño G., Niso-Santano M., Baehrecke E.H., Kroemer G.** (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 81–94.
- Marquitz A.R., Raab-Traub N.** (2012). The role of miRNAs and EBV BARTs in NPC. *Semin Cancer Biol* 22, 166–172.
- Marshall W.L., Yim C., Gustafson E., Graf T., Sage D.R., Hanify K., Williams L., Fingerroth J., Finberg R.W.** (1999). Epstein-Barr virus encodes a novel homolog of the bcl-2 oncogene that inhibits apoptosis and associates with Bax and Bak. *J Virol* 73, 5181–5185.
- Martinez-Ruiz G., Maldonado V., Ceballos-Cancino G., Grajeda J.P.R., Melendez-Zajgla J.** (2008). Role of Smac/DIABLO in cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res* 27, 1–48.
- Martinvalet D.** (2018). The role of the mitochondria and the endoplasmic reticulum contact sites in the development of the immune responses. *Cell Death Dis* 9, 336.
- Maruta H., Greer K., Rosenbaum J.L.** (1986). The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J Cell Biol* 103, 571–579.
- McCarthy N.J., Hazlewood S.A., Huen D.S., Rickinson A.B., Williams G.T.** (1996). The Epstein-Barr virus gene BHRF1, a homologue of the cellular oncogene Bcl-2, inhibits apoptosis induced by gamma radiation and chemotherapeutic drugs. *Adv Exp Med Biol* 406, 83–97.
- McLelland G.-L., Soubannier V., Chen C.X., McBride H.M., Fon E.A.** (2014). Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. *EMBO J* 33, 282–295.
- McLelland G.-L., Lee S.A., McBride H.M., Fon E.A.** (2016). Syntaxin-17 delivers PINK1/parkin-dependent mitochondrial vesicles to the endolysosomal system. *J Cell Biol* 214, 275–291.
- McNab F., Mayer-Barber K., Sher A., Wack A., O’Garra A.** (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 15, 87–103.
- Melia T.J., Lystad A.H., Simonsen A.** (2020). Autophagosome biogenesis: From membrane growth to closure. *Journal of Cell Biology* 219.
- Meng G., Xia M., Wang D., Chen A., Wang Y., Wang H., Yu D., Wei J.** (2014). Mitophagy promotes replication of oncolytic Newcastle disease virus by blocking intrinsic apoptosis in lung cancer cells. *Oncotarget* 5, 6365–6374.
- Mestiri S., Zeglaoui I., Sriha B., Belcadhi M., Bouzouita K., Korbi S.** (2008). [Extra-nodal T lymphomas of the nasal cavities and sinuses]. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 125, 188–192.
- Meylan E., Curran J., Hofmann K., Moradpour D., Binder M., Bartenschlager R., Tschopp J.** (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437, 1167–1172.
- Meyohas M.C., Maréchal V., Desire N., Bouillie J., Frottier J., Nicolas J.C.** (1996). Study of mother-to-child Epstein-Barr virus transmission by means of nested PCRs. *J Virol* 70, 6816–6819.
- Michallet M.-C., Meylan E., Ermolaeva M.A., Vazquez J., Rebsamen M., Curran J., Poeck H., Bscheider M., Hartmann G., König M., Kalinke U., Pasparakis M., Tschopp J.** (2008). TRADD Protein Is an Essential Component of the RIG-like Helicase Antiviral Pathway. *Immunity* 28, 651–661.

- Miller N., Hutt-Fletcher L.M.** (1992). Epstein-Barr virus enters B cells and epithelial cells by different routes. *J Virol* *66*, 3409–3414.
- Misawa T., Takahama M., Kozaki T., Lee H., Zou J., Saitoh T., Akira S.** (2013). Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol* *14*, 454–460.
- Mishra S.R., Mahapatra K.K., Behera B.P., Patra S., Bhol C.S., Panigrahi D.P., Praharaj P.P., Singh A., Patil S., Dhiman R., Bhutia S.K.** (2021). Mitochondrial dysfunction as a driver of NLRP3 inflammasome activation and its modulation through mitophagy for potential therapeutics. *Int J Biochem Cell Biol* *136*, 106013–106021.
- Missiroli S., Patergnani S., Carocchia N., Pedriali G., Perrone M., Previati M., Wieckowski M.R., Giorgi C.** (2018). Mitochondria-associated membranes (MAMs) and inflammation. *Cell Death Dis* *9*, 1–14.
- Mizushima N., Levine B.** (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol* *12*, 823–830.
- Mizushima N., Noda T., Yoshimori T., Tanaka Y., Ishii T., George M.D., Klionsky D.J., Ohsumi M., Ohsumi Y.** (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* *395*, 395–398.
- Mizushima N., Yoshimori T., Levine B.** (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell* *140*, 313–326.
- Mizushima N., Yoshimori T., Ohsumi Y.** (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* *27*, 107–132.
- Mohanty A., Tiwari-Pandey R., Pandey N.R.** (2019). Mitochondria: the indispensable players in innate immunity and guardians of the inflammatory response. *J Cell Commun Signal* *13*, 303–318.
- Möhl B.S., Chen J., Sathiyamoorthy K., Jardetzky T.S., Longnecker R.** (2016). Structural and Mechanistic Insights into the Tropism of Epstein-Barr Virus. *Mol Cells* *39*, 286–291.
- Molyneux E.M., Rochford R., Griffin B., Newton R., Jackson G., Menon G., Harrison C.J., Israels T., Bailey S.** (2012). Burkitt's lymphoma. *The Lancet* *379*, 1234–1244.
- Moormann A.M., Snider C.J., Chelimo K.** (2011). The company malaria keeps: how co-infection with Epstein-Barr virus leads to endemic Burkitt lymphoma. *Curr Opin Infect Dis* *24*, 435–441.
- Morimoto D., Walinda E., Fukada H., Sou Y.-S., Kageyama S., Hoshino M., Fujii T., Tsuchiya H., Saeki Y., Arita K., Ariyoshi M., Tochio H., Iwai K., Namba K., Komatsu M., et al.** (2015). The unexpected role of polyubiquitin chains in the formation of fibrillar aggregates. *Nat Commun* *6*, 6116–6125.
- Morlino G., Barreiro O., Baixauli F., Robles-Valero J., González-Granado J.M., Villa-Bellosta R., Cuenca J., Sánchez-Sorzano C.O., Veiga E., Martín-Cófreces N.B., Sánchez-Madrid F.** (2014). Miro-1 Links Mitochondria and Microtubule Dynein Motors To Control Lymphocyte Migration and Polarity. *Mol Cell Biol* *34*, 1412–1426.
- Mulcahy Levy J.M., Thorburn A.** (2020). Autophagy in cancer: moving from understanding mechanism to improving therapy responses in patients. *Cell Death Differ* *27*, 843–857.
- Mulcahy Levy J.M., Towers C.G., Thorburn A.** (2017). Targeting Autophagy in Cancer. *Nat Rev Cancer* *17*, 528–542.
- Münz C.** (2016). Epstein Barr virus - a tumor virus that needs cytotoxic lymphocytes to persist asymptotically. *Curr Opin Virol* *20*, 34–39.
- Münz C.** (2019). Latency and lytic replication in Epstein-Barr virus-associated oncogenesis. *Nat Rev Microbiol* *17*, 691–700.
- Murrow L., Debnath J.** (2013). Autophagy As A Stress Response And Quality Control Mechanism—Implications for Cell Injury and Human Disease. *Annu Rev Pathol* *8*, 105–137.

---

**N**


---

**Nagata S., Tanaka M.** (2017). Programmed cell death and the immune system. *Nat Rev Immunol* **17**, 333–340.

**Nainu F., Shiratsuchi A., Nakanishi Y.** (2017). Induction of Apoptosis and Subsequent Phagocytosis of Virus-Infected Cells As an Antiviral Mechanism. *Front Immunol* **8**, e01220.

**Nakatogawa H.** (2020). Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 439–458.

**Narendra D., Kane L.A., Hauser D.N., Fearnley I.M., Youle R.J.** (2010). p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy* **6**, 1090–1106.

**Narendra D.P., Tanaka A., Suen D.-F., Youle R.J.** (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* **183**, 795–803.

**Neumann S., El Maadidi S., Faletti L., Haun F., Labib S., Schejtmann A., Maurer U., Borner C.** (2015). How do viruses control mitochondria-mediated apoptosis? *Virus Res* **209**, 45–55.

**Niedobitek G., Agathangelou A., Herbst H., Whitehead L., Wright D.H., Young L.S.** (1997). Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol* **182**, 151–159.

**Nitsche F., Bell A., Rickinson A.** (1997). Epstein-Barr virus leader protein enhances EBNA-2-mediated transactivation of latent membrane protein 1 expression: a role for the W1W2 repeat domain. *J Virol* **71**, 6619–6628.

**Norris K.L., Youle R.J.** (2008). Cytomegalovirus Proteins vMIA and m38.5 Link Mitochondrial Morphogenesis to Bcl-2 Family Proteins. *J Virol* **82**, 6232–6243.

**Nowag H., Münz C.** (2015). Diverting autophagic membranes for exocytosis. *Autophagy* **11**, 425–427.

**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**, 116–125.

**Nowosad A., Creff J., Jeannot P., Cullerrier R., Codogno P., Manenti S., Nguyen L., Besson A.** (2021). p27 controls autophagic vesicle trafficking in glucose-deprived cells via the regulation of ATAT1-mediated microtubule acetylation. *Cell Death Dis* **12**, 1–18.

---

**O**


---

**Ojeda D.S., Grasso D., Urquiza J., Till A., Vaccaro M.I., Quarleri J.** (2018). Cell Death Is Counteracted by Mitophagy in HIV-Productively Infected Astrocytes but Is Promoted by Inflammasome Activation Among Non-productively Infected Cells. *Front. Immunol.* **9**.

**Okamoto K., Kondo-Okamoto N., Ohsumi Y.** (2009). Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. *Dev Cell* **17**, 87–97.

**Okatsu K., Kimura M., Oka T., Tanaka K., Matsuda N.** (2015). Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment. *J Cell Sci* **128**, 964–978.

**Oku M., Sakai Y.** (2018). Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *Bioessays* **40**, e1800008.

**Onoguchi K., Onomoto K., Takamatsu S., Jogi M., Takemura A., Morimoto S., Julkunen I., Namiki H., Yoneyama M., Fujita T.** (2010). Virus-Infection or 5'ppp-RNA Activates Antiviral Signal through Redistribution of IPS-1 Mediated by MFN1. *PLoS Pathog* **6**, e1001012.

**Oral O., Oz-Arslan D., Itah Z., Naghavi A., Deveci R., Karacali S., Gozuacik D.** (2012). Cleavage of Atg3 protein by caspase-8 regulates autophagy during receptor-activated cell death. *Apoptosis* **17**, 810–820.

**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. *Mol Biol Cell* **23**, 1860–1873.

**Otsu K., Murakawa T., Yamaguchi O.** (2015). BCL2L13 is a mammalian homolog of the yeast mitophagy receptor Atg32. *Autophagy* **11**, 1932–1933.

---

**P**

---

**Pagliarini V., Wirawan E., Romagnoli A., Ciccocanti F., Lisi G., Lippens S., Cecconi F., Fimia G.M., Vandenabeele P., Corazzari M., Piacentini M.** (2012). Proteolysis of Ambra1 during apoptosis has a role in the inhibition of the autophagic pro-survival response. *Cell Death Differ* **19**, 1495–1504.

**Palikaras K., Lionaki E., Tavernarakis N.** (2018). Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat Cell Biol* **20**, 1013–1022.

**Palser A.L., Grayson N.E., White R.E., Corton C., Correia S., Ba Abdullah M.M., Watson S.J., Cotten M., Arrand J.R., Murray P.G., Allday M.J., Rickinson A.B., Young L.S., Farrell P.J., Kellam P.** (2015). Genome diversity of Epstein-Barr virus from multiple tumor types and normal infection. *J Virol* **89**, 5222–5237.

**Park S., Juliana C., Hong S., Datta P., Hwang I., Fernandes-Alnemri T., Yu J.-W., Alnemri E.S.** (2013). The mitochondrial antiviral protein MAVS associates with NLRP3 and regulates its inflammasome activity. *J Immunol* **191**, 4358–4366.

**Park S., Won J.-H., Hwang I., Hong S., Lee H.K., Yu J.-W.** (2015). Defective mitochondrial fission augments NLRP3 inflammasome activation. *Sci Rep* **5**, 15489.

**Parzych K.R., Klionsky D.J.** (2014). An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid Redox Signal* **20**, 460–473.

**Pasdeloup D.** (2016). Intracellular trafficking of Herpesviruses. *Virologie* **20**, 38–46.

**Patil S., Rao R.S., Raj A.T.** (2015). Dual Role of Autophagy in Oral Cancer. *J Int Oral Health* **7**, 1.

**Pattingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang X.H., Mizushima N., Packer M., Schneider M.D., Levine B.** (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927–939.

**Pearson G.R., Luka J., Petti L., Sample J., Birkenbach M., Braun D., Kieff E.** (1987). Identification of an Epstein-Barr virus early gene encoding a second component of the restricted early antigen complex. *Virology* **160**, 151–161.

**Pelengaris S., Khan M., Evan G.** (2002). c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* **2**, 764–776.

**Peng R., Moses S.C., Tan J., Kremmer E., Ling P.D.** (2005). The Epstein-Barr Virus EBNA-LP Protein Preferentially Coactivates EBNA2-Mediated Stimulation of Latent Membrane Proteins Expressed from the Viral Divergent Promoter. *J Virol* **79**, 4492–4505.

**Perdiz D., Mackeh R., Poüs C., Baillet A.** (2011). The ins and outs of tubulin acetylation: More than just a post-translational modification? *Cell Signalling* **23**, 763–771.

**Perdiz D., Lorin S., Leroy-Gori I., Poüs C.** (2017). Stress-induced hyperacetylation of microtubule enhances mitochondrial fission and modulates the phosphorylation of Drp1 at 616 Ser. *Cell Signalling* **39**, 32–43.

**Pérez-Hernández M., Arias A., Martínez-García D., Pérez-Tomás R., Quesada R., Soto-Cerrato V.** (2019). Targeting Autophagy for Cancer Treatment and Tumor Chemosensitization. *Cancers* **11**, 1599.

**Pétrilli V., Papin S., Dostert C., Mayor A., Martinon F., Tschopp J.** (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* **14**, 1583–1589.



- Pfeffer S., Zavolan M., Grässer F.A., Chien M., Russo J.J., Ju J., John B., Enright A.J., Marks D., Sander C., Tuschl T.** (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* *304*, 734–736.
- Pfüller R., Hammerschmidt W.** (1996). Plasmid-like replicative intermediates of the Epstein-Barr virus lytic origin of DNA replication. *J Virol* *70*, 3423–3431.
- Picca A., Guerra F., Calvani R., Coelho-Junior H.J., Bossola M., Landi F., Bernabei R., Bucci C., Marzetti E.** (2020). Generation and Release of Mitochondrial-Derived Vesicles in Health, Aging and Disease. *J Clin Med* *9*, 1440–1461.
- Pickles S., Vigié P., Youle R.J.** (2018). Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol* *28*, 170–185.
- Pila-Castellanos I., Molino D., McKellar J., Lines L., Da Graca J., Tazuet M., Chanteloup L., Mikaelian I., Meyniel-Schicklin L., Codogno P., Vonderscher J., Delevoye C., Moncorgé O., Meldrum E., Goujon C., et al.** (2021). Mitochondrial morphodynamics alteration induced by influenza virus infection as a new antiviral strategy. *PLoS Pathog* *17*, e1009340.
- Piperno G., LeDizet M., Chang X.J.** (1987). Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J Cell Biol* *104*, 289–302.
- Piya S., White E.J., Klein S.R., Jiang H., McDonnell T.J., Gomez-Manzano C., Fueyo J.** (2011). The E1B19K Oncoprotein Complexes with Beclin 1 to Regulate Autophagy in Adenovirus-Infected Cells. *PLoS One* *6*, e29467.
- Pope J.H., Horne M.K., Scott W.** (1968). Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer* *3*, 857–866.
- Portran D., Schaedel L., Xu Z., Théry M., Nachury M.V.** (2017). Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing. *Nat Cell Biol* *19*, 391–398.
- Pradel B., Robert-Hebmann V., Espert L.** (2020). Regulation of Innate Immune Responses by Autophagy: A Goldmine for Viruses. *Front Immunol* *11*, e578038.
- Procko E., Berguig G.Y., Shen B.W., Song Y., Frayo S., Convertine A.J., Margineantu D., Booth G., Correia B.E., Cheng Y., Schief W.R., Hockenbery D.M., Press O.W., Stoddard B.L., Stayton P.S., et al.** (2014). A computationally designed inhibitor of an Epstein-Barr viral Bcl-2 protein induces apoptosis in infected cells. *Cell* *157*, 1644–1656.
- Puthalakath H., Huang D.C.S., O'Reilly L.A., King S.M., Strasser A.** (1999). The Proapoptotic Activity of the Bcl-2 Family Member Bim Is Regulated by Interaction with the Dynein Motor Complex. *Mol Cell* *3*, 287–296.
- 
- Q**
- 
- Qi Y., Yan L., Yu C., Guo X., Zhou X., Hu X., Huang X., Rao Z., Lou Z., Hu J.** (2016). Structures of human mitofusin 1 provide insight into mitochondrial tethering. *J Cell Biol* *215*, 621–629.
- Quintero O.A., DiVito M.M., Adikes R.C., Kortan M.B., Case L.B., Lier A.J., Panaretos N.S., Slater S.Q., Rengarajan M., Feliu M., Cheney R.E.** (2009). Human Myo19 is a novel myosin that associates with mitochondria. *Curr Biol* *19*, 2008–2013.
- 
- R**
- 
- Rabanal-Ruiz Y., Otten E.G., Korolchuk V.I.** (2017). mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays Biochem* *61*, 565–584.
- Rabson M., Gradoville L., Heston L., Miller G.** (1982). Non-immortalizing P3J-HR-1 Epstein-Barr virus: a deletion mutant of its transforming parent, Jijoye. *J Virol* *44*, 834–844.
- Rambold A.S., Kostecky B., Elia N., Lippincott-Schwartz J.** (2011). Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 10190–10195.

- Rancan C., Schirrmann L., Hüls C., Zeidler R., Moosmann A.** (2015). Latent Membrane Protein LMP2A Impairs Recognition of EBV-Infected Cells by CD8+ T Cells. *PLoS Pathog* *11*, e1004906.
- Ravenhill B.J., Boyle K.B., Muhlinen N. von, 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. *Mol Cell* *74*, 320–329.
- Reed N.A., Cai D., Blasius T.L., Jih G.T., Meyhofer E., Gaertig J., Verhey K.J.** (2006). Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport. *Curr Biol* *16*, 2166–2172.
- Rehwinkel J., Gack M.U.** (2020). RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat Rev Immunol* *20*, 537–551.
- Richter B., Sliter D.A., Herhaus L., Stolz A., Wang C., Beli P., Zaffagnini G., Wild P., Martens S., Wagner S.A., Youle R.J., Dikic I.** (2016). Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 4039–4044.
- Rickinson A.B., Young L.S., Rowe M.** (1987). Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J Virol* *61*, 1310–1317.
- Riley T., Sontag E., Chen P., Levine A.** (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 402–412.
- Robbiani D.F., Deroubaix S., Feldhahn N., Oliveira T.Y., Callen E., Wang Q., Jankovic M., Silva I.T., Rommel P.C., Bosque D., Eisenreich T., Nussenzweig A., Nussenzweig M.C.** (2015). Plasmodium Infection Promotes Genomic Instability and AID-Dependent B Cell Lymphoma. *Cell* *162*, 727–737.
- Roberts R., Ktistakis N.T.** (2013). Omegasomes: PI3P platforms that manufacture autophagosomes. *Essays Biochem* *55*, 17–27.
- Roberts A.J., Kon T., Knight P.J., Sutoh K., Burgess S.A.** (2013). Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* *14*, 713–726.
- Rodriguez K.R., Bruns A.M., Horvath C.M.** (2014). MDA5 and LGP2: accomplices and antagonists of antiviral signal transduction. *J Virol* *88*, 8194–8200.
- Rogov V.V., Suzuki H., Marinković M., Lang V., Kato R., Kawasaki M., Buljubašić M., Šprung M., Rogova N., Wakatsuki S., Hamacher-Brady A., Dötsch V., Dikic I., Brady N.R., Novak I.** (2017). Phosphorylation of the mitochondrial autophagy receptor Nix enhances its interaction with LC3 proteins. *Sci Rep* *7*, 1131–1142.
- Rowe M., Kelly G.L., Bell A.I., Rickinson A.B.** (2009). Burkitt's lymphoma: The Rosetta Stone deciphering Epstein-Barr virus biology. *Semin Cancer Biol* *19*, 377–388.
- Rubinsztein D.C., Codogno P., Levine B.** (2012). Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discovery* *11*, 709–730.
- Rymo L.** (1979). Identification of transcribed regions of Epstein-Barr virus DNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *J Virol* *32*, 8–18.
- 
- S**
- 
- Sahu R., Kaushik S., Clement C.C., Cannizzo E.S., Scharf B., Follenzi A., Potolicchio I., Nieves E., Cuervo A.M., Santambrogio L.** (2011). Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Dev Cell* *20*, 131–139.
- Saito S., Murata T., Kanda T., Isomura H., Narita Y., Sugimoto A., Kawashima D., Tsurumi T.** (2013). Epstein-Barr Virus Deubiquitinase Downregulates TRAF6-Mediated NF- $\kappa$ B Signaling during Productive Replication. *Journal of Virology* *87*, 4060–4070.
- Sakai T., Taniguchi Y., Tamura K., Minoguchi S., Fukuhara T., Strobl L.J., Zimmer-Strobl U., Bornkamm G.W., Honjo T.** (1998). Functional replacement of the intracellular region of the Notch1 receptor by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* *72*, 6034–6039.

- Samanta M., Iwakiri D., Kanda T., Imaizumi T., Takada K.** (2006). EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN. *EMBO J* 25, 4207–4214.
- Saraste A., Pulkki K.** (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45, 528–537.
- Sarid R., Sato T., Bohenzky R.A., Russo J.J., Chang Y.** (1997). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional bcl-2 homologue. *Nat Med* 3, 293–298.
- Schaaf M.B.E., Keulers T.G., Vooijs M.A., Rouschop K.M.A.** (2016). LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *FASEB J* 30, 3961–3978.
- Scheibye-Knudsen M., Fang E.F., Croteau D.L., Wilson D.M., Bohr V.A.** (2015). Protecting the mitochondrial powerhouse. *Trends Cell Biol* 25, 158–170.
- Schellenberg B., Wang P., Keeble J.A., Rodriguez-Enriquez R., Walker S., Owens T.W., Foster F., Tanianis-Hughes J., Brennan K., Streuli C.H., Gilmore A.P.** (2013). Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming. *Mol Cell* 49, 959–971.
- Schepers A., Pich D., Hammerschmidt W.** (1996). Activation of oriLyt, the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus, by BZLF1. *Virology* 220, 367–376.
- Schlegel R.A., Williamson P.** (2001). Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ* 8, 551–563.
- Schneider J.L., Cuervo A.M.** (2014). Autophagy and human disease: emerging themes. *Curr Opin Genet Dev* 26, 16–23.
- Schneider W.M., Chevillotte M.D., Rice C.M.** (2014). Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* 32, 513–545.
- Schweichel J.U., Merker H.J.** (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7, 253–266.
- Sears R.M., May D.G., Roux K.J.** (2019). BioID as a Tool for Protein-Proximity Labeling in Living Cells. *Methods Mol Biol* 2012, 299–313.
- Sekine S., Youle R.J.** (2018). PINK1 import regulation; a fine system to convey mitochondrial stress to the cytosol. *BMC Biol* 16, 1–12.
- Seth R.B., Sun L., Ea C.-K., Chen Z.J.** (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122, 669–682.
- Seto E., Yang L., Middeldorp J., Sheen T.-S., Chen J.-Y., Fukayama M., Eizuru Y., Ooka T., Takada K.** (2005). Epstein-Barr virus (EBV)-encoded BARF1 gene is expressed in nasopharyngeal carcinoma and EBV-associated gastric carcinoma tissues in the absence of lytic gene expression. *J Med Virol* 76, 82–88.
- Seto E., Moosmann A., Grömminger S., Walz N., Grundhoff A., Hammerschmidt W.** (2010). Micro RNAs of Epstein-Barr Virus Promote Cell Cycle Progression and Prevent Apoptosis of Primary Human B Cells. *PLoS Pathog* 6, e1001063.
- Shalini S., Dorstyn L., Dawar S., Kumar S.** (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ* 22, 526–539.
- Shao Z., Borde C., Quignon F., Escargueil A., Marechal V.** (2019). Epstein-Barr Virus BALF0 and BALF1 Modulate Autophagy. *Viruses* 11, 1099–1116.
- Shi C.-S., Qi H.-Y., Boularan C., Huang N.-N., Abu-Asab M., Shelhamer J.H., Kehrl J.H.** (2014). SARS-coronavirus open reading frame-9b suppresses innate immunity by targeting mitochondria and the MAVS/TRAF3/TRAF6 signalosome. *J. Immunol.* 193, 3080–3089.
- Shi J., Zhao Y., Wang K., Shi X., Wang Y., Huang H., Zhuang Y., Cai T., Wang F., Shao F.** (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 526, 660–665.
- Shida T., Cueva J.G., Xu Z., Goodman M.B., Nachury M.V.** (2010). The major  $\alpha$ -tubulin K40 acetyltransferase  $\alpha$ TAT1 promotes rapid

- ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 21517–21522.
- Shimizu S., Kanaseki T., Mizushima N., Mizuta T., Arakawa-Kobayashi S., Thompson C.B., Tsujimoto Y.** (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 6, 1221–1228.
- Simon V.R., Swayne T.C., Pon L.A.** (1995). Actin-dependent mitochondrial motility in mitotic yeast and cell-free systems: identification of a motor activity on the mitochondrial surface. *J Cell Biol* 130, 345–354.
- Singh R., Letai A., Sarosiek K.** (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 175–193.
- Smirnova E., Griparic L., Shurland D.L., van der Bliek A.M.** (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12, 2245–2256.
- Solomon V.R., Lee H.** (2009). Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur J Pharmacol* 625, 220–233.
- Song S., Jiang Z., Spezia-Lindner D.E., Liang T., Xu C., Wang H., Tian Y., Bai Y.** (2020). BHRF1 Enhances EBV Mediated Nasopharyngeal Carcinoma Tumorigenesis through Modulating Mitophagy Associated with Mitochondrial Membrane Permeabilization Transition. *Cells* 9, 1158–1174.
- Soubannier V., McLelland G.-L., Zunino R., Braschi E., Rippstein P., Fon E.A., McBride H.M.** (2012). A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes. *Curr Biol* 22, 135–141.
- Southwell D.G., Paredes M.F., Galvao R.P., Jones D.L., Froemke R.C., Sebe J.Y., Alfaro-Cervello C., Tang Y., Garcia-Verdugo J.M., Rubenstein J.L., Baraban S.C., Alvarez-Buylla A.** (2012). Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons. *Nature* 491, 109–113.
- Spinelli J.B., Haigis M.C.** (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol* 20, 745–754.
- Springer M.Z., Macleod K.F.** (2016). Mitophagy: Mechanisms and Role in Human Disease. *J Pathol* 240, 253–255.
- Strappazon F., Vietri-Rudan M., Campello S., Nazio F., Florenzano F., Fimia G.M., Piacentini M., Levine B., Cecconi F.** (2011). Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy. *EMBO J* 30, 1195–1208.
- Strappazon F., Nazio F., Corrado M., Cianfanelli V., Romagnoli A., Fimia G.M., Campello S., Nardacci R., Piacentini M., Campanella M., Cecconi F.** (2015). AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell Death Differ* 22, 419–432.
- Strasser A., Cory S., Adams J.M.** (2011). Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J* 30, 3667–3683.
- Straub F., Welz T., Alberico H., Oliveira Brandao R., Huber A., Samol-Wolf A., Brakebusch C., Woods D., Kollmar M., Martin-Gonzalez J., Kerkhoff E.** (2020). The SPIRE1 actin nucleator coordinates actin/myosin functions in the regulation of mitochondrial motility. *BioRxiv* 1–45.
- Sugden B.** (2014). Epstein-Barr virus: the path from association to causality for a ubiquitous human pathogen. *PLoS Biol* 12, e1001939.
- Sugiura A., McLelland G.-L., Fon E.A., McBride H.M.** (2014). A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO J* 33, 2142–2156.
- Sun C.C., Thorley-Lawson D.A.** (2007). Plasma cell-specific transcription factor XBP-1s binds to and transactivates the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter. *J Virol* 81, 13566–13577.
- Sun B., Sundström K.B., Chew J.J., Bist P., Gan E.S., Tan H.C., Goh K.C., Chawla T., Tang C.K., Ooi E.E.** (2017). Dengue virus activates cGAS through the release of mitochondrial DNA. *Sci Rep* 7, 3594.

- Sun L., Wu J., Du F., Chen X., Chen Z.J.** (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* *339*, 786–791.
- Suzuki Y., Nakabayashi Y., Takahashi R.** (2001). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 8662–8667.
- Swanson K.V., Deng M., Ting J.P.-Y.** (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* *19*, 477–489.
- Szymula A., Palermo R.D., Bayoumy A., Groves I.J., Abdullah M.B., Holder B., White R.E.** (2018). Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-LP is essential for transforming naïve B cells, and facilitates recruitment of transcription factors to the viral genome. *PLoS Pathog* *14*, e1006890.
- 
- T**
- 
- Tabiasco J., Vercellone A., Meggetto F., Hudrisier D., Brousset P., Fournié J.-J.** (2003). Acquisition of viral receptor by NK cells through immunological synapse. *J Immunol* *170*, 5993–5998.
- Takada K.** (2012). Role of EBER and BARF1 in nasopharyngeal carcinoma (NPC) tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* *22*, 162–165.
- Takamura A., Komatsu M., Hara T., Sakamoto A., Kishi C., Waguri S., Eishi Y., Hino O., Tanaka K., Mizushima N.** (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* *25*, 795–800.
- Tang B.** (2018). Miro—Working beyond Mitochondria and Microtubules. *Cells* *7*, 18–24.
- Tang E.D., Wang C.-Y.** (2009). MAVS self-association mediates antiviral innate immune signaling. *J Virol* *83*, 3420–3428.
- Tang S.C.W., Yiu W.H.** (2020). Innate immunity in diabetic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology* *16*, 206–222.
- Tarodi B., Subramanian T., Chinnadurai G.** (1994). Epstein-Barr virus BHRF1 protein protects against cell death induced by DNA-damaging agents and heterologous viral infection. *Virology* *201*, 404–407.
- Tasdemir E., Maiuri M.C., Galluzzi L., Vitale I., Djavaheri-Mergny M., D’Amelio M., Criollo A., Morselli E., Zhu C., Harper F., Nannmark U., Samara C., Pinton P., Vicencio J.M., Carnuccio R., et al.** (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* *10*, 676–687.
- Tattevin P., Crémieux A.-C., Descamps D., Carbon C.** (2002). Transfusion-related infectious mononucleosis. *Scand J Infect Dis* *34*, 777–778.
- Tavakoli A., Monavari S.H., Solaymani Mohammadi F., Kiani S.J., Armat S., Farahmand M.** (2020). Association between Epstein-Barr virus infection and gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* *20*, 493–506.
- Taylor G.S., Long H.M., Brooks J.M., Rickinson A.B., Hislop A.D.** (2015). The Immunology of Epstein-Barr Virus-Induced Disease. *Ann Rev Immunol* *33*, 787–821.
- Taylor R.C., Cullen S.P., Martin S.J.** (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 231–241.
- Tekirdag K., Cuervo A.M.** (2018). Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Jointed by a chaperone. *J Biol Chem* *293*, 5414–5424.
- Tempera I., Lieberman P.M.** (2010). Chromatin Organization of Gammaherpesvirus Latent Genomes. *Biochim Biophys Acta* *1799*, 236–245.
- Temple R.M., Zhu J., Budgeon L., Christensen N.D., Meyers C., Sample C.E.** (2014). Efficient replication of Epstein-Barr virus in stratified epithelium in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 16544–16549.
- Thomas R., Macsween K.F., McAulay K., Clutterbuck D., Anderson R., Reid S., Higgins C.D., Swerdlow A.J., Harrison N., Williams H., Crawford D.H.** (2006). Evidence of shared Epstein-Barr viral isolates between sexual

partners, and low level EBV in genital secretions. *J Med Virol* 78, 1204–1209.

**Thompson M.R., Kaminski J.J., Kurt-Jones E.A., Fitzgerald K.A.** (2011). Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection. *Viruses* 3, 920–940.

**Thorley-Lawson D.A., Hawkins J.B., Tracy S.I., Shapiro M.** (2013). The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection. *Curr Opin Virol* 3, 227–232.

**Tierney R.J., Shannon-Lowe C.D., Fitzsimmons L., Bell A.I., Rowe M.** (2015). Unexpected patterns of Epstein-Barr virus transcription revealed by a High throughput PCR array for absolute quantification of viral mRNA. *Virology* 474, 117–130.

**Tomkinson B., Robertson E., Kieff E.** (1993). Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 67, 2014–2025.

**Tompkins K.D., Thorburn A.** (2019). Regulation of Apoptosis by Autophagy to Enhance Cancer Therapy. *Yale J Biol Med* 92, 707–718.

**Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A.** (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65, 87–108.

**Tsao S.-W., Tsang C.M., To K.-F., Lo K.-W.** (2015). The role of Epstein-Barr virus in epithelial malignancies. *J Pathol* 235, 323–333.

**Tsao S.W., Tsang C.M., Lo K.W.** (2017). Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372, e2160270.

**Tsujimoto Y., Finger L.R., Yunis J., Nowell P.C., Croce C.M.** (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226, 1097–1099.

**Tsukada M., Ohsumi Y.** (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333, 169–174.

**Tsukamoto S., Kuma A., Murakami M., Kishi C., Yamamoto A., Mizushima N.** (2008). Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* 321, 117–120.

**Twig G., Shirihai O.S.** (2011). The Interplay Between Mitochondrial Dynamics and Mitophagy. *Antioxid Redox Signal* 14, 1939–1951.

---

## V

---

**Van Spronsen M., Mikhaylova M., Lipka J., Schlager M.A., van den Heuvel D.J., Kuijpers M., Wulf P.S., Keijzer N., Demmers J., Kapitein L.C., Jaarsma D., Gerritsen H.C., Akhmanova A., Hoogenraad C.C.** (2013). TRAK/Milton motor-adaptor proteins steer mitochondrial trafficking to axons and dendrites. *Neuron* 77, 485–502.

**Vaux D.L., Cory S., Adams J.M.** (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440–442.

**Vazquez C., Horner S.M.** (2015). MAVS Coordination of Antiviral Innate Immunity. *J Virol* 89, 6974–6977.

**Vigié P., Camougrand N.** (2017). Mitophagie et contrôle qualité des mitochondries. *Med Sci* 33, 231–237.

**Vilmen G., Glon D., Siracusano G., Lussignol M., Shao Z., Hernandez E., Perdiz D., Quignon F., Mouna L., Poüs 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* 17, 1296–1315.

**Vo M.T., Smith B.J., Nicholas J., Choi Y.B.** (2019). Activation of NIX-mediated mitophagy by an interferon regulatory factor homologue of human herpesvirus. *Nature Communications* 10, 1–17.

**Vousden K.H.** (2005). p53 and PUMA: A Deadly Duo. *Science* 309, 1685–1686.



---

**W**


---

- Waldner H.** (2009). The role of innate immune responses in autoimmune disease development. *Autoimmun Rev* 8, 400–404.
- Wang C., Youle R.J.** (2009). The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annu Rev Genet* 43, 95–118.
- Wang X., Schwarz T.L.** (2009). The Mechanism of Ca<sup>2+</sup>-Dependent Regulation of Kinesin-Mediated Mitochondrial Motility. *Cell* 136, 163–174.
- Wang F., Seldin D.C., Annis B., Trocha A., Johnson R.P.** (1998a). Immune modulation of human B lymphocytes by gene transfer with recombinant Epstein-Barr virus amplicons. *J Virol Methods* 72, 81–93.
- Wang H., Fu B., Gale R.P., Liang Y.** (2021). NK-/T-cell lymphomas. *Leukemia* 1–9.
- Wang J.-T., Doong S.-L., Teng S.-C., Lee C.-P., Tsai C.-H., Chen M.-R.** (2009). Epstein-Barr Virus BGLF4 Kinase Suppresses the Interferon Regulatory Factor 3 Signaling Pathway. *Journal of Virology* 83, 1856–1869.
- Wang K., Ma H., Liu H., Ye W., Li Z., Cheng L., Zhang L., Lei Y., Shen L., Zhang F.** (2019). The Glycoprotein and Nucleocapsid Protein of Hantaviruses Manipulate Autophagy Flux to Restrain Host Innate Immune Responses. *Cell Reports* 27, 2075-2091.e5.
- Wang L.W., Jiang S., Gewurz B.E.** (2017). Epstein-Barr Virus LMP1-Mediated Oncogenicity. *J Virol* 91, e01718-16.
- Wang P., Deng Y., Guo Y., Xu Z., Li Y., Ou X., Xie L., Lu M., Zhong J., Li B., Hu L., Deng S., Peng T., Cai M., Li M.** (2020a). Epstein-Barr Virus Early Protein BFRF1 Suppresses IFN- $\beta$  Activity by Inhibiting the Activation of IRF3. *Front Immunol* 11, 513383.
- Wang R., Zhu Y., Ren C., Yang S., Tian S., Chen H., Jin M., Zhou H.** (2020b). Influenza A virus protein PB1-F2 impairs innate immunity by inducing mitophagy. *Autophagy* 1–16.
- Wang X., Kenyon W.J., Li Q., Müllberg J., Hutt-Fletcher L.M.** (1998b). Epstein-Barr virus uses different complexes of glycoproteins gH and gL to infect B lymphocytes and epithelial cells. *J Virol* 72, 5552–5558.
- Watanabe A., Maruo S., Ito T., Ito M., Katsumura K.R., Takada K.** (2010). Epstein-Barr Virus-Encoded Bcl-2 Homologue Functions as a Survival Factor in Wp-Restricted Burkitt Lymphoma Cell Line P3HR-1. *J Virol* 84, 2893–2901.
- Wei Y., Pattingre S., Sinha S., Bassik M., Levine B.** (2008). JNK1-Mediated Phosphorylation of Bcl-2 Regulates Starvation-Induced Autophagy. *Mol Cell* 30, 678–688.
- Weiss D.J., Lucas T.C.D., Nguyen M., Nandi A.K., Bisanzio D., Battle K.E., Cameron E., Twohig K.A., Pfeiffer D.A., Rozier J.A., Gibson H.S., Rao P.C., Casey D., Bertozzi-Villa A., Collins E.L., et al.** (2019). Mapping the global prevalence, incidence, and mortality of Plasmodium falciparum, 2000–17: a spatial and temporal modelling study. *The Lancet* 394, 322–331.
- Wen W., Iwakiri D., Yamamoto K., Maruo S., Kanda T., Takada K.** (2007). Epstein-Barr Virus BZLF1 Gene, a Switch from Latency to Lytic Infection, Is Expressed as an Immediate-Early Gene after Primary Infection of B Lymphocytes. *J Virol* 81, 1037–1042.
- West A.P., Shadel G.S., Ghosh S.** (2011). Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 11, 389–402.
- White E.** (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 401–410.
- White R.E., Rämer P.C., Naresh K.N., Meixlsperger S., Pinaud L., Rooney C., Savoldo B., Coutinho R., Bödör C., Gribben J., Ibrahim H.A., Bower M., Nourse J.P., Gandhi M.K., Middeldorp J., et al.** (2012). EBNA3B-deficient EBV promotes B cell lymphomagenesis in humanized mice and is found in human tumors. *J Clin Invest* 122, 1487–1502.
- Wild P., McEwan D.G., Dikic I.** (2014). The LC3 interactome at a glance. *J Cell Sci* 127, 3–9.

- Wille C.K., Nawandar D.M., Panfil A.R., Ko M.M., Hagemeyer S.R., Kenney S.C.** (2013). Viral Genome Methylation Differentially Affects the Ability of BZLF1 versus BRLF1 To Activate Epstein-Barr Virus Lytic Gene Expression and Viral Replication. *J Virol* **87**, 935–950.
- Williams L.R., Quinn L.L., Rowe M., Zuo J.** (2016). Induction of the Lytic Cycle Sensitizes Epstein-Barr Virus-Infected B Cells to NK Cell Killing That Is Counteracted by Virus-Mediated NK Cell Evasion Mechanisms in the Late Lytic Cycle. *J Virol* **90**, 947–958.
- Wilson J.B., Bell J.L., Levine A.J.** (1996). Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *EMBO J* **15**, 3117–3126.
- Wirawan E., Vande Walle L., Kersse K., Cornelis S., Claerhout S., Vanoverberghe I., Roelandt R., De Rycke R., Verspurten J., Declercq W., Agostinis P., Vanden Berghe T., Lippens S., Vandenabeele P.** (2010). Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis* **1**, e18.
- Wong H.-S., Dighe P.A., Mezera V., Monternier P.-A., Brand M.D.** (2017). Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 16804–16809.
- Wu B., Peisley A., Richards C., Yao H., Zeng X., Lin C., Chu F., Walz T., Hur S.** (2013). Structural Basis for dsRNA Recognition, Filament Formation, and Antiviral Signal Activation by MDA5. *Cell* **152**, 276–289.
- Wu J., Li W., Shao Y., Avey D., Fu B., Gillen J., Hand T., Ma S., Liu X., Miley W., Konrad A., Neipel F., Stürzl M., Whitby D., Li H., et al.** (2015). Inhibition of cGAS DNA Sensing by a Herpesvirus Virion Protein. *Cell Host & Microbe* **18**, 333–344.
- Wu L., Fossum E., Joo C.H., Inn K.-S., Shin Y.C., Johannsen E., Hutt-Fletcher L.M., Hass J., Jung J.U.** (2009). Epstein-Barr Virus LF2: an Antagonist to Type I Interferon. *Journal of Virology* **83**, 1140–1146.
- Wycisk A.I., Lin J., Loch S., Hobohm K., Funke J., Wieneke R., Koch J., Skach W.R., Mayerhofer P.U., Tampé R.** (2011). Epstein-Barr Viral BNLF2a Protein Hijacks the Tail-anchored Protein Insertion Machinery to Block Antigen Processing by the Transport Complex TAP. *J Biol Chem* **286**, 41402–41412.
- 
- X**
- 
- Xia M., Gonzalez P., Li C., Meng G., Jiang A., Wang H., Gao Q., Debatin K.-M., Beltinger C., Wei J.** (2014). Mitophagy enhances oncolytic measles virus replication by mitigating DDX58/RIG-I-like receptor signaling. *J. Virol.* **88**, 5152–5164.
- Xiao J., Palefsky J.M., Herrera R., Sunshine C., Tugizov S.M.** (2009). EBV-positive human sera contain antibodies against the EBV BMRF-2 protein. *Virology* **393**, 151–159.
- Xie R., Nguyen S., McKeehan W.L., Liu L.** (2010). Acetylated microtubules are required for fusion of autophagosomes with lysosomes. *BMC Cell Biol* **11**, 89–100.
- Xing L., Kieff E.** (2007). Epstein-Barr Virus BHRF1 Micro- and Stable RNAs during Latency III and after Induction of Replication. *J Virol* **81**, 9967–9975.
- Xing L., Kieff E.** (2011). cis-Acting Effects on RNA Processing and Drosha Cleavage Prevent Epstein-Barr Virus Latency III BHRF1 Expression. *Journal of Virology* **85**, 8929–8939.
- Xing J., Zhang A., Zhang H., Wang J., Li X.C., Zeng M.-S., Zhang Z.** (2017). TRIM29 promotes DNA virus infections by inhibiting innate immune response. *Nat Commun* **8**, 945.
- Xu C., Sun L., Liu W., Duan Z.** (2018). Latent Membrane Protein 1 of Epstein-Barr Virus Promotes RIG-I Degradation Mediated by Proteasome Pathway. *Front Immunol* **9**, 1446.
- Xu L.-G., Wang Y.-Y., Han K.-J., Li L.-Y., Zhai Z., Shu H.-B.** (2005). VISA is an adapter protein

required for virus-triggered IFN-beta signaling. Mol Cell 19, 727–740.

**Xu Y., Yuan J., Lipinski M.M.** (2013). Live imaging and single-cell analysis reveal differential dynamics of autophagy and apoptosis. Autophagy 9, 1418–1430.

**Xu Z.-G., Iwatsuki K., Oyama N., Ohtsuka M., Satoh M., Kikuchi S., Akiba H., Kaneko F.** (2001). The latency pattern of Epstein–Barr virus infection and viral IL-10 expression in cutaneous natural killer/T-cell lymphomas. Br J Cancer 84, 920–925.

---

## Y

---

**Yan N., Chen Z.J.** (2012). Intrinsic antiviral immunity. Nat Immunol 13, 214–222.

**Yang Y., Klionsky D.J.** (2020). Autophagy and disease: unanswered questions. Cell Death & Differentiation 27, 858–871.

**Yang Y., Xing D., Zhou F., Chen Q.** (2010). Mitochondrial autophagy protects against heat shock-induced apoptosis through reducing cytosolic cytochrome c release and downstream caspase-3 activation. Biochem Biophys Res Commun 395, 190–195.

**Yasukawa K., Oshiumi H., Takeda M., Ishihara N., Yanagi Y., Seya T., Kawabata S., Koshiba T.** (2009). Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. Sci Signal 2, 47–58.

**Yates J.L., Warren N., Sugden B.** (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. Nature 313, 812–815.

**Yorimitsu T., Klionsky D.** (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. Cell Death Differ 12, 1542–1552.

**Yoshizumi T., Ichinohe T., Sasaki O., Otera H., Kawabata S., Mihara K., Koshiba T.** (2014). Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. Nat Commun 5, 4713.

**Youle R.J., Narendra D.P.** (2011). Mechanisms of mitophagy. Nat Rev Mol Cell Biol 12, 9–14.

**Young L.S., Dawson C.W.** (2014). Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. Chin J Cancer 33, 581–590.

**Young L.S., Yap L.F., Murray P.G.** (2016). Epstein–Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. Nature Reviews Cancer 16, 789–802.

**Young M.M., Takahashi Y., Khan O., Park S., Hori T., Yun J., Sharma A.K., Amin S., Hu C.-D., Zhang J., Kester M., Wang H.-G.** (2012). Autophagosomal Membrane Serves as Platform for Intracellular Death-inducing Signaling Complex (iDISC)-mediated Caspase-8 Activation and Apoptosis. J Biol Chem 287, 12455–12468.

**Yousefi S., Simon H.-U.** (2009). Autophagy in cells of the blood. Biochim Biophys Acta 1793, 1461–1464.

**Yousefi S., Perozzo R., Schmid I., Ziemiecki A., Schaffner T., Scapozza L., Brunner T., Simon H.-U.** (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. Nat Cell Biol 8, 1124–1132.

**Yu L., Alva A., Su H., Dutt P., Freundt E., Welsh S., Baehrecke E.H., Lenardo M.J.** (2004). Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. Science 304, 1500–1502.

**Yue Z., Jin S., Yang C., Levine A.J., Heintz N.** (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 15077–15082.

---

## Z

---

**Zalani S., Holley-Guthrie E., Kenney S.** (1996). Epstein-Barr viral latency is disrupted by the immediate-early BRLF1 protein through a cell-specific mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 9194–9199.

**Zhang C.X., Decaussin G., Daillie J., Ooka T.** (1988). Altered expression of two Epstein-Barr virus early genes localized in BamHI-A in nonproducer Raji cells. J Virol 62, 1862–1869.

- Zhang X., Wu J., Du F., Xu H., Sun L., Chen Z., Brautigam C.A., Zhang X., Chen Z.J. (2014). The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop. *Cell Rep* 6, 421–430.
- Zhao C., Zhao W. (2020). NLRP3 Inflammasome—A Key Player in Antiviral Responses. *Front Immunol* 11.
- Zheng K., Jiang Y., He Z., Kitazato K., Wang Y. (2017). Cellular defence or viral assist: the dilemma of HDAC6. *J Gen Virol* 98, 322–337.
- Zhong B., Yang Y., Li S., Wang Y.-Y., Li Y., Diao F., Lei C., He X., Zhang L., Tien P., Shu H.-B. (2008). The Adaptor Protein MITA Links Virus-Sensing Receptors to IRF3 Transcription Factor Activation. *Immunity* 29, 538–550.
- Zhong Z., Umemura A., Sanchez-Lopez E., Liang S., Shalapour S., Wong J., He F., Boassa D., Perkins G., Ali S.R., McGeough M.G., Ellisman M.H., Seki E., Gustafsson A.B., Hoffman H.M., et al. (2016). NF- $\kappa$ B Restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria. *Cell* 164, 896–910.
- Zhou R., Yazdi A.S., Menu P., Tschopp J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221–225.
- Zhu L., Mou C., Yang X., Lin J., Yang Q. (2016). Mitophagy in TGEV infection counteracts oxidative stress and apoptosis. *Oncotarget* 7, 27122–27141.
- Zhu L.-H., Gao S., Jin R., Zhuang L.-L., Jiang L., Qiu L.-Z., Xu H.-G., Zhou G.-P. (2014). Repression of interferon regulatory factor 3 by the Epstein-Barr virus immediate-early protein Rta is mediated through E2F1 in HeLa cells. *Mol Med Rep* 9, 1453–1459.
- Zitvogel L., Galluzzi L., Kepp O., Smyth M.J., Kroemer G. (2015). Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol* 15, 405–414.
- Zuo J., Currin A., Griffin B.D., Shannon-Lowe C., Thomas W.A., Rensing M.E., Wiertz E.J.H.J., Rowe M. (2009). The Epstein-Barr virus G-protein-coupled receptor contributes to immune evasion by targeting MHC class I molecules for degradation. *PLoS Pathog* 5, e1000255.

**Titre :** Régulation de l'autophagie et de la dynamique mitochondriale par BHRF1 : impact sur l'immunité innée et la pathogenèse du virus Epstein-Barr

**Mots clés :** autophagie, BHRF1, immunité innée, microtubules, mitochondrie, Virus Epstein-Barr

**Résumé :** Le virus Epstein-Barr (EBV) est un virus humain ubiquitaire dont la persistance à l'état latent est associée à de nombreux cancers, tels que le lymphome de Burkitt (LB). BHRF1 est une orthologue de BCL-2, qui s'exprime au cours de la latence et du cycle productif. Cette protéine virale est retrouvée dans 15 % des LB liés à l'EBV, les rendant particulièrement résistants au traitement. Initialement, BHRF1 était connue pour son activité anti-apoptotique. Dans ce travail, nous avons souhaité mieux caractériser le rôle de BHRF1, notamment au regard de l'autophagie, un processus de recyclage de constituants cellulaires. Nous avons identifié que BHRF1 stimule l'autophagie et altère la morphodynamique des mitochondries. Plus précisément, BHRF1 augmente la fission mitochondriale et exploite le réseau de microtubules pour induire la formation de mito-agrésomes dans la

région périnucléaire. L'ensemble de ces altérations cellulaires conduisent à la dégradation sélective des mitochondries par autophagie, un processus appelé mitophagie. Nous démontrons aussi que BHRF1 constitue un facteur de restriction de l'immunité antivirale puisqu'elle bloque la production de cytokines antivirales, les interférons. Dans la dernière partie de ce travail, nous avons recherché si ces fonctions étaient retrouvées dans des lymphomes EBV<sup>+</sup> en utilisant des cellules de LB exprimant BHRF1. Dans ce modèle, BHRF1 induit des mito-agrésomes et est aussi à l'origine d'une autophagie cytoprotectrice vis-à-vis de l'apoptose. En conclusion, nous proposons que ces nouvelles fonctions de BHRF1 pourraient participer à la chimiorésistance et à la lymphomagenèse des LB liés à l'EBV.

**Title:** Regulation of autophagy and mitochondrial dynamics by BHRF1: impact on innate immunity and Epstein-Barr virus pathogenesis

**Keywords:** autophagy, BHRF1, Epstein-Barr Virus, innate immunity, microtubules, mitochondria

**Abstract:** The Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous human virus whose latent persistence is associated with several cancers, including Burkitt lymphoma (BL). BHRF1 is a BCL-2 ortholog, expressed during latency and the productive cycle. This viral protein is expressed in 15% of EBV-related BL, making them particularly resistant to treatment. Initially, BHRF1 was known for its anti-apoptotic activity. In this work, we focused on better characterizing the role of BHRF1, notably regarding autophagy, a recycling process for intracellular components. We have identified that BHRF1 stimulates autophagy and alters mitochondrial morphodynamics. More precisely, BHRF1 increases mitochondrial fission and uses the microtubule network to induce the formation

of a mito-aggresome in the perinuclear region. All of these cellular alterations lead to the selective degradation of mitochondria by autophagy, a process called mitophagy. We also demonstrated that BHRF1 constitutes a restriction factor of antiviral immunity, since it blocks the production of antiviral cytokines called interferon. In the last part of this work, we investigated whether these functions were found in EBV<sup>+</sup> LB cells expressing BHRF1. In this model, we observed that BHRF1 induces the formation of mito-aggresomes, and stimulates cytoprotective autophagy against apoptosis. In conclusion, we propose that these new functions of BHRF1 could participate in the chemoresistance and the lymphomagenesis of EBV-related BL.