



Étude du mécanisme d'action de la protéine antivirale NCOA7-AS

Marine Tauziet

► To cite this version:

Marine Tauziet. Étude du mécanisme d'action de la protéine antivirale NCOA7-AS. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. hal-03548949

HAL Id: hal-03548949

<https://ephe.hal.science/hal-03548949>

Submitted on 31 Jan 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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



**École Pratique
des Hautes Études**

PSL 

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté par

Marine TAUZIET

Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

Étude du mécanisme d'action de la protéine antivirale NCOA7-AS

Soutenu le 10 Novembre 2021 devant le jury suivant :

Dr. Emmanuel BELAMIE – Président du jury

Dr. Caroline GOUJON – Tutrice scientifique

Dr. Maxime RATINIER – Tuteur pédagogique

Dr. Florence NIEDERGANG – Rapportrice

Dr. Lucile ESPERT – Examinatrice

Dr. Mathias FAURE – Examinateur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. Caroline GOUJON

Equipe Interféron et restriction antivirale, IRIM UMR9004 CNRS-UM (Montpellier)

Directeur : Jean-Michel MESNARD

Et de :

Dr. Maxime RATINIER

Unité Infections Virales et Pathologie Comparée (IVPC), UMR754 UCBL-INRAE-EPHE (Lyon)

Directrice : Fabienne ARCHER



**École Pratique
des Hautes Études**

PSL 

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté par

Marine TAUZIET

Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

Étude du mécanisme d'action de la protéine antivirale NCOA7-AS

Soutenu le 10 Novembre 2021 devant le jury suivant :

Dr. Emmanuel BELAMIE – Président du jury

Dr. Caroline GOUJON – Tutrice scientifique

Dr. Maxime RATINIER – Tuteur pédagogique

Dr. Florence NIEDERGANG – Rapportrice

Dr. Lucile ESPERT – Examinatrice

Dr. Mathias FAURE – Examinateur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. Caroline GOUJON

Equipe Interféron et restriction antivirale, IRIM UMR9004 CNRS-UM (Montpellier)

Directeur : Jean-Michel MESNARD

Et de :

Dr. Maxime RATINIER

Unité Infections Virales et Pathologie Comparée (IVPC), UMR754 UCBL-INRAE-EPHE (Lyon)

Directrice : Fabienne ARCHER

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Maxime Ratinier, mon tuteur pédagogique, pour m'avoir suivie tout au long de ces 3 ans de formation continue. Merci pour ta disponibilité et tes conseils.

Merci également aux membres du jury Emmanuel Belamie, Florence Niedergang, Lucile Espert et Mathias Faure pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche.

Un immense merci à Caroline Goujon, ma tutrice scientifique, sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Merci de m'avoir donné l'opportunité, il y a plus de 4 ans maintenant, d'intégrer ton équipe. Merci de m'avoir fait confiance durant toutes ces années pour que je puisse travailler sur un projet qui te tenais particulièrement à cœur et dans lequel je me suis beaucoup investie. Merci pour tous tes précieux conseils, pour ta patience et pour m'avoir aidé à prendre confiance en moi. Tu es un réel exemple et j'espère pouvoir continuer à tes côtés encore un long moment.

Merci Olivier pour ta bonne humeur et tous tes conseils surtout en biologie moléculaire.

Merci à toi, Mary, pour tout ton impressionnant travail de biochimie/cristallographie qui ont permis de bien faire avancer le projet et pour la bonne ambiance que tu amènes dans l'équipe.

Merci Boris pour tout ce que tu m'as appris lorsque j'étais ta stagiaire lors de ta première année de thèse. Tu as fait de moi la serial cloneuse que je suis aujourd'hui. Un grand merci pour tous nos bons moments passés ensemble dans l'équipe.

Joe, merci d'être devenu un véritable ami ! Merci d'avoir toujours été là pour moi. J'ai pu compter sur toi durant toutes ces années et je sais que ça continuera ainsi pendant très longtemps.

Merci Antoine pour tous ces moments de rire qui ont fait naître une belle complicité et une réelle amitié.

Merci Ana de t'être autant investie dans l'équipe et de m'avoir autant aidé dans la gestion du labo. Tu es une personne formidable !

Merci Pancho pour ton immense sympathie et ta bonne humeur inébranlable !

Merci à ma très très bonne amie et ancienne collègue Emma. Ta bonne humeur à toute épreuve et ton humour légendaire font de toi quelqu'un d'incroyable ! Ne change jamais ! Merci d'avoir toujours été là pour moi dans n'importe quelles circonstances.

Un énorme merci à mes deux meilleures amies Lisa et Audrey avec qui je passe des moments inoubliables ! Merci d'être toujours là pour moi. Merci de m'avoir soutenue et de m'avoir fait découvrir les joies d'une vie simple et pleine d'imprévus.

Merci à ma grande sœur Elodie, ma confidente et complice de toujours pour m'avoir soutenue durant ces 3 années de travail mais aussi tout au long de ma vie.

Enfin merci à vous papa et maman, d'être des parents exemplaires et de donner le meilleur de vous-mêmes. Je sais la chance que j'ai de vous avoir.

Table des matières

Remerciements	2
Liste des abréviations	7
Liste des figures	10
Liste des tableaux	12
Liste des annexes	13
Préambule	14
Introduction	17
I) Les virus influenza	17
1) Découverte et historique	17
2) Classification	18
3) Organisation du génome	19
4) Structure des virus influenza A	20
4) Cycle de réplication virale	22
5) Réservoirs et transmissions des virus influenza A	25
5.1) Les oiseaux sauvages	25
5.2) Transmission aux volailles domestiques	25
6) Mécanismes d'évolution génétique	26
6.1) Le glissement antigénique	26
6.2) La cassure antigénique	26
7) Vaccins et traitements	27
II) Interaction immunité innée et IAV	28
1) Détection du virus influenza A	28
1.1) Les récepteurs Toll-Like (TLR)	28
1.2) La protéine inductible à l'acide rétinoïque : RIG-I	29
2) La voie de transduction des interférons	29
3) Les facteurs de restrictions	31
3.1) Les facteurs de restriction qui inhibent l'entrée virale	31
3.2) Les facteurs de restriction qui inhibent la réplication du génome viral	32
3.3) Les facteurs de restriction qui affectent l'assemblage virale, la sortie ou la maturation	32
III) La protéine antivirale NCOA7	34
1) Les protéines à domaine TLDc	34

2) Les différentes isoformes de NCOA7	35
2.1) NCOA7-FL	35
2.2) NCOA7-AS.....	36
3) Mécanismes d'action de NCOA7-AS	36
3.1) Résistance au stress oxydatif	36
3.2) Activité antivirale	38
3.3) Impact de NCOA7-AS sur le pH endolysosomal.....	40
3.4) Interaction avec la V-ATPase.....	41
IV) Caractéristiques et fonctions des protéines Sorting Nexins (SNX)	43
1) Les SNX.....	43
2) Les voies d'export des endosomes.....	44
3) La sous-famille des SNX-BAR	45
4) Le rôle des SNX-BAR dans l'export des endosomes	46
4.1) Le rétromère	46
4.2) Fonction des hétérodimères SNX1/SNX2:SNX5/SNX6 dans le transport rétrograde	47
V) L'autophagie.....	50
1) Les différentes formes d'autophagie.....	50
2) Les mécanismes de la macroautophagie.....	50
2.1) Initiation	51
2.2) Elongation	52
2.3) Maturation	52
3) Relation entre autophagie et virus	53
3.1) Induction de l'autophagie par les virus.....	53
3.2) Fonction de l'autophagie dans l'immunité innée et adaptative.....	53
4) Relation entre autophagie et SNX	54
4.1) Rôle des SNX-BAR dans l'autophagie	54
4.2) Fonction de SNX5 dans l'autophagie	54
Objectif du projet	55
Matériel et méthodes.....	56
I) Matériels.....	56
1) Plasmides et constructions	56
2) Culture cellulaire.....	56
II) Méthodes	57

1) Production de vecteurs lentiviraux et transduction	57
2) Infection avec IAV	57
3) Expériences d'ARN interférence	58
4) Western blots.....	58
5) Co-immunoprécipitation.....	59
6) Spectrométrie de masse	59
7) Immunofluorescence	60
8) Calcul des coefficients de colocalisation	60
9) Test d'acidification des organelles.....	61
10) Inhibition du complexe PI3K classe III.....	61
11) Quantification de l'expression des ARNm	61
13) Analyse statistique.....	61
Résultats.....	62
I) Etude des partenaires protéiques de NCOA7-AS	62
1) Recherche des interactants de NCOA7-AS par spectrométrie de masse : identification des protéines SNX-BAR 1/2/5/6.....	62
2) Confirmation de l'interaction entre les SNX-BAR et NCOA7-AS.....	64
II) Etude de l'impact des SNX sur l'activité antivirale de NCOA7-AS.....	66
1) Impact de NCOA7-AS sur la localisation du CI-MPR	66
2) Impact de la déplétion des SNX d'intérêt sur l'activité antivirale de NCOA7-AS	68
3) Impact des SNX sur l'acidification endosomale	70
III) Etude du rôle de l'autophagie dans l'activité antivirale de NCOA7-AS.....	71
1) Un Lien entre l'autophagie et NCOA7-AS ?	71
2) Implication de Beclin1 dans l'activité antivirale de NCOA7-AS	72
3) Impact des siSNX5/6 et siBeclin1 sur l'accumulation de LC3-II	74
4) Importance de l'autophagie dans l'activité antivirale de NCOA7-AS	76
5) Impact des SNX et Beclin1 sur l'effet antiviral de l'IFN	77
Discussion et perspectives	80
Conclusion générale	90
Bibliographie	91

Liste des abréviations

ARN : Acide ribonucléique

ARNc : ARN complémentaire

ARNdb : ARN double brin

ARNm : ARN messager

ARNsb : ARN simple brin

ARNv : ARN viral

BAR : Bin-Amphiphysin-Rvs

CI-MPR : Récepteur au mannose-6-phosphate

CRISPR/Cas9 : Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées associée à la protéine 9

CMA : Autophagie médiée par les chaperons

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

ERAP140 : Protéine associée aux récepteurs d'œstrogènes

ERbd : Domain de liaison à l'œstrogène

GABARAP : Protéine associée au récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique

HA : Hémagglutinine

VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humaine 1

IAHP : Influenza aviaires hautement pathogènes

IAFP : Influenza aviaires faiblement pathogènes

IFITM : Protéine transmembranaire 1 induite par l'interféron

IFN : Interféron

IFNAR1/2 : Récepteur à IFN- α 1/2

IFNLR1 : Récepteur à l'IFN- λ 1

IGF2R : Récepteur du facteur de croissance analogue à l'insuline 2

IL10R2 : Récepteur 2 à l'interleukine 10

IP : Immunoprecipitation

IRF : Facteur de régulation de l'interféron

ISG : Gène stimulé par l'interféron

ISRE : Élément de réponse stimulé par l'interféron

JAK : Janus kinase

LPS : Lipopolysaccharides

M1 : Protéine de matrice 1

M2 : Protéine de matrice 2

MAVS : Protéine de signalisation antivirale mitochondriale

mTOR : Cible mécaniste de la rapamycine

Mx : Myxovirus resistance

NA : Neuraminidase

NCOA7 : Coactivateur des récepteurs nucléaires 7

NES : Signal d'export nucléaire

NLS : Signal de localisation nucléaire

NP : Nucléoprotéine

NS1 : Protéine non-structurale 1

NS2 : Protéine non-structurale 2

OXR : Protéine de résistance à l'oxydation

PA : Acide polymérase

PAMPs : motifs moléculaires associés aux pathogènes

PB1/2 : Polymérase basique 1/2

PBMC : Cellules mononucléées du sang périphérique

PE : Phosphatidyléthanolamine

PRR : Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

PX : Phox

RIG-I : Gène inductible par l'acide rétinoïque

RNP : Complexes de ribonucléoprotéines

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SNX : Sorting nexin

STAT : Transducteur de signal et activateur de transcription

TGN : Réseau trans-golgi

TLR : Récepteur Toll-like

TRIM : Motif tripartite

IAV : Virus influenza A

VIH : Virus de l'Immunodéficiency Humain

VLP : Particule pseudo-virales

VPS : Tri vacuolaire des protéines

VSV : Virus de la stomatite vésiculeuse

WIPI : Protéine 1 interagissant avec les phosphoinositides du domaine répété WD

KO : Knock out (invalidation)

WT : Wild type (sauvage)

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la transmission inter-espèces des virus influenza A.	19
Figure 2 : Représentation schématique d'une particule virale du virus Influenza A.	21
Figure 3 : Représentation schématique du cycle de réplication d'un virus Influenza A.....	24
Figure 4 : Représentation schématique de la détection d'IAV et de la réponse antivirale.	30
Figure 5 : Représentation schématique du cycle de réplication d'un virus Influenza A et les facteurs de restriction associés à chaque étape (adaptée de McKellar et al. 2021).....	33
Figure 6 : Représentation schématique des membres de la famille des protéines à domaine TLDc avec leurs domaines uniques et partagés respectifs.	35
Figure 7 : Les protéines à domaine TLDc ont une fonction neuroprotectrice contre le stress oxydatif.	38
Figure 8 : NCOA7-AS inhibe l'infection par des virus entrant dans leurs cellules cibles par la voie endocytaire.	40
Figure 9 : Impact de NCOA7-AS sur le pH endolysosomal.	41
Figure 10 : Interaction de NCOA7-AS avec des sous-unités de la V-ATPase.....	42
Figure 11 : Les Sorting Nexin sont impliquées dans les voies d'export des endosomes.	45
Figure 12 : Structure des protéines SNX-BAR SNX1, SNX2, SNX5 et SNX6.....	46
Figure 13 : Transports rétrogrades médiés par le rétromère et les SNX des cargos protéiques associés aux endosomes.	48
Figure 14 : Structure cristalline du complexe SNX5:CI-MPR.	49
Figure 15 : Le processus d'autophagie.	51
Figure 16 : Identification des partenaires protéiques cellulaires de NCOA7-AS.	63
Figure 17 : Interaction de SNX1 avec NCOA7-AS et des sous-unités de la V-ATPase.	65
Figure 18 : Impact de l'expression de NCOA7-AS sur la localisation du CI-MPR.	68
Figure 19 : Effet de la déplétion des SNX1/2 et SNX5/6 sur l'activité antivirale de NCOA7-AS.	69
Figure 20 : Effet de la déplétion des SNX1/2 et SNX5/6 par ARNi sur l'acidification des organelles.....	71
Figure 21 : NCOA7-AS favorise l'expression ou la stabilité de Beclin1 en présence de SNX1.	72
Figure 22 : Effet de la déplétion de Beclin1 sur l'activité antivirale de NCOA7-AS.	73

Figure 23 : Effet de la déplétion de SNX5 et SNX6 sur l'autophagie dans des cellules exprimant de façon ectopique Renilla ou NCOA7-AS.....	75
Figure 24 : Effet de la déplétion de Beclin1 sur l'autophagie dans des cellules exprimant de façon ectopique Renilla ou NCOA7-AS.	76
Figure 25 : Effet de la déplétion du complexe PI3K classe III sur l'activité antivirale de NCOA7-AS.	77
Figure 26 : Effet de la déplétion des SNX1/2, SNX5/6, NCOA7-AS et Beclin1 par ARNi sur l'activité antivirale de NCOA7-AS.....	79
Figure 27 : Structure tridimensionnelle de la protéine chimérique Nter-NCOA7-AS/PX-SNX5 obtenue après diffraction aux rayons X.....	81
Figure 28 : Des expériences de GST-pull down montrent une interaction directe médiée par le domaine N-terminal de NCOA7-AS et la Phénylalanine 136 du domaine PX de SNX5. 82	
Figure 29 : Modèle du rôle des SNX et de NCOA7-AS.....	83
Figure 31 : Modèle du fonctionnement de PI3KC3-C1 lors de l'inhibition du complexe PI3K classe III.	88

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des 8 segments du génome viral d'influenza A et leur fonction.

..... 19

Liste des annexes

Annexe 1 : Doyle *et al.*, *Nature Microbiology*, 2018

Annexe 2 : Arnaud-Arnould *et al.*, *Acta-crystallographica Section F*, 2021

Annexe 3 : Rebendenne*, Valadao*, Tauziet* *et al.*, *Journal of Virology*, 2021

Préambule

Je suis arrivée dans l'équipe « Interféron et restriction antivirale » dirigée par Dr. Caroline Goujon en Février 2017 pour réaliser un stage de quatre mois inclus dans mon cursus de licence professionnelle. J'ai travaillé durant cette période avec le doctorant de l'équipe, Boris Bonaventure, ce qui m'a permis de renforcer mes connaissances en biologie moléculaire et cellulaire. A la suite de ce stage, j'ai eu l'opportunité de rester travailler au sein de l'équipe en tant qu'assistante ingénierie pour un mois en Juillet 2017, puis en continu depuis Septembre 2017. J'apportais mon aide technique aux autres membres de l'équipe notamment en biologie moléculaire et cellulaire (clonages moléculaires, culture cellulaire, western blots, production de virus en zone confinée de niveau 3, dosage ELISA) mais également dans la gestion du laboratoire (gestion des stocks et commande de consommables). Puis j'ai eu la possibilité de participer plus activement à un projet de recherche pour lequel un manuscrit était en cours de révision. Il s'agit de l'article de Doyle *et al.* paru dans *Nature Microbiology* en 2018 et que j'ai signé en tant que co-auteur (Annexe 1). Cet article décrit l'activité antivirale de la protéine NCOA7-AS. Pour cette étude, j'ai réalisé l'extraction des ADN génomiques et le séquençage des indels (insertions/délétions) de NCOA7-AS présents dans des clones cellulaires Knock Out (KO) pour IFITM3 qui avaient été obtenus par CRISPR/Cas9 (Supplementary Figure 3. A de l'annexe 1).

Par la suite, j'ai continué à participer à ce projet de recherche en travaillant initialement en binôme avec ma tutrice scientifique, Caroline Goujon, pour la réalisation des expériences. Depuis un peu plus d'un an, je travaille seule sur le projet sous la supervision de Caroline qui m'encadre pour la conception des futures expériences et l'interprétation des résultats (elle réalise également les analyses de microscopie).

Quand j'ai initié mon projet EPHE à l'automne 2018, nous savions que NCOA7-AS, une protéine induite par l'interféron, était capable d'inhiber l'infection par le virus influenza A en bloquant la fusion entre les membranes virales et endosomales. Le laboratoire avait également montré que NCOA7-AS interagit avec la V-ATPase ce qui favorise l'acidification des vésicules cytoplasmiques et l'activité des protéases lysosomales. L'objectif de mon travail de recherche dans le cadre du diplôme EPHE était de décortiquer les mécanismes moléculaires à l'origine de l'effet antiviral de NCOA7-AS. Pour cela, dans un premier temps, nous avons recherché les

partenaires protéiques de NCOA7-AS par spectrométrie de masse et identifié certaines Sorting Nexins (SNX) comme partenaires privilégiés. Nous savions également que NCOA7-AS jouait un rôle dans l'autophagie puisque nous avions observé l'impact de l'expression ectopique de NCOA7-AS sur l'accumulation massive de LC3-II, une protéine utilisée comme marqueur de l'autophagie. Nous avons donc cherché à comprendre si l'autophagie avait un lien avec l'activité antivirale de NCOA7-AS. Ces travaux sont présentés en détails dans ce mémoire. Il est à noter que j'ai réalisé l'ensemble des expériences présentées dans ce mémoire à l'exception des analyses de microscopie et d'images qui ont été réalisées par Caroline Goujon et Joe McKellar (doctorant dans l'équipe), respectivement, et la partie biochimie/cristallographie qui a été réalisée par Mary Arnaud-Arnould en collaboration avec Mickael Blaise (voir ci-dessous).

En parallèle, j'avais également initié un projet ayant pour but d'étudier la structure tridimensionnelle de NCOA7-AS, en collaboration avec Mickael Blaise, structuraliste et DR2 à l'IRIM. Dans ce cadre, j'avais initié la production de NCOA7-AS recombinant. Ce projet a depuis été pris en main par Mary Arnaud-Arnould (PRAG à l'IUT de Montpellier et biochimiste) lors de son arrivée dans l'équipe en Mars 2019. Ce projet a conduit à la résolution de la structure tridimensionnelle du domaine TLDc de la protéine NCOA7-AS humaine et a fait l'objet d'un article récemment publié dans *Acta-Crystallographica Section F*, que je signe en qualité de 2^{ème} auteur (Annexe 2). Plus récemment, Mary et Mickael ont résolu la structure d'un complexe formé entre de la partie amino-terminale de NCOA7-AS et le domaine PX de SNX5 qui vient compléter les résultats de ce mémoire.

Il est important de mentionner que le contexte sanitaire actuel dû à la pandémie de Covid-19 a fortement impacté l'organisation du travail en laboratoire. En effet, au moment du confinement de Mars 2020, l'ensemble de l'équipe a dû arrêter de travailler temporairement sur tous ses projets de recherches. Cependant, comme nous travaillons historiquement sur le virus influenza A, un autre virus respiratoire, Caroline Goujon et Olivier Moncorgé ont mis leur expérience au profit de la lutte contre le Covid-19 en initiant des travaux de recherche sur le SARS-CoV-2 au laboratoire dès Mars 2020. J'ai donc laissé mon projet EPHE sur la protéine antivirale NCOA7-AS complètement de côté pendant plusieurs mois (de Mars à Août 2020) afin d'aider l'équipe sur ces nouveaux projets. Nous avons publié un premier article sur le SARS-CoV-2 dans *Journal of Virology* en Janvier 2021 (Annexe 3) que je signe en qualité de co-

premier auteur. Pour cette étude, j'ai réalisé l'ensemble des clonages moléculaires, des western blots et des marquages intracellulaires suivies d'analyse en cytométrie en flux. Aujourd'hui je continue à participer à ces projets sur le SARS-CoV-2 mais de façon plus ponctuelle en réalisant notamment des western blots et des clonages moléculaires. Nous avons un manuscrit actuellement en cours de révision, qui a été déposé sur bioRxiv (DOI : <https://doi.org/10.1101/2021.05.19.444823>). En parallèle j'ai eu l'occasion de contribuer à un article issu d'une collaboration dans lequel j'ai apporté mon aide technique pour des clonages moléculaires (DOI : 10.15252/embj.2020106540). Enfin, je suis également co-auteur d'un autre manuscrit de l'équipe qui a été déposé sur bioRxiv (DOI : <https://doi.org/10.1101/2020.10.28.359356>) et qui est en cours de finalisation.

Introduction

I) Les virus influenza

1) Découverte et historique

Les virus influenza humains de type A trouvent toujours leurs origines chez les virus circulant chez les espèces aviaires et peuvent être responsables de pandémies extrêmement meurtrières. Ces virus sont à l'origine de maladies dont on retrouve la trace dès l'Antiquité notamment avec la « Peste d'Athènes » au cours de laquelle des dizaines de milliers de personnes sont décédées. Dans ses récits, Hippocrate décrit pour la première fois les symptômes de la grippe humaine en évoquant des maux de gorge, des courbatures et des difficultés à avaler et respirer (Martin et Martin-Granel 2006). Il a été difficile dans un premier temps d'associer ces symptômes spécifiquement au virus de la grippe puisqu'ils étaient également associés à d'autres maladies épidémiques comme la peste bubonique, la diphtérie ou la fièvre typhoïde. Des pandémies se sont succédées au cours des siècles à intervalles réguliers en Europe touchant à la fois l'Homme, les oiseaux et les volailles (Taubenberger et Morens 2010). La pandémie de grippe de 1918-1919, appelée « la grippe espagnole » est à ce jour la plus dévastatrice avec environ 50 millions de morts. Contrairement à son nom, l'Espagne n'est pas à l'origine de « la grippe espagnole ». Ce nom lui a été attribué car l'Espagne (non impliquée dans la Première Guerre mondiale) fut le seul pays à publier librement les informations relatives à cette épidémie. D'autres pandémies se sont ensuite produites : en 1957 « la grippe asiatique », en 1968 « la grippe de Hong Kong » causant respectivement 2 millions et 1 millions de morts. Plus récemment, une nouvelle pandémie de grippe a débuté en Avril 2009 (la grippe porcine) devenant la première pandémie de grippe du 21^{ème} siècle (Martin et Martin-Granel 2006).

La grippe aviaire a été décrite pour la première fois à la fin du 19^{ème} siècle en Italie du Nord. Nommée dans un premier temps « peste aviaire » car confondue avec une forme de choléra aviaire, la maladie est renommée « *Typhus exudatious gallinarum* » (Martin et Martin-Granel 2006). C'est en 1901 que Centanni et Savunzzi ont découvert qu'un virus était à l'origine de la maladie puisqu'il était capable de passer à travers un filtre de Chamberland. Ce filtre possède des pores inférieurs à 300 nm qui ne permettent pas aux bactéries de passer à travers. Mais ce n'est qu'en 1955 que le virus de la « peste » aviaire a été identifié comme étant un virus

influenza (Lupiani et Reddy 2009). Le premier virus influenza a été isolé à partir d'un porc en 1931 (Shope 1931). Deux ans plus tard, le premier virus influenza humain a été isolé. En 1936, Burnet expérimente la titration de virus influenza dans des œufs de poulets embryonnés et constate l'aptitude du virus à tuer l'embryon en développement. Burnet prouve ainsi que ce modèle peut être utilisé pour la propagation des virus influenza (Burnet 1936).

2) Classification

Les virus influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*, caractérisée par un génome ARN segmenté simple brin de polarité négative. Les 4 premiers genres de la famille des *Orthomyxoviridae* sont les virus influenza A, B, C et D contenant chacun une seule espèce virale (Bouvier et Palese 2008). Il existe également les genres Isavirus et Thogotovirus qui infectent respectivement les saumons, les moustiques ou les parasites de poissons (Pringle 1996). Les virus influenza A (IAV) sont divisés en sous-types en fonction du type antigénique des deux glycoprotéines de surface : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA) (voir le paragraphe suivant pour plus d'informations). Il existe 18 types d'hémagglutinines (si l'on prend en compte les virus influenza-like de chauve-souris) et 11 types de neuraminidases identifiées (Wu *et al.* 2014). Les gènes codant HA et NA des virus influenza A ont une séquence protéique très variable et moins de 30% des acides aminés sont conservés parmi tous les sous-types.

La structure et l'organisation du génome des virus influenza A, B, C et D laissent à penser qu'ils partagent un ancêtre commun différent des autres virus à ARN de polarité négative (Webster *et al.* 1992). Le génome des virus influenza A et B est constitué de 8 segments tandis que les virus influenza C et D ne possèdent que 7 segments. Les virus influenza A et B possèdent des caractéristiques communes en comparaison aux virus influenza C et D suggérant une dérive génétique avant la division des types A et B. Les virus influenza A sont capables d'infecter un très large panel de mammifères tel que les oiseaux sauvages et domestiques, l'Homme, les chevaux et les porcs (Figure 1). Au contraire, les virus de genre B et C circulent uniquement chez l'Homme. Les virus influenza D, connus pour infecter les porcs et les bœufs, étaient initialement considérés comme un sous-type des virus influenza C avant d'en être dissociés en 2016 (Su *et al.* 2017).

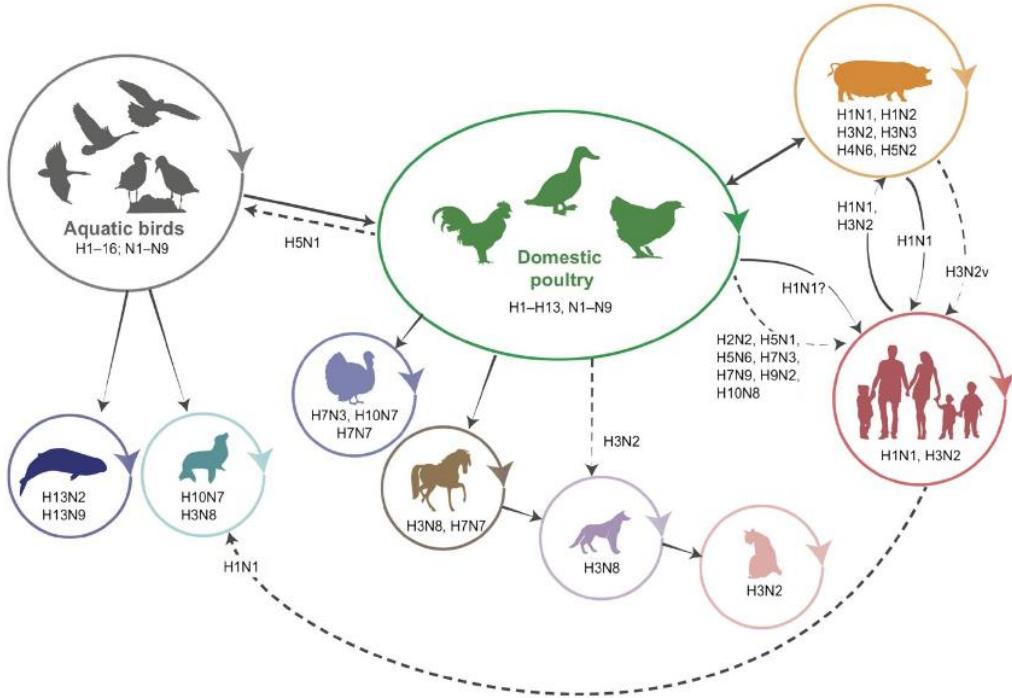


Figure 1 : Représentation schématique de la transmission inter-espèces des virus influenza A.
Les flèches pleines représentent les évènements de transmission directe qui ont été établis dans l'espèce hôte. Les flèches en pointillés représentent une infection sporadique ou limitée de sous-type où la transmission dans le nouvel hôte n'a pas été détectée (Joseph *et al.* 2017).

3) Organisation du génome

Les 8 segments d'influenza A permettent l'expression de 14 protéines (Tableau 1).

Tableau 1 : Segments du génome viral d'influenza A et leurs protéines codées.

Segment viral	Protéine codée	Fonction
1	PB2 (polymérase basique 1)	Se lie à la coiffe de l'ARNm, fait partie du complexe polymérase
2	PB1 (polymérase basique 2)	ARN polymérase ARN-dépendante, fait partie du complexe polymérase
	PB1-F2 PB1-N40	Facteur de virulence Interaction avec le complexe polymérase
3	PA (polymérase acide)	Endonucléase, contrôle de la transcription et la réplication du génome viral
	PA-X	Régulateur de la pathogénicité
4	HA (hémagglutinin)	Liaison avec les acides sialiques à la surface de la cellules

5	NP (nucléoprotéine)	Nécessaire à la transcription et réPLICATION, se lie à l'ARN viral
6	NA (neuraminidase)	Clive les acides sialiques pour permettre l'export des virions
7	M1 (protéine de matrice 1) M2 (protéine de matrice 1)	Protéine de structure Canaux ioniques
8	NS1 (protéine non-structurale 1) NS2/NEP (protéine non-structurale 1/protéine d'export nucléaire)	Antagoniste d'interféron Export nucléaire des vRNP

4) Structure des virus influenza A

Les particules virales d'influenza A peuvent être de forme sphérique ou de forme filamenteuse. Ces deux types de morphologies sont facilement observables en microscopie électronique à transmission et peuvent atteindre une taille de 100 nm de diamètre pour les formes sphériques jusqu'à 300 nm pour les formes filamenteuses. L'enveloppe virale est une bicouche lipidique provenant de la membrane des cellules hôtes, dans laquelle sont enchâssées 3 protéines : HA, NA et M2. HA est un homotrimère qui participe à la liaison avec le récepteur des cellules cibles et permet la fusion des membranes virale et endosomale. NA est un homotétramère qui assure l'hydrolyse des acides sialiques présent sur diverses glycoprotéines permettant ainsi la libération des virions nouvellement formés. M2 est un homotétramère présent en plus petite quantité à la surface de l'enveloppe virale. Sous l'enveloppe se trouve une couche de protéine M1 qui tapisse sa surface pour former une capsidé et qui interagit avec les complexes de ribonucléoprotéines (RNP) (Figure 2).

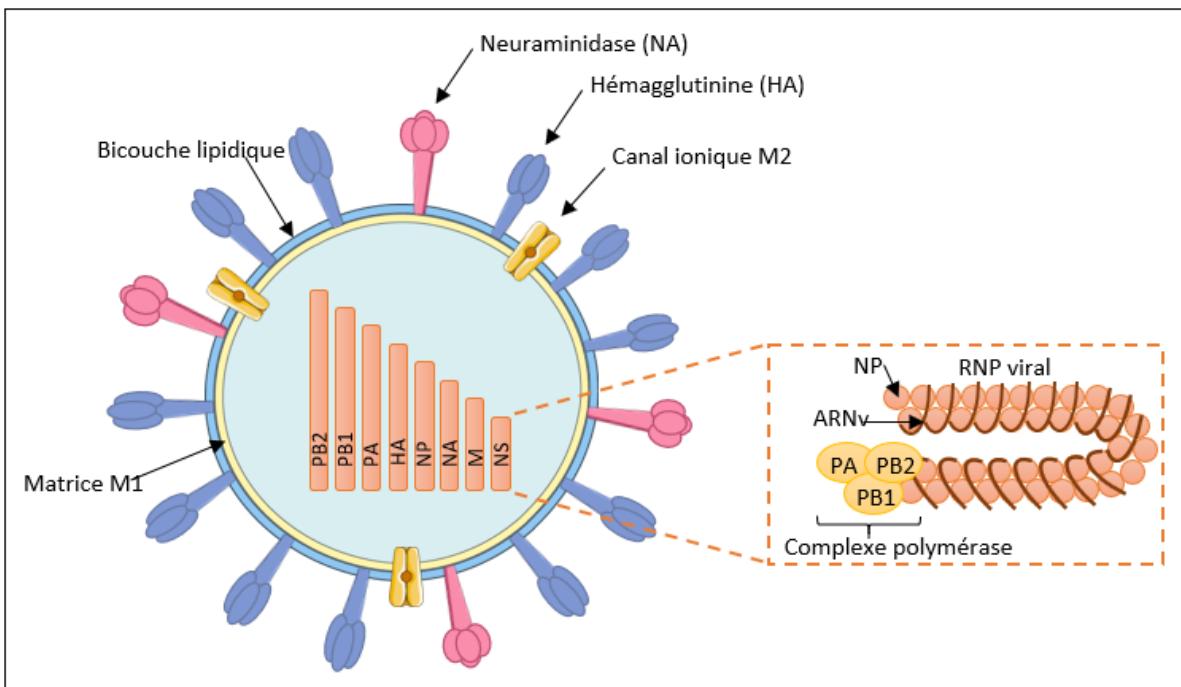


Figure 2 : Représentation schématique d'une particule virale du virus Influenza A.

Les protéines HA, NA et M2 sont enchaînées dans l'enveloppe. L'enveloppe est tapissée d'une couche de protéine M1 qui entoure les 8 segments de RNP. Chaque RNP est constitué d'un brin d'ARN négatif qui entoure les protéines NP et lié au complexe polymérase (PB1, PB et PA).

L'ARN est associé à 4 protéines virales pour former les complexes de ribonucléoprotéines virales (vRNP). Les vRNP sont composés de nucléoprotéines (NP) qui sont recouvertes de l'ARNv enroulé autour formant un brin qui se replie sur lui-même pour former une structure en « tête d'épingle » (Figure 2). Chaque vRNP contient aussi l'ARN polymérase ARN-dépendante constituée de 3 sous-unités : l'acide polymérase (PA) et les polymérasées basiques 1 et 2 (PB1 et PB2) (Figure 2). La polymérase est capable à la fois de produire de l'ARN complémentaire de polarité positive (ARNc (+)) qui servira de matrice à la synthèse de nouveaux ARNv et de transcrire les ARNv en ARN messagers destinés à la traduction de nouvelles protéines virales.

Il existe également deux protéines dites non-structurales : la protéine non-structurale 1 (NS1) et la protéine non-structurale 2/protéine d'export nucléaire (NS2/NEP). NS1 est présente en faible quantité dans les virions, sa principale fonction est d'inhiber la production d'interféron après néosynthèse de la protéine (Krug 2015). NS2/NEP contient une séquence signal d'export

nucléaire (NES) qui permet aux vRNP d'être exportés du noyau afin de former de nouvelles particules virales (R. E. O'Neill, Talon, et Palese 1998).

4) Cycle de réPLICATION virale

Lorsqu'un virus infecte un nouvel hôte mammifère, il doit dans un premier temps franchir les barrières constituées par du mucus sécrété par les cellules des voies respiratoires avant d'atteindre les tissus cibles dans lesquels il pourra se répliquer. Le virus va ensuite s'attacher à la cellule cible grâce à ses glycoprotéines virales HA qui se fixent aux acides sialiques présents sur la surface de la cellule (Gottschalk 1959). Cette fixation permet au virus de rentrer dans la cellule par un mécanisme d'endocytose médié par la voie des clathrines, de façon indépendante des clathrines (Matlin *et al.* 1981; Rust *et al.* 2004), ou par macropinocytose (Rossman et Lamb 2011).

L'acidification de l'endosome induit la fusion des membranes virale et endosomale (Stegmann, White, et Helenius 1990). Cette fusion est provoquée par le changement de conformation de la protéine HA à la surface du virion, exposant le peptide de fusion (Skehel et Wiley 2000). En parallèle l'acidification endosomale initie l'ouverture des canaux ioniques M2 qui permettent de diminuer le pH à l'intérieur de la particule virale ce qui entraîne la déstructuration de la capsid et ainsi la libération des vRNP (Helenius 1992) (Figure 3).

Les vRNP sont ensuite acheminés jusqu'au noyau de la cellule hôte. Les protéines NP possèdent un signal de localisation nucléaire (NLS) qui interagit avec les importines cellulaires. L'importine- α se lie directement au NLS tandis que l'importine- β induit la translocation des complexes de RNP à travers les pores nucléaires (Cros, García-Sastre, et Palese 2005; R. E. O'Neill *et al.* 1995).

Une fois dans le noyau, le génome viral va être soumis à des mécanismes de transcription et de réPLICATION. Les ARNv de polarité négative sont transcrits en ARNm par le complexe polymérase en utilisant un mécanisme de vol de coiffe d'ARNm cellulaires (ou *cap snatching*) (Scholtissek et Rott 1970). La protéine PB2 se lie à la coiffe d'un ARN cellulaire pré-messager puis la protéine PA clive cet ARN pour initier la transcription de l'ARN viral (Dias *et al.* 2009). La protéine PB1 est impliquée dans l'élongation de la chaîne d'ARN (Braam, Ulmanen, et Krug 1983). Les ARNm viraux sont ensuite exportés vers le cytoplasme pour être traduits en

protéines, dont certaines (PB1, PB2, PA, NP et NEP) seront réimportées dans le noyau. En parallèle, la polymérase virale synthétise l'ARNc qui servira de matrice pour la production de nouveaux ARNv (Beaton et Krug 1986). Ces ARNv seront impliqués dans la formation des nouvelles vRNP qui constitueront le génome viral. Les vRNP nouvellement formés sont exportés du noyau vers le cytoplasme grâce aux protéines M, NEP et CRM1 et poursuivent leur trajet jusqu'à la membrane cellulaire via le cytosquelette d'actine (Cros et Palese 2003).

Pour former les nouveaux virions infectieux, les protéines M1 vont s'associer à la membrane plasmique afin de former la nouvelle capsid. Ces protéines jouent un rôle clé dans l'assemblage des virions puisqu'elles entraînent le recrutement des vRNP sur le site d'assemblage (Schmitt et Lamb 2005). Pour que le virion ait la capacité de se répliquer, il doit incorporer un seul exemplaire de chaque segment génomique (Duhaut et Dimmock 2002). Les protéines HA, NA et M2 sont également recrutées à la membrane. Les nouveaux virions sont libérés dans le milieu extracellulaire grâce à M2 qui est impliquée dans la scission de la membrane cellulaire et à l'action de NA qui clive les liaisons entre les protéines HA à la surface des virions et des acides sialiques cellulaires (Rossman et Lamb 2011).

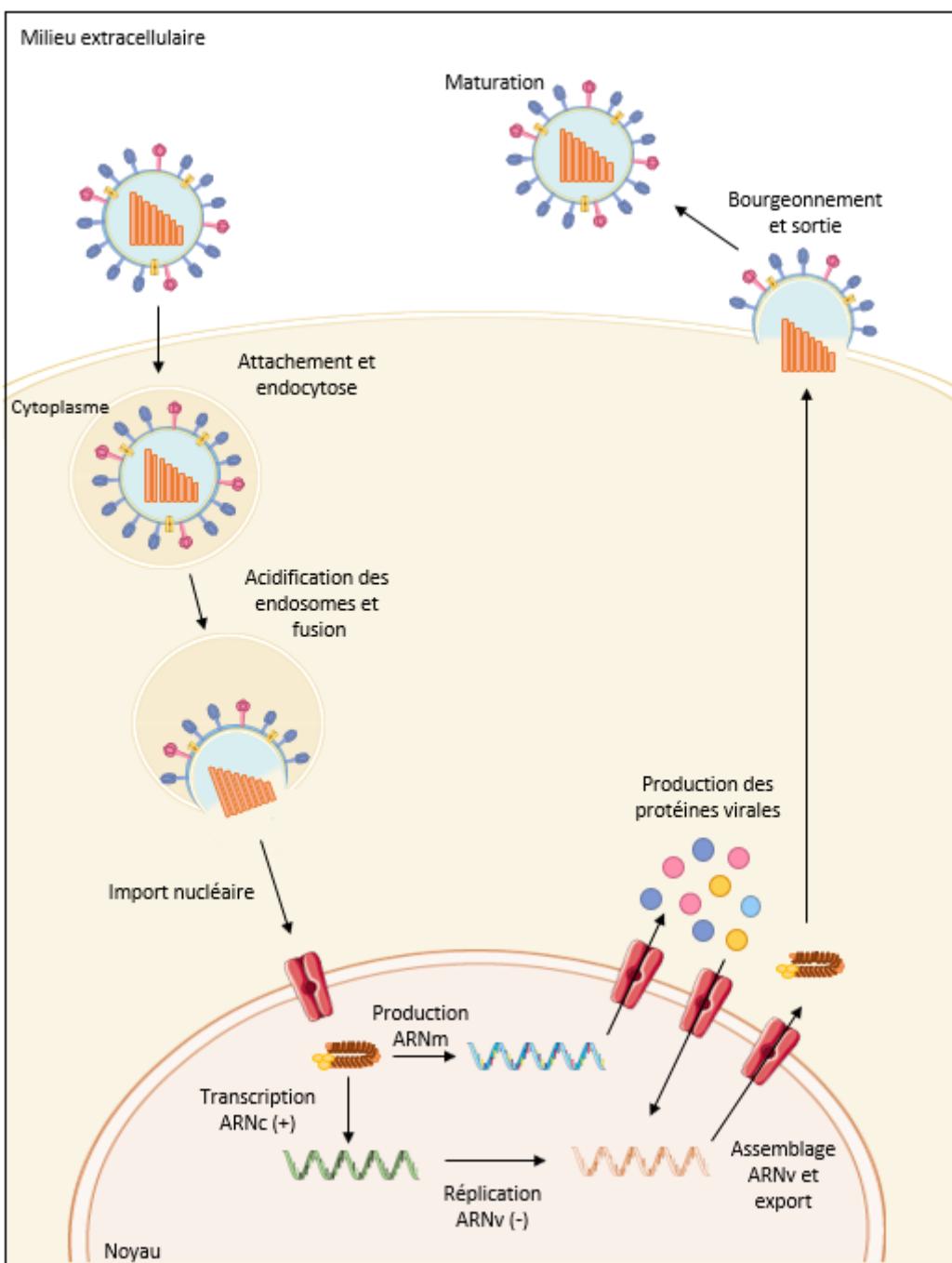


Figure 3 : Représentation schématique du cycle de réPLICATION d'un virus Influenza A.

IAV entre dans la cellule cible par endocytose. L'acidification des endosomes conduit d'une part à la fusion des membranes endosomale et virale et d'autre part à la décapsidation, ce qui permet la libération des vRNP dans le cytoplasme. Les vRNP sont ensuite importées vers le noyau. Le génome viral est alors soumis à des mécanismes de réPLICATION, de transcription et de traduction des protéines virales qui sont exportées. Les vRNP nouvellement formées vont être exportées vers le cytoplasme où elles s'assemblent avec des protéines virales. Les nouveaux virions vont bourgeonner à la membrane plasmique avant d'être libérés dans le milieu extracellulaire.

5) Réservoirs et transmissions des virus influenza A

5.1) Les oiseaux sauvages

Les oiseaux aquatiques sauvages constituent le réservoir naturel des virus influenza A. Ces virus ont atteint un niveau optimal d'adaptation chez ces oiseaux puisqu'ils induisent une infection asymptomatique (Webster *et al.* 1992; Alexander 2000). La réPLICATION du virus s'effectue dans le tractus intestinal où la température atteint 41°C. Les virus sont ensuite excrétés en forte concentration dans les fèces (Webster *et al.* 1978). La transmission s'effectue par voie oro-fécale et les virus peuvent rester de longues périodes dans les étendues d'eau douce favorisant ainsi la dissémination par les oiseaux migrateurs. Ces étendues d'eau douces constituent des lieux d'échanges importants de virus de différents sous-types entre des espèces issus de régions très éloignées. La plupart des sous-types viraux connus (H1 à H16 et N1 à N9) sont représentés dans la population des oiseaux aquatiques sauvages, en particulier chez les canards, les oiseaux de rivage et les goélands (Fouchier *et al.* 2005). Cette grande variabilité génétique des virus influenza favorise des événements de franchissement de barrière d'espèces.

5.2) Transmission aux volailles domestiques

Les virus influenza aviaires qui circulent massivement dans la faune sauvage sont capables d'infecter les volailles domestiques. La proximité des élevages en plein air avec la faune sauvage, comme les oiseaux migrateurs, favorise la contamination des volailles domestiques. Si un élevage est contaminé, le virus peut rapidement se transmettre aux élevages à proximité. Cette transmission rapide constitue une menace permanente pour les élevages et les industries avicoles. Les virus influenza qui infectent les volailles domestiques sont classés en deux catégories selon leur niveau de pathogénicité, hautement ou faiblement pathogènes. Les virus influenza aviaires hautement pathogènes (IAHP) entraînent des signes cliniques graves et peuvent être à l'origine d'une mortalité élevée. Ils existent uniquement parmi les sous-types H5 et H7 mais ceux-ci ne sont pas tous hautement pathogènes (Horimoto et Kawaoka 2005). Les IAHP peuvent causer jusqu'à 100% de mortalité chez les volailles 36 à 48h post-infection (Spackman 2008). La protéine HA joue un rôle majeur dans la pathogénicité des virus grippaux. En effet, la séquence du site de clivage protéolytique dans la protéine HA

détermine si l'infection sera systémique (hautement pathogène) ou non (faiblement pathogène) (Rott 1992).

6) Mécanismes d'évolution génétique

L'évolution des virus influenza A et le franchissement des barrières d'espèces sont causés par deux mécanismes majeurs : l'accumulation de mutations ponctuelles dans le génome viral (le glissement antigénique ou antigenic drift) ou le réassortiment de segments viraux dans une cellule infectée par deux souches grippales différentes (la cassure antigénique ou antigenic shift).

6.1) Le glissement antigénique

Le mécanisme de glissement antigénique (ou « antigenic drift ») est dû au caractère peu fidèle de l'ARN polymérase ARN dépendante. Cette polymérase ne possède pas la capacité de relecture et de correction ce qui entraîne des erreurs dans les copies génétiques produites et facilite ainsi les mutations. Le taux de mutation pour la grippe de type A est estimé à une mutation ponctuelle tous les $1,5 \times 10^5$ nucléotides (Buonagurio *et al.* 1986). La modification des séquences génétiques peut avoir un impact important au niveau de la réponse immunitaire. En effet, les glycoprotéines de surfaces HA et NA qui sont les principaux antigènes des IAV peuvent acquérir des mutations spécifiques conduisant au contournement de la surveillance immunitaire (Drake 1993). Les mutations ponctuelles peuvent aussi être à l'origine du changement de pathogénicité d'un virus. Les hémagglutinines de types H5 et H7 sont les plus susceptibles à accumuler des mutations et donc à faire évoluer un virus faiblement pathogène en un virus hautement pathogène (Monne *et al.* 2014).

6.2) La cassure antigénique

Le mécanisme de cassure antigénique (ou « antigenic shift ») correspond à un remaniement génétique beaucoup plus important que les mutations ponctuelles. Ces remaniements génétiques portent sur l'échange de segments géniques entre deux virus différents infectant une même cellule pour aboutir à l'apparition de nouveaux virus dits « réassortants ». Si ces échanges concernent les gènes de l'hémagglutinine et/ou de la neuraminidase chez les virus influenza A, alors ce processus peut aboutir à l'apparition de nouveaux sous-types à l'intérieur

du genre A. Les réassortiments peuvent avoir lieu chez diverses espèces telle que le porc qui a la particularité de posséder des récepteurs aux virus aviaires et aux virus mammifères. Ces réassortants peuvent posséder des caractéristiques différentes comme une virulence accrue, une spécificité d'hôte différente et/ou une absence de réponse immunitaire de l'hôte. Ce mécanisme de cassure antigénique peut alors être à l'origine de pandémies, comme c'était le cas avec le réassortant H2N2 en 1957, H3N2 en 1968 et H1N1 en 2009.

7) Vaccins et traitements

Le moyen le plus efficace d'empêcher l'entrée du virus est « d'intercepter » le virus avec des anticorps neutralisants avant qu'il n'atteigne les cellules cibles. Les premiers vaccins contre le virus de la grippe ont donc été développés au cours des années 1930. Encore aujourd'hui, la vaccination reste le moyen le plus efficace pour prévenir et contrôler l'infection virale. Le vaccin saisonnier est composé d'antigènes des virus influenza A et B circulant. En effet comme le virus de la grippe subit une dérive génétique, les protéines de surface HA et NA sont très variables et changent donc chaque année. La composition du vaccin saisonnier est donc établie chaque année en fonction des antigènes de surface présents chez les virus circulants ou prédis comme circulant de façon dominante durant l'année suivante.

A l'heure actuelle, il n'existe que quatre molécules approuvées dans le traitement de la grippe en Europe. L'amantadine et la rimantadine sont des inhibiteurs des canaux ioniques M2 qui bloquent l'acidification des virus entrants empêchant ainsi la libération des vRNPs (Pinto et Lamb 1995). L'oseltamivir (Tamiflu) et le zanamivir (Relenza) sont capables de bloquer la libération des virions nouvellement synthétisés de la cellule infectée en ciblant l'activité de la neuraminidase des virus influenza A et B (Gubareva, Kaiser, et Hayden 2000). Plus récemment, en 2018, l'autorisation de mise sur le marché d'une nouvelle molécule a été annoncée au Japon et aux Etats-Unis. Le Xofluza (baloxavir marboxil), devient ainsi la première molécule anti-grippe possédant un nouveau mécanisme approuvé depuis presque 20 ans aux Etats-Unis. La molécule cible la sous-unité PA de la polymérase virale. Cependant, l'apparition de virus devenus résistants au baloxavir a été détectée dès les premiers essais cliniques (Omoto *et al.* 2018).

II) Interaction immunité innée et IAV

1) Détection du virus influenza A

L'immunité innée est une des premières lignes de défense vis-à-vis des agents infectieux. L'immunité innée est induite suite à l'interaction des récepteurs du soi, appelés Pattern Recognition Receptors (PRR), qui reconnaissent les Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP) (Amarante-Mendes *et al.* 2018). Les PAMP peuvent être présents dans les agents pathogènes ou générés lors de l'infection. Ils correspondent par exemple à des structures d'acides nucléiques spécifiques du génome viral ou à des intermédiaires de la réPLICATION virale tels que l'ARN double brin (ARNdb) (Figure 4).

1.1) Les récepteurs Toll-Like (TLR)

La première classe de PRR à avoir été identifiée sont les récepteurs Toll-Like (TLR) qui comprennent 10 membres (TLR 1-10) parmi lesquels TLR3, 7 et 8 qui sont capables de reconnaître l'ARN viral (L. A. J. O'Neill, Golenbock, et Bowie 2013). Le TLR3 est notamment exprimé par les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques (DCs) ou les macrophages. Le TLR3 est majoritairement retrouvé au niveau des endosomes et est capable de détecter et de lier l'ARNdb (L. Liu *et al.* 2008). Le TLR7 est exprimé par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) tandis que le TLR8 est présent dans les monocytes, macrophages et DCs. Les TLR7 et TLR8 reconnaissent l'ARN simple brin (ARNs_b) viral localisé dans les endosomes (Diebold *et al.* 2004). La liaison de l'ARN par les TLRs conduit à leur activation et à l'induction de voies de signalisation via des protéines adaptatrices : Myeloid Differentiation Primary Response 88 (Myd88) et TIR-domain-containing adaptateur-inducing interferon-β (TRIF) respectivement pour les TLR7/8 et TLR3 (Vyncke *et al.* 2016; Yamamoto *et al.* 2003). L'activation des Interferon Regulatory Factor 3 et 7 (IRF3 et IRF7), des facteurs de transcription de la famille AP-1 et de la voie NF-κB, conduit à l'expression d'interferon de type I et III (IFN I et III) et de cytokines pro-inflammatoires (Figure 4).

1.2) La protéine inductible à l'acide rétinoïque : RIG-I

Une autre famille importante de PRR comprend la protéine inductible à l'acide rétinoïque (RIG-I) qui est exprimée dans le cytoplasme de tous les types cellulaires. RIG-I est considéré comme le principal détecteur des virus influenza A (G. Liu *et al.* 2018). RIG-I reconnaît spécifiquement les courtes séquences d'ARNdb (10 à 19 paires de bases pb) associées à un di ou tri-phosphate en position 5' (Schlee *et al.* 2009). La liaison avec l'ARNdb induit l'ubiquitylation et l'activation de RIG-I. Cette activation entraîne la translocation de RIG-I vers la protéine Mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) (Helene Minyi Liu *et al.* 2012). MAVS est localisée sur la membrane externe des mitochondries. L'interaction de RIG-I et MAVS provoque l'oligomérisation de MAVS menant à l'activation de la voie NF-κB, IRF3 et IRF7 et à l'expression d'interferon de type I et III (IFNs I et III) et de cytokines pro-inflammatoires (Figure 4) (L. Liu *et al.* 2008).

2) La voie de transduction des interférons

Les IFNs de types I et III sont sécrétés dans le milieu extracellulaire et agissent de manière autocrine et paracrine. Les IFN de types I (α , β , ϵ , κ et ω) vont se lier sur leur récepteur constitué de deux sous-unités (IFNAR1) et (IFNAR2) qui est exprimé de façon constitutive à la surface des cellules (Lazear, Schoggins, et Diamond 2019). Les IFNs de types III (λ) se lient sur leur récepteur spécifique composé de IFN- λ receptor 1 (IFNLR1) et Interleukin 10 receptor 2 (IL10R2) exprimé principalement à la surface des cellules épithéliales, des cellules du foie et des cellules myéloïdes. La fixation des IFNs à leur récepteur va entraîner leur changement de conformation et l'activation des protéines Janus Kinase (JAK1 et TYK2). Les JAK induisent la phosphorylation des protéines Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) qui sont des protéines cytosoliques libres. La phosphorylation des STAT mène à la formation du dimère STAT1/STAT2 qui s'associe avec la protéine accessoire Interferon Regulatory Factor 9 (IRF9). Ce complexe, nommé ISGF3, relocalise dans le noyau où il se fixe sur la séquence consensus nommée Interferon-Stimulated Response Element (ISRE) et entraîne l'expression des Interferon-Stimulated Genes (ISGs) (Schoggins et Rice 2011; Schneider, Chevillotte, et Rice 2014) (Figure 4).

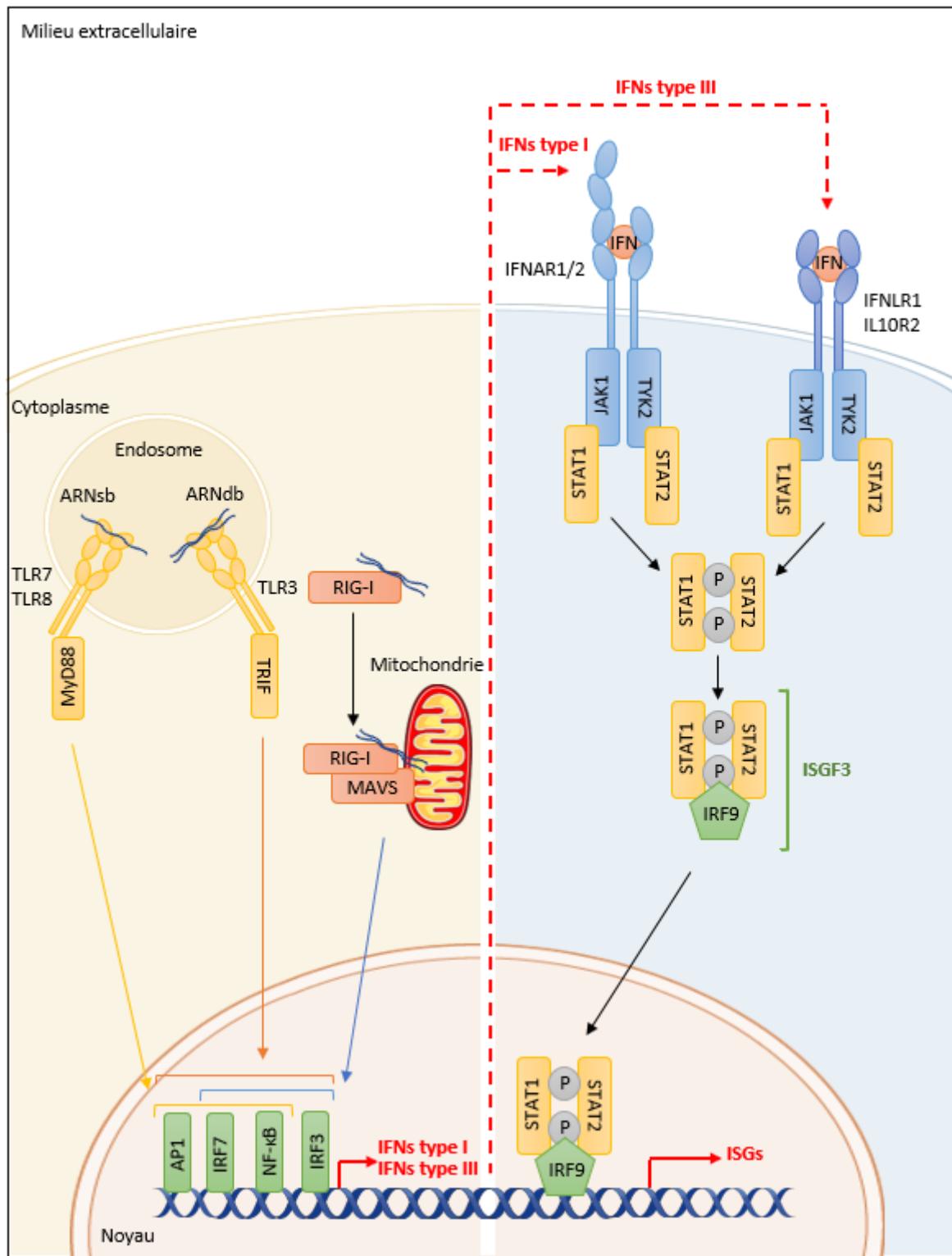


Figure 4 : Représentation schématique de la détection d'IAV et de la réponse antivirale.

Les TLRs, RIG-I et MAVS sont capables de reconnaître l'ARN viral sb ou db localisé dans les endosomes. Leur reconnaissance va induire une cascade de signalisation et l'activation de facteurs de transcription entraînant la production d'IFN de type I et III. L'IFN va se lier à son récepteur spécifique et va entraîner l'activation de la voie JAK/STAT, aboutissant à la transcription et l'expression d'ISGs via la voie de signalisation JAK/STAT.

3) Les facteurs de restrictions

Le produit de certaines protéines possède des propriétés antivirales qui participent à l'établissement d'un état dit antiviral dans les cellules infectées avoisinantes. Ces ISGs sont appelés facteurs de restriction. Ils peuvent être exprimés de manière constitutive à différents niveaux dans certains types cellulaires et ces niveaux peuvent être modulés par l'IFN suite à l'infection par un virus. Les facteurs de restriction se présentent sous de nombreuses formes mais ont pour effet commun d'inhiber la réplication virale. Ces protéines peuvent agir à différents stades du cycle viral : l'entrée, la réplication ou la sortie du virus.

3.1) Les facteurs de restriction qui inhibent l'entrée virale

Les membres de la famille des Interferon-Induced Transmembrane proteins (IFITMs) font partie des facteurs de restrictions cellulaires les plus étudiés qui agissent contre les virus influenza. Chez l'Homme, les IFITMs sont composés de cinq gènes *Ifitm1*, *Ifitm2*, *Ifitm3*, *Ifitm5* et *Ifitm10* mais il existe deux gènes supplémentaires chez la souris : *Ifitm6* et *Ifitm7*. Des études sur les protéines transmembranaires IFITM1, 2 et 3 ont démontré qu'elles exercent une activité antivirale sur un large panel de virus dont les virus influenza (McKellar *et al.* 2021) (Brass *et al.* 2010). IFITM1 est principalement localisée au niveau de la membrane plasmique alors que IFITM2 et IFITM3 sont situées dans les endosomes tardifs et les lysosomes (Diamond et Farzan 2013). IFITM3 est capable de bloquer la fusion des pores de fusion après l'étape d'hémifusion entre les membranes virale et endosomale (Desai *et al.* 2014). IFITM3 est également impliqué dans la protection de l'infection d'IAV sur des modèles *in vivo* (Bailey *et al.* 2012).

Il existe d'autres facteurs de restriction décrits dans la littérature tels que Zinc-metallopeptidase STE24 (ZMPSTE24), Cholesterol-25-hydrolase (CH25H), β -1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (B4GALNT2) et Mucine-1 (MUC1) (Fu *et al.* 2017; Zhao *et al.* 2020; Heaton *et al.* 2017; Meerzaman, Shapiro, et Kim 2001).

L'isoforme courte de la protéine Nuclear Receptor Coactivator 7 (NCOA7-Alternative Start NCOA7-AS), objet de ce mémoire, peut être classée comme facteur de restriction inhibant l'entrée du virus influenza A et sera décrite dans la section III de cette introduction.

3.2) Les facteurs de restriction qui inhibent la réPLICATION du génOME viral

Les protéines Myxovirus resistance (Mx) appartiennent à la super famille des GTPases apparentées aux dynamines. MX1 humain (ou MxA) dont la localisation est cytoplasmique est connue pour sa capacité à inhiber l'infection par IAV ainsi qu'un large éventail de virus tandis que MX2 (ou MxB), principalement localisée au niveau de l'enveloppe nucléaire, inhibe le VIH-1 et d'autres lentivirus infectant les primates (McKellar *et al.* 2021; Haller et Kochs 2010)

Il existe d'autres facteurs de restriction qui inhibent la réPLICATION du génOME viral décrits dans la littérature tels que les protéines TRIM, GBP, ZAP, IFITs, OAS, PKR et MOV10 (McKellar *et al.* 2021) (Figure 5).

3.3) Les facteurs de restriction qui affectent l'assemblage viral, la sortie ou la maturation

Bone marrow stromal antigen 2 (BST-2) , aussi nommée Tetherin, est une protéine induite par l'IFN impliquée dans l'inhibition de la libération d'IAV et d'autres virus à la surface des cellules infectées (Mahauad-Fernandez et Okeoma 2016) (Figure 5).

Virus inhibitory protein, endoplasmic reticulum-associated, IFN-inducible (Viperin) est capable d'inhiber la réPLICATION de divers virus par différents mécanismes. Dans le cas d'influenza, Viperin agit au niveau de la phase tardive du cycle de réPLICATION virale.

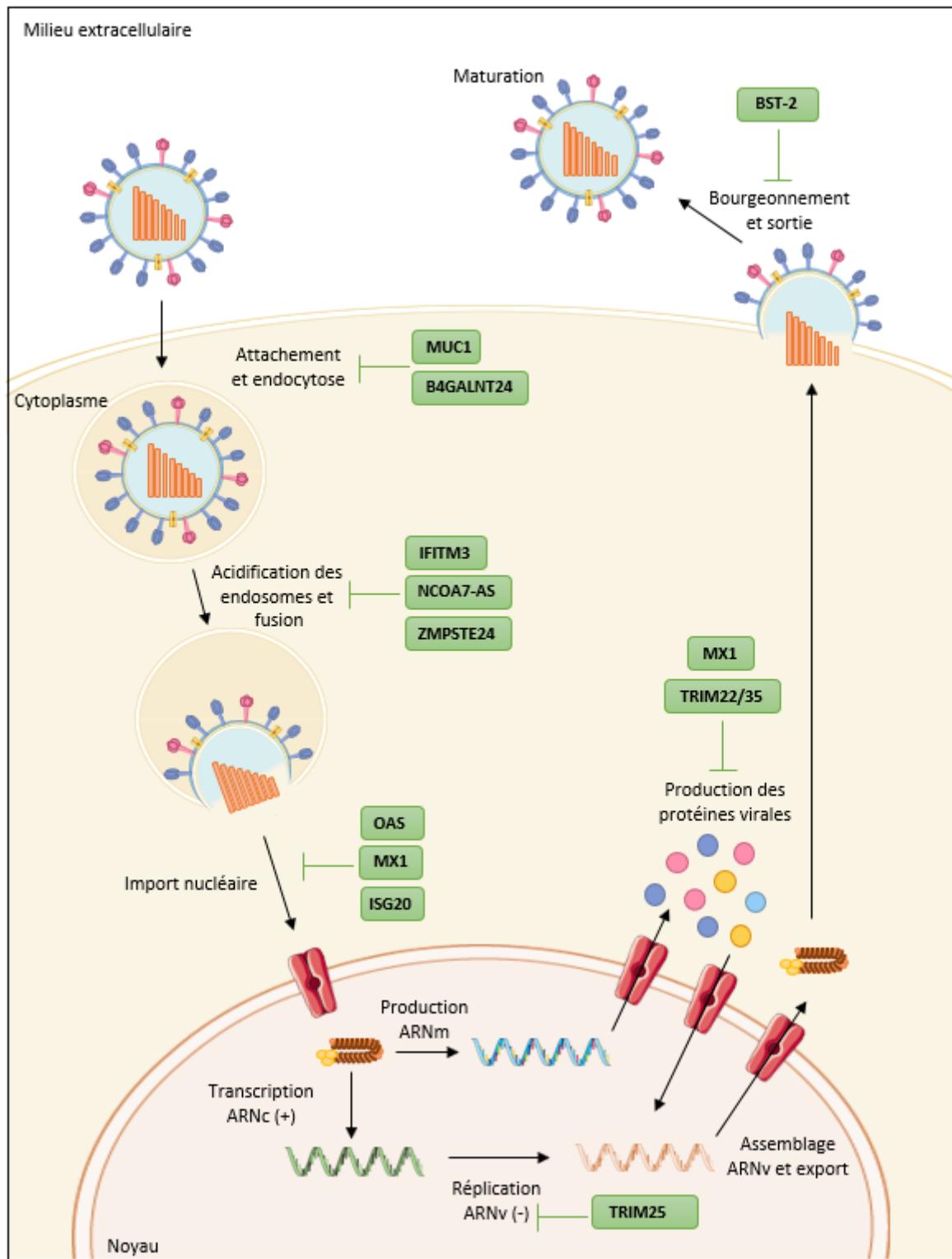


Figure 5 : Représentation schématique du cycle de réPLICATION d'un virus Influenza A et les facteurs de restriction associés à chaque étape (adaptée de McKellar *et al.* 2021).

III) La protéine antivirale NCOA7

1) Les protéines à domaine TLDC

NCOA7 appartient à la famille des protéines à domaine TLDC (Tre2/Bub2/Cdc16 (TBC), Lysin motif (LysM), domain catalytic). La famille des protéines à domaine TLDC a été identifiée pour la première fois lors d'une analyse informatique des séquences de protéines contenant des domaines nucléaires connus parmi 27 autres familles de protéines (Doerks *et al.* 2002). Des protéines à domaine TLDC sont retrouvées chez tous les eucaryotes et la séquence primaire de ce domaine est relativement conservée parmi les espèces. C'est un motif protéique d'environ 200 acides aminés majoritairement globulaire. La famille des protéines à domaine TLDC est composée de 7 protéines retrouvées à la fois chez l'Homme et la souris : TBC1D24, KIAA1609 (aussi nommée TLDC1), C20ORF118 (ou TLDC2), la longue isoforme OXR1-Full-Lenth (FL) et la courte isoforme ORX1-C, la longue et la courte isoforme NCOA7-FL et NCOA7-Alternative Start (NCOA7-AS) (Finelli *et al.* 2016) (Figure 6). La structure cristalline a été déterminée à partir de la protéine à domaine TLDC Oxidation resistance protéine 2 (OXR2) du poisson zèbre (Blaise *et al.* 2012).

La famille des OXR1 est la première classe de protéines à domaine TLDC à avoir été caractérisée. Les protéines OXR humaines possèdent des propriétés de protection contre les dommages oxydatifs causés par les Reactive oxygen species (ROS) (Volkert, Elliott, et Housman 2000). Cette fonction anti-oxydante est codée par l'exon 8 chez OXR1 humain (Murphy et Volkert 2012). L'activité des protéines OXR est induite par la chaleur et le stress oxydatif. Ces protéines sont localisées dans les mitochondries afin de protéger les cellules. Il a été démontré que cette localisation mitochondriale est essentielle afin de protéger efficacement les cellules de tout dommage oxydatif (Elliott et Volkert 2004). Des études réalisées *in vivo* et *in vitro* ont permis de montrer que l'expression de OXR1 était fondamentale pour la survie des neurones et que OXR1 était surexprimée chez des patients atteints de maladies neurodégénératives (Oliver *et al.* 2011). Il a également été montré que le domaine conservé TLDC seul pouvait suffire à la fonctionnalité de la protection contre les dommages oxydatifs. Toutes les protéines de la famille à domaine TLDC possèdent donc des propriétés de résistance au stress oxydatif (Oliver *et al.* 2011; Finelli *et al.* 2016).

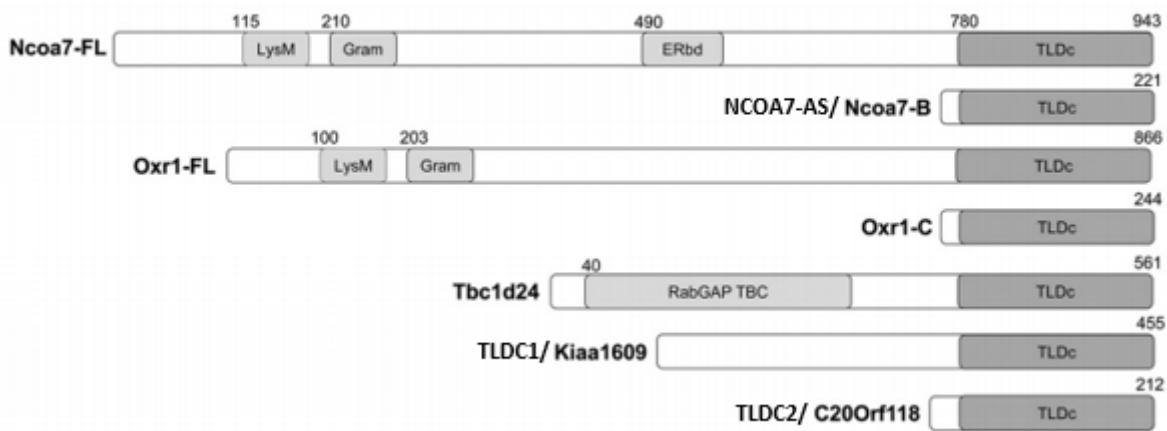


Figure 6 : Représentation schématique des membres de la famille des protéines à domaine TLDc avec leurs domaines uniques et partagés respectifs.

LysM : motif lysine ; Gram : domaine GRAM; ERbd : domaine de liaison au récepteur à l'estrogène. Les nombres indiquent la position des acides aminés chez les protéines de souris (adapté de Finelli *et al.* 2016).

2) Les différentes isoformes de NCOA7

2.1) NCOA7-FL

Comme mentionné plus haut, il existe deux isoformes de NCOA7. NCOA7-FL initialement nommée Estrogen Receptor-Associated Protein 140 (ERAP140), a été identifiée et caractérisée comme un nouveau coactivateur de récepteur nucléaire (Shao, Halachmi, et Brown 2002). ERAP140 a été isolée dans un criblage de protéines interagissant avec le récepteur à l'œstrogènes (ER) en utilisant le domaine de liaison du ligand ER comme sonde (Shao, Halachmi, et Brown 2002). NCOA7-FL est fortement exprimée dans le cerveau et plus spécifiquement au niveau des noyaux des cellules neurales. Le gène *NCOA7-FL* est constitué de 15 exons dont l'exon numéro 7 codant pour le domaine de liaison à l'ER (ERbd) et les exons 11 à 15 codant pour le domaine TLDc. La protéine NCOA7-FL comporte 942 acides aminés correspondant à une masse moléculaire de 140 kDa. NCOA7-FL fonctionne comme un coactivateur nucléaire qui est recruté dans le noyau lorsque l'œstrogène se lie à son récepteur. Le complexe NCOA7-ER (Récepteur aux œstrogènes) si lie ensuite aux promoteurs des gènes régulés par les œstrogènes modulant leur activité transcriptionnelle (Shao, Halachmi, et Brown 2002).

NCOA7-FL possède également des propriétés contre le stress oxydatif (Durand *et al.* 2007; Finelli *et al.* 2016). NCOA7-FL et OXR1-FL semblent être issus d'un gène ancestral commun puisqu'ils partagent 38% d'identité et 53% de similarité au niveau protéique. Cependant, les protéines codées par ces gènes ne sont pas localisées au même endroit dans la cellule, NCOA7-FL est localisée principalement dans le noyau et ORX1-FL au niveau des mitochondries, suggérant que ces deux protéines ont des rôles différents. De plus NCOA7-FL est exprimée de façon constitutive dans les cellules et n'est pas induit par un stress oxydatif contrairement à OXR1-FL (Durand *et al.* 2007).

2.2) NCOA7-AS

NCOA7-AS est une isoforme courte qui a la particularité d'être induite par l'IFN et les lipopolysaccharides (LPS) de macrophages (Yu *et al.* 2015). Cette isoforme a été initialement identifiée suite à une étude de multi-exons microarrays menée pour examiner les gènes induits suite à un traitement IFN (Croze *et al.* 2013). L'IFN- β est capable d'induire l'expression de NCOA7-AS dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) obtenues à partir d'individus sains et de patients atteints de scléroses en plaques et dans divers types cellulaires neurales. L'induction de NCOA7-AS par l'IFN est dépendante de l'activation des récepteurs à l'IFN et de la voie de signalisation JAK-STAT (Yu *et al.* 2015). NCOA7-AS est constituée des cinq derniers exons de la longue isoforme NCOA7-FL (exons 11 à 15) avec l'exon 10a qui code pour les 25 acides aminés en position N-terminale. La courte isoforme ne possède notamment pas l'exon numéro 7 qui code l'ERbd de la longue isoforme ce qui suggère fortement que les deux isoformes possèdent des propriétés et fonctions distinctes.

3) Mécanismes d'action de NCOA7-AS

3.1) Résistance au stress oxydatif

Tout comme NCOA7-FL, NCOA7-AS n'est pas induite en réponse au stress oxydatif, cependant elle semble posséder des propriétés antioxydantes (Yu *et al.* 2015). Or l'exon numéro 9 n'est pas présent dans NCOA7-AS ce qui laisse à penser que l'exon 10a pourrait coder pour l'activité antioxydante. En effet, l'exon 10a code un domaine homologue avec la famille des aldo-céto oxydo-réductases bactériennes qui sont connues pour protéger les cellules des produits de peroxydation lipidique et réduire les niveaux cellulaires de ROS (Jin et Penning. 2007).

Néanmoins il n'existe pas d'homologie entre les exons 9 et 10a ce qui suggère que les deux isoformes possèdent une activité en réponse au stress oxydatif initiée par des mécanismes biochimiques différents.

Parmi toutes les protéines à domaine TLDc, NCOA7-AS pourrait être la plus neuroprotectrice (Finelli *et al.* 2016). En effet, dans un système artificiel des cellules neurales N2a transfectées avec des plasmides codant pour les protéines à domaine TLDc puis soumises à un stress oxydatif (150 µM d'arsenite pendant 4h), toutes les protéines TLDc réduisent la proportion de cellules mortes de moitié par rapport au contrôle (vecteur vide), tandis que NCOA7-AS réduit la mort cellulaire de près de 85% (Figure 7. A) (Finelli *et al.* 2016). Afin de comprendre comment la fonction neuroprotectrice des protéines TLDc pourrait être portée par le domaine TLDc, les six acides aminés les plus conservés de ce domaine ont été substitués par des alanines chez NCOA7-AS de souris. Trois des mutants (G93A, G174A et E216A) agissent sur la fonction neuroprotectrice puisque la proportion de cellules mortes augmente de près de 40% dans les cellules NCOA7-AS mutées pour les trois acides aminés en comparaison aux cellules NCOA7-AS-WT (Figure 7. B) (Finelli *et al.* 2016). Les conséquences de la mutation de ces trois acides aminés ont été prédits en utilisant la structure tri-dimensionnelle du domaine TLDc de ORX2 du poisson zèbre (Blaise *et al.* 2012). La glycine en position 93 serait nécessaire pour maintenir la position des hélices- α 3 et 4. Cela suggère que l'intégrité des hélices peut être importante pour la fonction du domaine TLDc. L'acide glutamique en position 216 est l'un des acides aminés les plus conservés dans le domaine TLDc. Les prédictions suggèrent qu'une liaison hydrogène entre le groupement carboxylate de Glu-216 et le groupement amide Ser-60 maintient la position de la région N-terminale du domaine TLDc (Finelli *et al.* 2016) (Figure 7. C).

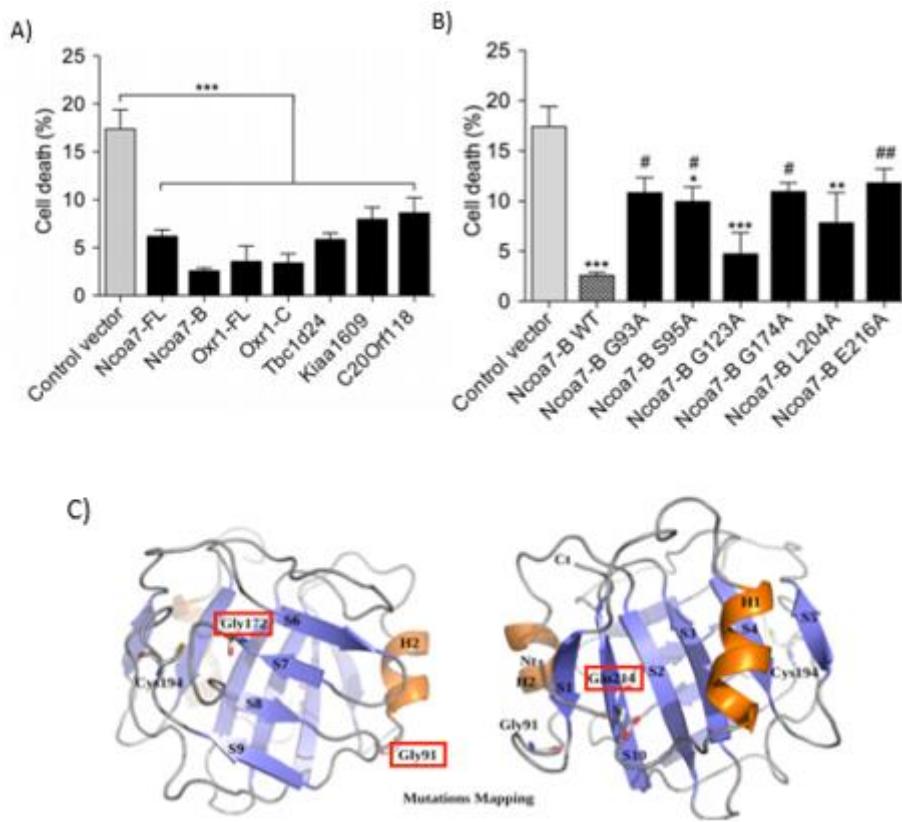


Figure 7 : Les protéines à domaine TLDc ont une fonction neuroprotectrice contre le stress oxydatif. Des cellules N2a ont été transfectées avec des plasmides codants pour les protéines à domaine TLDc **A)** ou pour NCOA7-AS (NCOA7-B sur la figure) dont les six acides aminés les plus conservés ont été mutés par des alanines (Finelli *et al.* 2016). **B)** Les cellules ont été traitées avec 150 µM d'arsenite pendant 4h. Les cellules mortes ont été quantifiées en comptabilisant le nombre de noyaux pycnotiques (Finelli *et al.* 2016). **C)** Modélisation de la structure du domaine TLDc de la protéine NCOA7-AS humaine réalisée à partir de la structure du domaine TLDc de OXR2 de poisson zèbre (PDB4ACJ ; modélisation réalisée par Dr M. Blaise).

3.2) Activité antivirale

Afin d'identifier les ISG jouant un rôle dans l'état antiviral contre le VIH-1, le Dr. Caroline Goujon a développé dans le passé une approche de transcriptomique comparative entre différents types cellulaires, devenant réfractaires ou bien restant permisifs à l'infection virale suite à un traitement par de l'IFN (Goujon et Malim 2010). Cette approche a permis d'établir une liste de gènes candidats potentiellement responsables de la restriction de l'infection du Virus de l'Immunodéficience Humain (VIH) induite par l'IFN. Parmi ces candidats, *MX2* (un homologue de *MX1*) a été identifié comme un des principaux ISG participant à l'inhibition du VIH induite par l'IFN (Goujon *et al.*, 2013). De façon intéressante, Caroline Goujon a montré

que les mêmes types cellulaires étaient capables de restreindre le VIH-1 et IAV suite à un traitement IFN, montrant que l'analyse transcriptomique pouvait permettre d'identifier des ISG inhibant IAV. La poursuite de l'analyse des ISG candidats ainsi identifiés a conduit à l'identification d'une autre protéine induite par l'IFN ayant une activité antivirale notable par mon équipe hôte, en étroite collaboration avec l'ancienne équipe de ma responsable, le groupe du Prof. Michael H. Malim (King's College London). Il s'agit de l'isoforme courte NCOA7-AS dont l'expression ectopique inhibe l'infection par certains virus entrant dans la cellule par endocytose tel qu'IAV (Doyle *et al.* 2018). En effet, l'effet antiviral de NCOA7-AS est dépendant du mode d'entrée du virus. La protéine n'a aucun effet sur des virus entrant dans la cellule par fusion à la membrane plasmique tel que le VIH (Figure 8. B) par contre un phénotype antiviral est présent si des virus sont pseudotypés avec des enveloppes permettant l'entrée dans la cellule par endocytose tel que l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV-G) (Figure 8. A), ce qui laissait supposer que NCOA7-AS était capable de bloquer l'entrée par voie endocytaire des virus.

Afin de savoir à quelle étape du cycle viral d'IAV NCOA7-AS inhibe l'infection, des approches combinant imagerie couplée à la cytométrie en flux (ImageStream) et de microscopie classique ont été utilisées. L'étape d'acidification d'HA n'est pas impactée par NCOA7-AS, par contre la mesure de la fusion entre membranes virales et endosomales révèle une diminution des événements de fusion en présence de NCOA7-AS. NCOA7-AS inhibe la fusion des membranes virales et endosomales limitant l'accès des complexes viraux au cytoplasme des cellules cibles (Doyle *et al.* 2018).

De façon notable, NCOA7-AS possède une forte activité antivirale sur IAV puisque son expression ectopique dans des cellules d'adénocarcinome pulmonaire est capable de réduire de 80% le pourcentage de cellules infectées par rapport au contrôle (Figure 8. C) (Doyle *et al.* 2018a). Inversement, l'invalidation de NCOA7-AS par CRISPR/Cas9 (Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9) permet de restaurer partiellement l'infection par IAV dans le contexte de l'état antiviral induit par l'IFN. Le lien potentiel entre les activités antivirales de NCOA7-AS et d'IFITM3, qui agissent à la même étape, a été exploré. Pour cela, des expériences de déplétion d'IFITM3 seul et en combinaison avec NCOA7-AS ont été réalisées et indiquent que les effets antiviraux de NCOA7-AS et IFITM3 sont cumulatifs et semblent donc indépendants. De plus, des expériences sur des lignées

clonales KO ont révélé que l'inhibition de l'infection médiée par l'expression ectopique de NCOA7-AS n'est pas affectée par le KO d'IFITM3 et vice versa (Doyle *et al.* 2018).

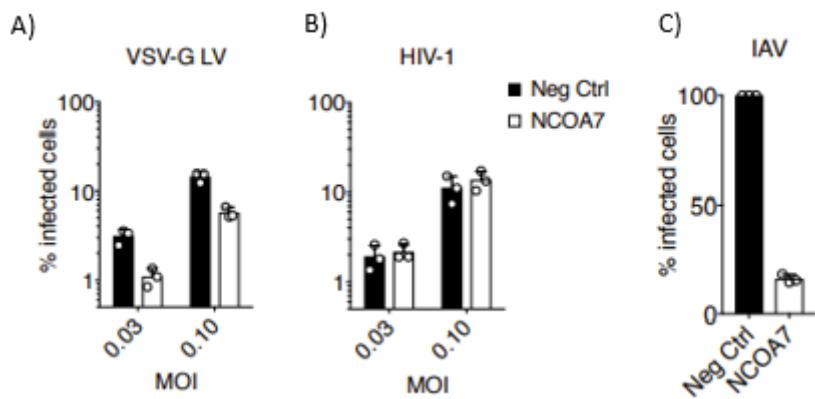


Figure 8 : NCOA7-AS inhibe l'infection par des virus entrant dans leurs cellules cibles par la voie endocytaire.

Des cellules U87MG CD4+ CXCR4+ ont été transduites avec un vecteur lentival exprimant NCOA7 ou un contrôle. Les cellules ont été challengées avec **A)** du virus HIV-1-GFP pseudotypé VSV-G (VSV-G LV) ou **B)** du virus HIV-1 WT. Le pourcentage de cellules GFP positives a été déterminé par cytométrie en flux. **C)** Des cellules A549 exprimant NCOA7-AS ou un contrôle ont été infectées avec IAV, fixées 5h post-infection puis marquées avec un anticorps anti-nucléoprotéines avant d'être visualisées au microscope confocal (Doyle *et al.* 2018).

3.3) Impact de NCOA7-AS sur le pH endolysosomal

Comme NCOA7-AS inhibe l'étape de fusion des membranes virales et endosomales, NCOA7-AS pourrait avoir un impact sur l'acidification endolysosomale. Cette hypothèse est renforcée par le fait que NCOA7-AS a été identifiée comme un partenaire protéique de la V-ATPase (cette interaction sera détaillée dans le paragraphe suivant).

Afin d'étudier cette hypothèse mon laboratoire d'accueil et nos collaborateurs ont réalisé des expériences en utilisant différents systèmes de sondes fluorescentes. L'effet de NCOA7-AS sur l'acidification des vésicules cytoplasmiques a été analysé et les résultats montrent que la présence de NCOA7-AS favorise l'acidification vésiculaire, sans doute par le biais d'une interaction régulatrice de la V-ATPase (Figure 9) (Doyle et al, 2018). Afin d'examiner les effets de NCOA7-AS sur l'activation lysosomale dépendante de la V-ATPase, l'activité de dégradation de trois protéases a été quantifiée. Les résultats obtenus montrent que l'expression ectopique de NCOA7-AS augmente substantiellement l'activité dégradative des protéases (Doyle et al, 2018).

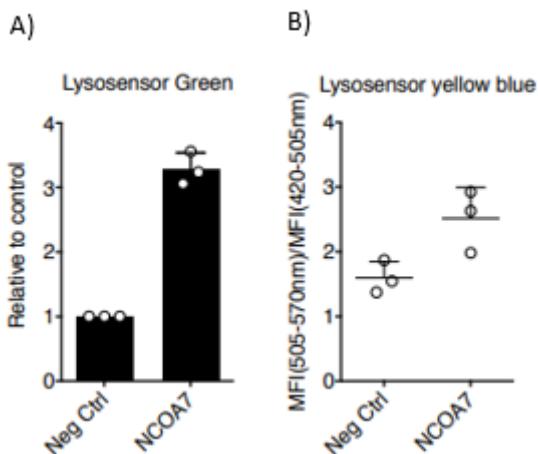


Figure 9 : Impact de NCOA7-AS sur le pH endolysosomal.

A) Des cellules A549 ont été transduites avec des vecteurs exprimant soit CD8 (contrôle) soit NCOA7-AS. Les cellules ont été ensemencées et traitées avec 0,1 µL de LysoSensore Green DND-189 pendant 1h ou **B)** avec 10 µM de LysoSensore Yellow/Blue DND-160 pendant 1h. Le nombre de puncta fluorescents a été déterminé par cytométrie en flux (Doyle *et al.* 2018).

3.4) Interaction avec la V-ATPase

Comme mentionné précédemment, NCOA7-FL a été identifié comme un partenaire protéique d'une sous-unité de l'ATPase vacuolaire (ou V-ATPase), ATP6V1B1 dans une analyse en spectrométrie de masse (Merkulova *et al.*, 2015). La V-ATPase est une pompe à proton qui régule l'homéostasie du pH chez les Eucaryotes. Elle utilise l'ATP qui acidifie les compartiments intracellulaires ce qui permet de transporter les protons à travers la membrane plasmique. La V-ATPase est impliquée dans des processus biologiques cellulaires clés comme le trafic des vésicules, le sensing du pH endosomal, la fusion membranaire et la signalisation intracellulaire. La V-ATPase est composée de sous-unités multiples formant le domaine cytoplasmique V1 et le domaine transmembranaire V0 (Figure 10. A). L'hydrolyse de l'ATP dans le domaine V1 entraîne le mouvement d'un complexe rotatif central qui, à son tour, entraîne la translocation des protons à travers le domaine V0 (Forgac *et al.*, 2007).

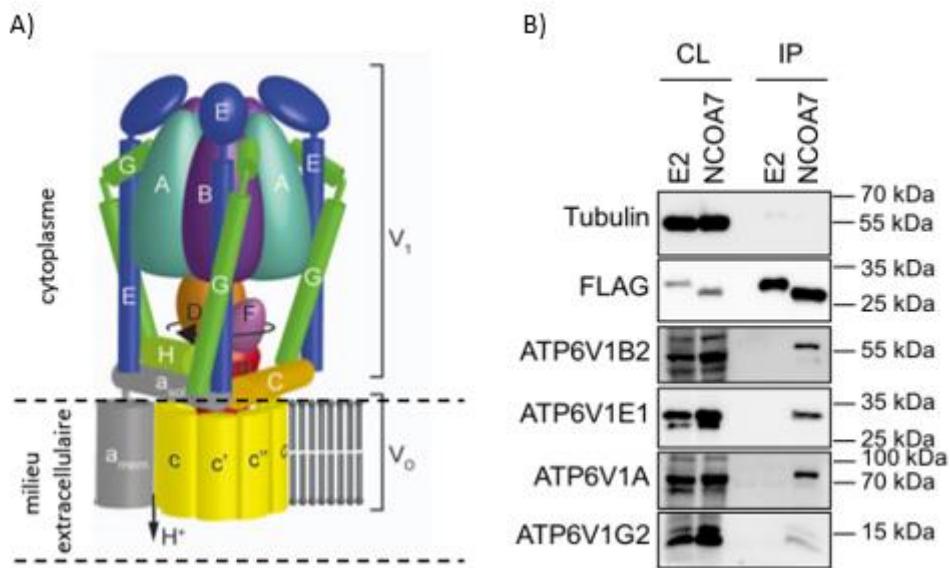


Figure 10 : Interaction de NCOA7-AS avec des sous-unités de la V-ATPase.

A) Représentation schématique de la V-ATPase. La V-ATPase est composée de plusieurs sous-unités formant le domaine cytoplasmique V₁ et d'un domaine transmembranaire V₀ (adapté de Stewart *et al.* 2013). **B)** Des cellules U87-MG ont été transduites avec des vecteurs exprimant soit E2-Crimson (contrôle) soit NCOA7-AS (NCOA7 sur la figure) marqué avec une étiquette Flag. Les cellules ont été lysées puis les protéines ont été immunoprécipitées et analysées par western blot. CL : lysat cellulaire, IP : immunoprécipitats (Doyle *et al.*, 2018).

NCOA7-FL étant connu pour interagir avec ATP6V1B1, une sous-unité de la V-ATPase spécifique du rein et une interaction de NCOA7-AS avec la V-ATPase pouvait permettre d'expliquer le phénotype observé de diminution du pH endolysosomal et de l'étape de fusion, mon équipe a donc exploré la possibilité que NCOA7-AS puisse aussi interagir avec la V-ATPase. Des expériences d'immunoprécipitation (IP) de NCOA7-AS étiqueté avec Flag (Flag-NCOA7-AS) ont en effet mis en évidence des interactions avec plusieurs sous-unités de la V-ATPase : ATP6V1B2, ATP6V1E1, ATP6V1A et ATP6V1G2. Cela suggère potentiellement que NCOA7-AS puisse moduler le pH endolysosomal via des interactions avec la V-ATPase mais le mécanisme moléculaire reste à être défini (Figure 10. B) (Doyle *et al.*, 2018).

Par ailleurs, une étude récente a confirmé que NCOA7-FL interagit également avec des sous-unités du domaine cytoplasmique V₁ de la V-ATPase et qu'elle modulerait son assemblage et fonctionnement (Castroflorio *et al.* 2021). Des souris dépourvues de l'intégralité du locus *Ncoa7* présentent une altération de l'assemblage de la V-ATPase dans les neurones, ainsi que

des anomalies lysosomales qui impactent le développement neuronal et le comportement des souris (Castroflorio *et al.* 2021).

Afin de mieux appréhender la compréhension des résultats du mémoire, la prochaine section de l'introduction est centrée sur les caractéristiques des protéines Sorting Nexins (SNX).

IV) Caractéristiques et fonctions des protéines Sorting Nexins (SNX)

1) Les SNX

Le tri des macromolécules au sein du système endosomal est nécessaire au contrôle physiologique de l'homéostasie des nutriments, de la motilité cellulaire et de la protéostase. Les voies de trafic qui exportent les macromolécules des endosomes via des vésicules ou des domaines tubulaires constituent le recyclage de la membrane plasmique et le transport rétrograde endosome – Trans-Golgi network (TGN). Les protéines de la famille des Sorting Nexins sont notamment impliquées au niveau des endosomes, dans les mécanismes de transport rétrograde de cargos spécifiques.

SNX1 est le premier membre de la famille des SNX à avoir été identifié. SNX1 a été isolée à partir d'un criblage de levure conçu pour identifier les protéines se liant au récepteur du facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor receptor EGFR) (Kurten, Cadena, et Gill 1996). La séquence de SNX1 de mammifère est homologue à celle d'une protéine de levure appelée VPS5p. VPS5p est une sous-unité d'un grand complexe multimérique, appelé rétromère, impliqué dans le transport rétrograde des protéines des endosomes vers le TGN (Horazdovsky *et al.* 1997). D'autres SNX présentes chez les mammifères ont été identifiées au fil des années jusqu'à atteindre actuellement le nombre de 33 (SNX1-SNX33) (Carol Renfrew Haft *et al.* 1998; Otsuki *et al.* 1999; R. D. Teasdale *et al.* 2001). Toutes les SNX sont composées d'un domaine Phox (Phox homology domain : PX) qui se lie au phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns(3)P ou PI3P) présent dans les membranes endosomales.

Il existe plusieurs sous-catégories dans la famille des SNX. La sous-famille «PX-only» est composée de protéines qui possèdent seulement un domaine PX (Rohan D. Teasdale et Collins 2012). La sous-famille SNX-FERM (band4.1/ezrin/radixin/moesin) regroupe les protéines SNX17, SNX27 et SNX31. Le domaine FERM est un module d'interaction protéique qui se lie aux protéines contenant la séquence Asn-Pro-X-Tyr (NPxY) qui fonctionne comme un signal de

tri dans certaines protéines membranaires. Une dernière sous-famille, celle qui nous intéresse en particulier, est définie par la présence d'un module dimérique : le domaine Bin-Amphiphysin-Rvs (BAR) qui est chargé positivement et qui permet la détection et/ou l'induction de courbure de membrane. Cela entraîne la formation des domaines tubulaires au niveau des endosomes (Peter *et al.* 2004).

2) Les voies d'export des endosomes

Les protéines et les lipides qui constituent les organites du système endosomal sont dérivés principalement de l'internalisation de portions de membrane plasmique via de multiples voies endocytaires. Les vésicules endocytaires primaires peuvent subir une fusion homotypique, une fusion entre deux organites de même composition, afin de générer un endosome dit « précoce » (early endosome en anglais) caractérisé par la présence de tubules, d'une haute concentration en GTPase Rab5 et d'un pH modérément acide (pH~6,5). L'endosome précoce mature ensuite en endosome tardif (late endosome en anglais) grâce à l'acidification graduelle du compartiment vacuolaire (pH~5,5) riche en GTPase Rab7. L'acidification se fait principalement grâce à la V-ATPase. Alors que les cargos sont triés dans les domaines tubulaires pour l'export à la membrane plasmique, les solutés et les vésicules intraluminales sont retenus dans le domaine vacuolaire de l'endosome qui fusionne avec un lysosome afin de dégrader son contenu via la voie de dégradation lysosomale. Les SNX agissent à différentes étapes de la maturation des endosomes et empruntent des voies d'export diverses (Figure 11). SNX4, SNX17, SNX27 et SNX31 agissent au niveau des endosomes précoces. SNX27 permet le transport des cargos vers la membrane plasmique tandis que SNX4, SNX27 et SNX31 jouent le rôle de transporteur vers la voie du recyclage des endosomes. Les SNX-BARs 1/2/5/6/8 et la SNX PX-only SNX3 interviennent au niveau des endosomes tardifs dans le transport rétrograde de cargos des endosomes au TGN. Les SNX-BARs induisent des domaines tubulaires alors que SNX3 favorise le transport des cargos via des vésicules (Chi, Harrison, et Burd 2015; van Weering, Verkade, et Cullen 2010).

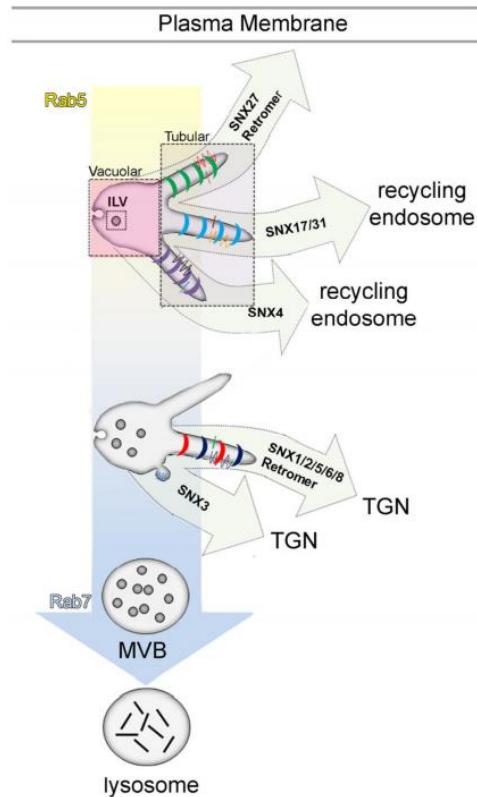


Figure 11 : Les Sorting Nexin sont impliquées dans les voies d'export des endosomes.

Les endosomes précoce riches en protéines Rab5 matures grâce à l'acidification graduelle du compartiment vacuolaire pour former des endosomes tardifs riches en protéines Rab7. Les SNX agissent à différents stades de la maturation des endosomes et empruntent diverses voies d'export. SNX4, SNX17, SNX27 et SNX31 agissent au niveau des endosomes précoce en jouant le rôle de transporteur vers la voie de recyclage des endosomes tandis que SNX27 transporte les cargos vers la membrane plasmique. Les SNX-BARs 1/2/5/6/8 et la SNX PX-only SNX3 interviennent au niveau des endosomes tardifs dans le transport rétrograde de cargos des endosomes au TGN (Chi et al, 2015).

3) La sous-famille des SNX-BAR

Les SNX-BAR représentent la plus grande sous-famille des SNX de mammifère avec 12 membres : SNX1, SNX2, SNX4, SNX5, SNX6, SNX7, SNX8, SNX9, SNX18, SNX30, SNX32, SNX33. Les SNX-BARs sont principalement composées du domaine BAR et du domaine PX qui jouent un rôle essentiel dans la régulation des évènements de tri via l'induction de domaine tubulaire au sein du réseau endosomal (Figure 12. A). La structure cristalline du domaine BAR a été résolue pour une SNX-BAR de *Drosophila* (van Weering, Verkade, et Cullen 2010). Il s'agit d'un dimère en forme de croissant qui se lie préférentiellement aux membranes courbées chargées négativement. Avec son hélice amphipathique en N-terminal et son domaine BAR (N-BAR), l'amphiphysine peut entraîner la courbure des membranes *in vitro* et *in vivo* (Peter et al.

2004). Le domaine PX présente une structure de quatre hélices α et de trois feuillets β repliés dans une forme de « gant de baseball » qui lie les phosphoinositides (Bravo *et al.* 2001). La structure cristalline de SNX9 a révélé que le domaine PX est situé sur le côté latéral du dimère BAR grâce à un linker flexible et que la poche de liaison aux phosphoinositides est dans la même orientation que le côté concave du domaine BAR (Pylypenko *et al.* 2007; van Weering, Verkade, et Cullen 2010). Les SNX-BAR peuvent exercer leur rôle dans l'export de cargos grâce au domaine PX qui se lie au PI3P présent dans les membranes (Figure 12. B). Le PI3P est produit par l'activation de la phosphoinositide 3-kinase de classe III (PI3K) également appelée VPS34, elle-même régulée par les protéines Beclin1 et Rab5. La génération de PI3P permet ensuite le recrutement des protéines Rab7A et des SNX (Williams, Chen, et Moore 2017).

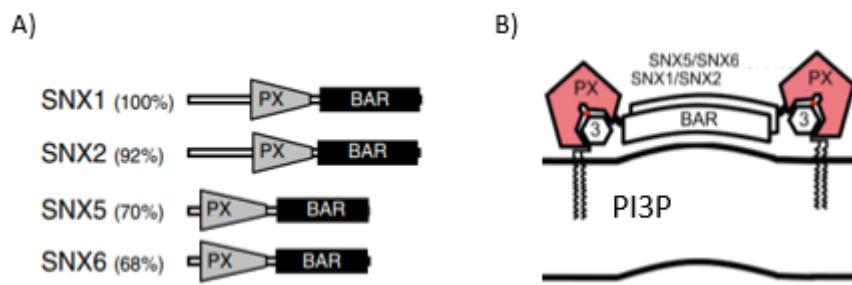


Figure 12 : Structure des protéines SNX-BAR SNX1, SNX2, SNX5 et SNX6.

A) Séquences codantes des SNX1, SNX2, SNX5 et SNX6. Le pourcentage de similitude entre le domaine PX de SNX1 et les autres SNX a été obtenu en calculant le pourcentage de résidus conservés, semi-conservés ou identiques (Carlton *et al.* 2005). **B)** Interaction entre les SNX et la membrane endosome. Les deux domaines BAR interagissent entre eux afin d'induire les courbures de membranes et la domaine PX si lie au PI3P présent dans la membrane endosome (adapté de Cullen and Korswagen. 2011).

4) Le rôle des SNX-BAR dans l'export des endosomes

4.1) Le rétromère

Les SNX1 et SNX2 sont homologues au gène de levure *VPS5* qui code une sous-unité d'un grand complexe multimérique, appelé rétromère, impliqué dans le transport rétrograde des protéines des endosomes vers le TGN. Le rétromère a dans un premier temps été décrit chez les levures. Il est composé de deux sous-complexes : un sous-complexe de reconnaissance des cargos Vps26p, Vps29p et Vps35p et un sous-complexe qui favorise les courbures membranaires composé de deux SNX-BARs (Vps5p et Vps17p) (SNX1 et SNX2 chez les

mammifères) (Seaman, Michael McCaffery, et Emr 1998). Le rétromère est un complexe protéique conservé dont le sous-complexe de reconnaissance des cargos chez les mammifères comprend des homologues proches du rétromère des levures : Vps26, Vps29 and Vps35 (C. R. Haft *et al.* 2000). Le terme « rétromère » sera ensuite utilisé pour se référer au trimère Vps26, Vps29 et Vps35. Des études suggèrent que Vps35 sert de noyau au complexe multimérique en se liant directement à Vps26, Vps29 et Vps5. En effet, les résidus 1 à 53 et 307 à 796 de Vps35 se lieraient au domaine coiled coil de Vps5 (C. R. Haft *et al.* 2000). Les SNX-BAR associées au complexe du rétromère fonctionnent en hétérodimère, c'est-à-dire SNX1 ou SNX2 en association avec SNX5 ou SNX6 (Wassmer *et al.* 2007). Des études sur des souris ont montré que lorsque SNX1 ou SNX2 étaient déletées, les souris étaient toujours viables et fertiles. Cela indique que la fonction de SNX1 et SNX2 est redondante (Schwarz *et al.* 2002).

4.2) Fonction des hétérodimères SNX1/SNX2:SNX5/SNX6 dans le transport rétrograde

Les cargos du rétromère les plus caractérisés sont les récepteurs aux hydrolases lysosomales comme le récepteur cation indépendant du mannose-6-phosphate (cation-indépendant mannose-6-phosphate receptor CI-MPR). Le CI-MPR est impliqué dans le transport des hydrolases nouvellement synthétisées du TGN vers les endosomes où elles seront transférées dans les lysosomes. Le CI-MPR sera ensuite reconduit au niveau du TGN pour effectuer un nouveau cycle de transport des hydrolases (Figure 13). Le CI-MPR, aussi nommé Insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R), est une glycoprotéine membranaire d'environ 300 kDa. Sa région extra cytoplasmique contient 15 structures répétitives dont deux sites de liaison au mannose-6-phosphate (M6P) et un site de liaison à l'IGF2. L'extrémité cytoplasmique en C-terminal contient plusieurs signaux de tri (Ghosh, Dahms, et Kornfeld 2003).

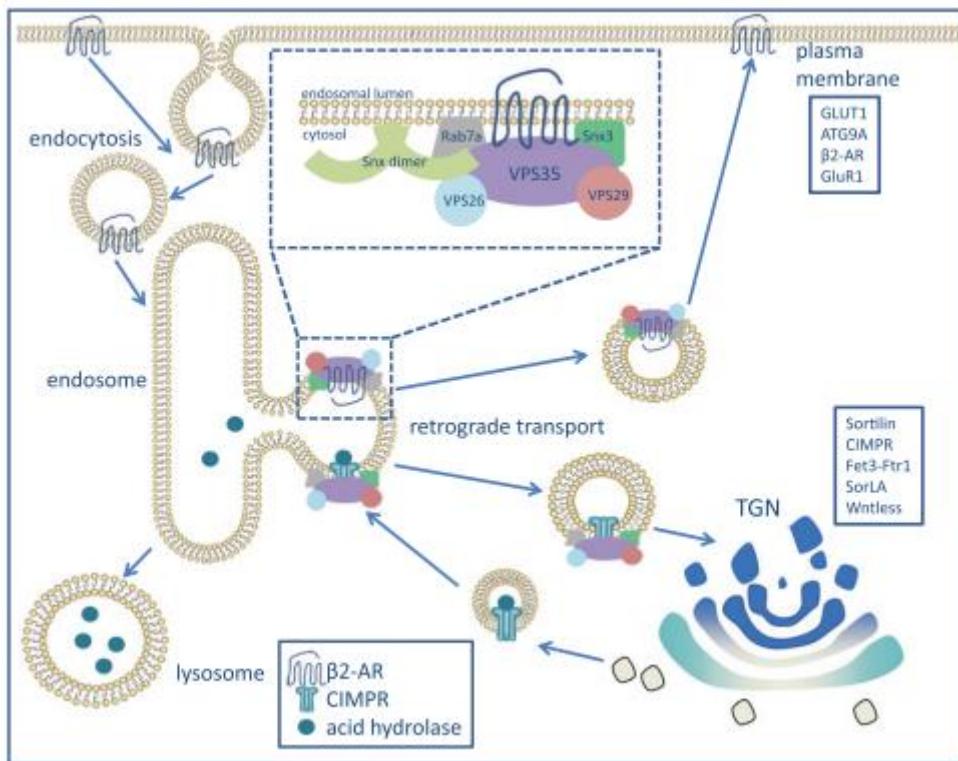


Figure 13 : Transports rétrogrades médiés par le rétromère et les SNX des cargos protéiques associés aux endosomes.

Le rétromère (VSP26, VPS29 et VPS35) et les protéines associées (comme les SNX-BAR ou les Rab) sont impliquées dans le transport rétrograde de différents cargos des endosomes au TGN ou à la membrane plasmique. Parmi ces cargos, le β 2-AR (Récepteur adrénnergique β -2) est recyclé des endosomes à la membrane plasmique. Le CI-MPR est transporté des endosomes au TGN, où il pourra se lier aux hydrolases. Le CI-MPR est ensuite reconduit aux endosomes afin que les hydrolases puissent être délivrées aux lysosomes (Williams *et al.* 2017).

D'après d'anciennes études, le CI-MPR interagirait avec le rétromère et plus spécifiquement avec la protéine Vps35. Le motif Trp-Leu-Met (WLM) présent sur l'extrémité cytoplasmique du CI-MPR permettrait la liaison avec Vps35 et serait donc nécessaire au transport rétrograde des hydrolases (Arighi *et al.* 2004; Seaman 2004). Cependant, de récentes études réfutent cette hypothèse et suggèrent que les hétérodimères SNX1/SNX2 et SNX5/SNX6 assurent ce transport rétrograde des endosomes vers le TGN de manière indépendante du rétromère (Kvainickas *et al.* 2017; Simonetti *et al.* 2017). Des délétions réalisées dans les gènes codant de Vps35 ou Vps29 n'affectent pas le transport rétrograde du CI-MPR tandis qu'un double KO de SNX1/SNX2 ou SNX5/SNX6 cause une délocalisation complète du CI-MPR. Cette délocalisation est d'autant plus intéressante que le CI-MPR semble relocalisé au niveau des endosomes.

De plus, SNX5 et SNX6 serait le dimère spécifique associé au CI-MPR en interagissant avec le motif WLM. A noter que les auteurs admettent avoir des difficultés à expliquer de telles différences entre leurs résultats et les résultats publiés les années passées. Les auteurs vont plus loin dans leur discussion en suggérant que le domaine PX de SNX5 serait le site de liaison du CI-MPR (Kvainickas *et al.* 2017). Cette hypothèse a été validée récemment grâce à la résolution de la structure cristalline du domaine PX de SNX5 en association avec le CI-MPR (Figure 14). Le peptide CI-MPR interagit avec le domaine PX de SNX5 via deux brins β anti-parallèles (β 1 et β 2) reliés par un long linker flexible (Figure 14). Le premier brin β contient des résidus importants tels que Arg103, Met106, Tyr132 et Phe136. Mais c'est ce dernier résidu Phe136 qui semble être le résidu clé de l'interaction entre le CI-MPR et SNX5 (Simonetti *et al.* 2019). Cette interaction semble essentielle pour le transport rétrograde du CI-MPR. Il existe d'autres protéines transmembranaires qui utilisent le même mécanisme moléculaire pour se lier à SNX5. Le récepteur de croissance à l'insuline (IGF1R) et la sémaphorine-4C (SEMAC4) sont deux protéines qui tout comme CI-MPR, interagissent avec SNX5 via les deux brins anti-parallèles β 1 et β 2 (Simonetti *et al.* 2019).

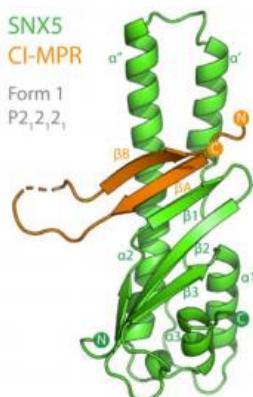


Figure 14 : Structure cristalline du complexe SNX5:CI-MPR.

Une protéine de fusion du domaine PX de SNX5 couplée via un linker flexible à la séquence CI-MPR a été conçue et cristallisée. La structure cristalline a été déterminée par cristallographie aux rayons X. Le peptide CI-MPR interagit avec le domaine PX de SNX5 via deux brins β antiparallèles (β A et β B) reliés par un long linker flexible (Simonetti *et al.* 2019).

La protéine SNX5 semble donc être un élément essentiel au transport rétrograde du CI-MPR. SNX5 joue également un rôle dans d'autres mécanismes cellulaires importants tels que

l'autophagie viro-induite. L'autophagie est un mécanisme complexe qui sera traité dans le chapitre suivant.

V) L'autophagie

1) Les différentes formes d'autophagie

L'autophagie est un mécanisme d'autodigestion permettant la dégradation et le recyclage par voie lysosomale de constituants cytoplasmiques de grande taille tels que des organelles endommagées, des agrégats protéiques ou encore des pathogènes. Les produits de dégradation sont recyclés et réutilisés pour la synthèse de nouvelles molécules ou comme source d'énergie pour la cellule, notamment en cas de carence. L'autophagie est aussi un processus important de l'immunité innée et adaptative puisque qu'elle permet de lutter contre les agents pathogènes.

Il existe trois types d'autophagie : la microautophagie, l'autophagie dépendante des chaperonnes et la macroautophagie. Dans le cas de la microautophagie, les protéines cytoplasmiques peuvent être capturées directement par le lysosome après invagination de sa membrane. L'autophagie dépendante des chaperonnes (CMA pour « chaperone-mediated autophagy ») permet de délivrer directement des substrats cytoplasmiques par translocation au lysosome. Enfin, la macroautophagie est le processus majeur de dégradation des constituants cytoplasmiques par le lysosome après séquestration dans une vacuole à double membrane. Le terme « autophagie » fera référence à ce processus de macroautophagie dans la suite de ce mémoire.

2) Les mécanismes de la macroautophagie

L'autophagie est un mécanisme conservé au cours de l'évolution qui permet de dégrader des organelles endommagées et donc de maintenir l'homéostasie cellulaire. Ce processus est orchestré et régulé par une multitude de gènes nommés ATG pour « Autophagy related Genes » (Suzuki, Noda, et Ohsumi 2004). L'autophagie peut être induite en condition de stress telle que la carence en nutriments, l'absence de facteurs de croissance ou l'hypoxie. La protéine mechanistic target of rapamycin (mTOR) joue un rôle clé dans l'intégration de ces signaux et la régulation de l'autophagie. Lorsque mTOR est activée, elle inhibe la voie de

l'autophagie, mais son inactivation (à la suite d'un stress) permet de lever l'inhibition et donc d'enclencher l'autophagie (Figure 15).

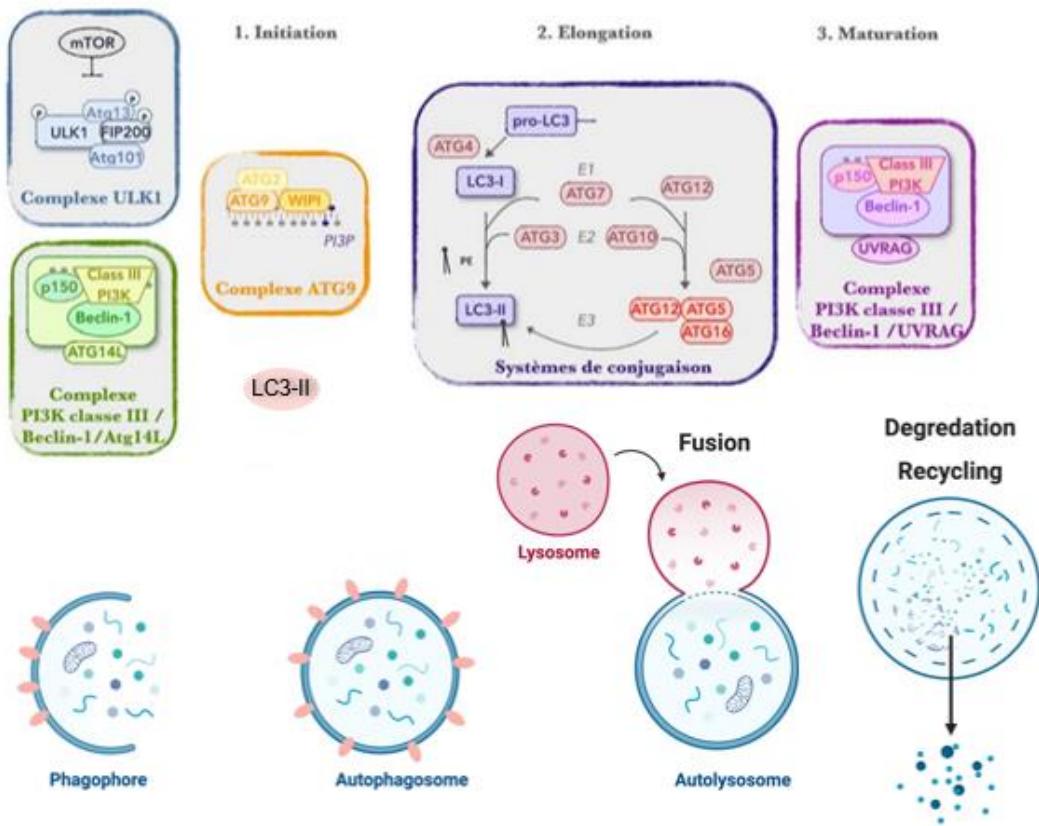


Figure 15 : Le processus d'autophagie.

L'initiation de l'autophagie met en jeu trois complexes de protéines : ULK1, ATGP et PI3K classe III afin de générer une double membrane qui formera le phagophore. Deux systèmes de conjugaison sont impliqués dans le processus d'elongation. Le complexe ATG5/ATG12/ATG16L1 permet à LC3-I de se lier au PE afin de produire LC3-II qui servira à la formation de l'autophagosome. Lors de l'étape de maturation, l'autophagosome fusionne avec un lysosome afin de former un autolysosome (ou autophagolysosome) donc le matériel cytoplasmique sera dégradé et recyclé grâce aux hydrolases lysosomales (Adapté de Daussy et Espert. 2016).

2.1) Initiation

Chez les mammifères, l'initiation de l'autophagie implique l'activation de plusieurs complexes protéiques : le complexe PI3K classe III (avec PI3K classe III, Beclin1, AT14L et p150) et le trimère ATG9 (représenté par ATG9, ATG2 et WIPI « WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1 »). Le complexe ULK1 (composé de ULK1, ATG13, ATG101 et FIP200) peut aussi être impliqué.

L'activation du complexe PI3K classe III va permettre la production de PI3P qui sert de signal au recrutement d'autres effecteurs comme WIPI qui permettra la formation d'une double membrane appelée phagophore (Figure 15).

2.2) Elongation

Une fois le phagophore formé, la double membrane s'allonge et s'incurve afin de créer une vésicule nommée autophagophore. Deux systèmes de conjugaison de type ubiquitination sont nécessaire afin d'engager cette étape d'élongation. Le premier système met en jeu trois protéines qui vont s'associer entre elles ATG5/ATG12/ATG16L1 et permettre le recrutement du deuxième complexe de conjugaison. Le deuxième système fait intervenir la protéine LC3 sous la forme d'un précurseur pro-LC3 qui est clivé par la protéase ATG4 afin de générer la protéine cytosolique LC3-I. Le premier complexe de conjugaison, ATG3 et ATG7 vont permettre la liaison de LC3-I avec du phosphatidyléthanolamine (PE) pour produire LC3-II et aboutir à la formation d'un autophagosome (Tanida, Ueno, et Kominami 2004). Contrairement à LC3-I, la protéine LC3-II est ancrée dans les membres interne et externe de l'autophagophore grâce à sa liaison au PE. Lorsque l'autophagosome se referme, les protéines LC3-II situées sur la membrane externe vont être clivées par ATG4 et recyclées, tandis que les protéines LC3-II fixées sur la membrane interne vont être présentes jusqu'à l'étape de fusion avec un lysosome puis elles seront dégradées. LC3-II est donc utilisée comme un marqueur du flux autophagique. LC3 est un orthologue de la protéine ATG8 initialement identifié chez la levure (Sugawara *et al.* 2004). Chez les mammifères, il existe deux familles apparentées à ATG8. La famille Microtubule-associated protein light chain-LC3 (MAP-LC3) composées de LC3A, LC3B, LC3B2 et LC3C. LC3B sera par la suite simplement nommée par LC3 dans ce mémoire. La deuxième famille est la famille des Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein (GABARAPs) dont les membres sont GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 et GABARAPL3) (Wang *et al.* 1999) (Figure 15).

2.3) Maturation

Vient ensuite l'étape de maturation et de fusion de l'autophagosome avec un lysosome via des microtubules afin de former un autophagolysosome (Ganley 2013). L'étape de fusion nécessite la présence du complexe UVRAG formés des trois protéines Beclin1, PI3K classe III

et p150. Le matériel cytoplasmique va ainsi être séquestré et dégradé grâce aux hydrolases à pH acides du lysosome. Puis le matériel dégradé va être recyclé en étant redistribué dans le cytoplasme via des transporteurs localisés dans le lysosome (Figure 15).

3) Relation entre autophagie et virus

3.1) Induction de l'autophagie par les virus

L'autophagie est un mécanisme qui peut être activé après une infection par un pathogène intracellulaire puisque son rôle est de maintenir l'homéostasie cellulaire. L'autophagie est en effet connue pour être activée dans de nombreuses infections bactériennes et virales. Beclin1 est la première protéine de l'autophagie à avoir été identifiée. La surexpression de Beclin1 dans le système nerveux central des souris durant l'infection provoque une réduction du titre viral et une diminution du nombre de cellules infectées par le virus Sindbis (Liang *et al.* 1998). Un rôle antiviral similaire de l'autophagie a été observé chez les souris lors d'infection avec le virus de l'Herpès Simplex-1 (HSV-1) qui possède un génome à ADN double brin (B. L. Liu *et al.* 2003). Les études menées sur des modèles de petits animaux, sur les plantes ou chez les Drosophiles ont aussi confirmé l'importance du rôle de l'autophagie dans la défense cellulaire contre d'autres virus à ARNsb comme le virus de la mosaïque du tabac (TMV) ou VSV. Cela suggère que la fonction antivirale de l'autophagie a été conservée au cours de l'évolution.

3.2) Fonction de l'autophagie dans l'immunité innée et adaptative

En plus d'être engagée dans la défense immune intrinsèque contre les virus, l'autophagie est impliquée dans l'immunité innée et adaptative contre les infections. En effet, de récentes études indiquent que le LPS est capable d'activer la signalisation en aval des TLR4 et de réguler positivement l'autophagie dans les lignées cellulaires de macrophages mais pas dans les macrophages primaires (Xu *et al.* 2007). Les voies de signalisation qui activent l'autophagie en aval des TLRs ne sont pas encore connues, cependant la délétion des protéines adaptatrices Myd88 et TRIF inhibe l'activation de l'autophagie après la stimulation des TLR (Shi et Kehrl 2008). L'autophagie intervient aussi activement dans la réponse immunitaire adaptative. En effet, l'autophagie intervient dans la présentation antigénique par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Une étude a démontré que lorsque le complexe PI3K classe III

était déplété dans les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), une diminution de la présentation de certains antigènes était observée (Nimmerjahn *et al.* 2003).

4) Relation entre autophagie et SNX

4.1) Rôle des SNX-BAR dans l'autophagie

L'autophagie est un mécanisme complexe qui nécessite l'interaction de différentes familles de protéines. SNX18, qui fait partie des SNX-BARs, est capable de se lier à LC3 et à ATG16L1, deux protéines impliquées dans la biogénèse des autophagosomes. En effet, SNX18 a été identifiée comme un régulateur positif de la régulation de la formation des autophagosomes puisque une délétion de SNX18 induit une diminution du nombre d'autophagosomes (Knævelsrud, Carlsson, et Simonsen 2013). SNX18 agirait en aval de ATG14 et de PI3K classe III afin de faciliter le recrutement d'ATG16L1 dans les endosomes et de favoriser la lipidation de LC3 afin de former un phagophore. SNX9 jouerait également un rôle dans l'autophagie au côté de SNX18 puisque ces deux protéines sont codées par des gènes paralogues et ont une fonction redondante dans la modulation du trafic endocytaire au niveau de la membrane plasmique (Håberg, Lundmark, et Carlsson 2008, 18; Park *et al.* 2010). De plus, une analyse détaillée des premières étapes de la formation des autophagosomes a révélé que l'hétérodimère SNX4/SNX7 est nécessaire au recrutement ou à la rétention efficace des principaux régulateurs de l'autophagie. L'hétérodimère SNX4/SNX7 coordonne le trafic de la protéine ATG9A au sein du réseau endocytaire pour établir des sites d'assemblage d'autophagosome, suggérant donc que SNX4/SNX7 sont aussi des régulateurs positifs de l'autophagie (Antón *et al.* 2020).

4.2) Fonction de SNX5 dans l'autophagie

Une étude très récente publiée dans Nature montre que SNX5 est impliquée dans l'autophagie induite par les virus (Dong *et al.* 2021). SNX5 a été identifiée par un crible dont le but était d'identifier des facteurs essentiels à l'induction de l'autophagie viro-induite. SNX5 est induite lors de l'infection d'un large panel de virus tels que le virus Sindbis, Zika, Chikungunya ou encore le virus influenza. Des expériences réalisées *in vitro* chez des souris SNX5^{-/-} ont révélé que la délétion de SNX5 augmente la léthalité après infection avec plusieurs virus. Des

expériences d'immunoprecipitation entre SNX5 et le complexe PI3K classe III (PI3KC3-C1) ainsi qu'entre SNX5 et Beclin1 ont été réalisées afin de savoir si SNX5 pouvait interagir avec des protéines connues qui régulent l'autophagie. Les résultats montrent que SNX5 interagit avec Beclin1 et PI3KC3-C1. Cependant l'interaction entre SNX5 et PI3KC3-C1 ne nécessite pas le fonctionnement de l'activité lipide kinase du complexe puisqu'elle n'est pas diminuée après un traitement avec du PIK-III (une molécule qui inhibe l'activité du complexe PI3KC3-C1). SNX5 serait localisée dans les endosomes contenant les virions lors d'une infection et favoriserait l'augmentation de l'activité lipide kinase de PI3KC3-C1 et la génération endosomale de PI3P (Dong *et al.* 2021).

Objectif du projet

Nous savions que NCOA7-AS, une protéine induite par l'interféron, est capable d'inhiber l'infection par le virus influenza A en bloquant la fusion entre les membranes virales et endosomales. Le laboratoire a également montré que NCOA7-AS interagit avec la V-ATPase, ce qui favorise l'acidification des vésicules cytoplasmiques et l'activité des protéases lysosomales.

L'objectif de mon projet est de décortiquer les mécanismes moléculaires à l'origine de l'effet antiviral de NCOA7-AS. Pour cela, dans un premier temps, nous avons recherché les partenaires protéiques de NCOA7-AS par spectrométrie de masse puis identifié et caractérisé certaines Sorting Nexins (SNX) comme partenaires privilégiés.

Nous savions également que NCOA7-AS jouait un rôle dans l'autophagie puisque Caroline Goujon avait observé l'impact de l'expression ectopique de NCOA7-AS sur l'accumulation massive de LC3-II, une protéine utilisée comme marqueur de l'autophagie. J'ai donc cherché à comprendre si l'autophagie avait un lien avec l'activité antivirale de NCOA7-AS.

Matériel et méthodes

I) Matériels

1) Plasmides et constructions

Les séquences codantes (CDS) des gènes d'intérêt ont été clonées dans un vecteur lentiviral pRRL.sin.cPPT.SFFV/IRES-puro.WPRE, développé au laboratoire (Doyle et al, 2018) en utilisant les sites de restriction BamHI/Xhol. Les séquences codantes des gènes d'intérêt sont les suivantes : NCOA7-AS variant 6 (139443 Addgene), E2-Crimson (139445 Addgene) et Firefly (139446 Addgene). Une séquence codant l'étiquette simple triple (3X-) FLAG 5'-ATGGACTACAAAGACGACGACAAAGACTACAAAGACGCAAAGACTACAAAGACGACGACAAA-3' ou simple myc 5'-ATGGAACAAAAACTCATCTCAGAACAGGATCTG-3' a été insérée en amont de la séquence codante avec la Taq Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo). La séquence codante de la SNX1 a été clonée par amplification en utilisant la SuperScript III One-Step RT-PCR System avec la Platinum Taq (Invitrogen) à partir de 100 ng d'ARN de cellules U87-MG avec les primers 5'-aattaattaaGCGGCCGCATGGACTACAAAGACGACGACAAAGCGTCGGTGGGTGG-3' et 5'-aattaattaaTCGACTTAGGAGATGGCCTTGCCCTCAGG-3'.

2) Culture cellulaire

Les cellules embryonnaires rénales HEK293T, de glioblastomes U87MG-FF (FF : Firefly ; cellules exprimant la luciférase Firefly de façon constitutive générées au laboratoire) et pulmonaires A549-FF sont cultivées à 37°C en présence de 5% de CO₂. Elles sont maintenues dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium de Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et 50 U/ml de pénicilline/streptomycine (Gibco). Deux jours après transduction par des vecteurs lentiviraux RRL.sin.cPPT.SFFV/IRES-puro, les cellules transduites sont sélectionnées par ajout de 1ug/mL de puromycine ou de néomycine. Quand indiqué, les cellules sont traitées avec 2000 U/ml d'IFN α (INTRON A; Merck Sharp & Dohme) pendant 24h à 37°C.

II) Méthodes

1) Production de vecteurs lentiviraux et transduction

Les vecteurs lentiviraux utilisés sont obtenus par co-transfection de cellules HEK293T sub-confluentes avec 3 plasmides : le premier exprimant les protéines de structure et enzyme du HIV-1 Gag-Pol (p8.91), le deuxième la glycoprotéine d'enveloppe VSV-G et le troisième codant un mini-génome de type pRRL.sin.cPPT.SFFV/IRES-puro.WPRE (ratio 1 :0,5 :1). L'agent de transfection utilisé est le PEI (polyéthylénimine). Le milieu de culture est changé 6h post-transfection. Le surnageant contenant les vecteurs lentiviraux est récolté 36 à 40h plus tard puis filtré (0,45 µm) avant d'être congelé à -80°C ou utilisé directement. Les cellules d'intérêt (A549 ou U87-MG) d'intérêt sont ensuite transduites avec les vecteurs lentiviraux filtrés. Le milieu de culture est changé 6h post-transduction.

2) Infection avec IAV

Les cellules exprimant les différentes constructions ainsi que la luciférase Firefly de façon constitutive sont ensemencées la veille de l'infection à environ $3\text{-}5.10^4$ cellules par puits de plaque 96 de façon à être confluentes au moment de l'infection. Elles sont infectées avec du IAV rapporteur qui exprime la Nanoluciférase, appelé IAV-NanoLuc (Doyle et al, 2018), dont le stock a été préparé et titré au laboratoire par Olivier Moncorgé. L'infection est classiquement réalisée pendant 1h dans du milieu sans sérum avec trois doses de virus : $6,25.10^3$; $1,25.10^4$ et $2,5.10^4$ PFU/puits (PFU, Plaque Forming Units), le milieu est ensuite remplacé par du milieu complet et l'infection est arrêtée après 7h d'incubation par élimination du surnageant de culture et ajout d'un tampon de lyse (Passive lysis buffer, Promega). La mesure des activités luciférases est réalisée par un luminomètre (Tecan infinite F200 Pro) en utilisant le kit de substrat Nano-Glo Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Le calcul du ratio Nanoluciferase/Firefly permet d'évaluer le niveau d'infection des cellules en s'affranchissant des petites variations potentielles de quantités de cellules par puits. Le niveau d'inhibition de l'infection par NCOA7-AS a été calculé dans des cellules ARNi contrôle, SNX5/6 ou Beclin1.

3) Expériences d'ARN interférence

Des expériences utilisant des ARN interférents (ARNi) ciblant les SNX1, SNX2, SNX5, SNX6 et Beclin1 sont réalisées sur des cellules A549 contrôles (exprimant E2-Crimson) et des cellules exprimant NCOA7-AS. Les ARNi sont utilisés en double transfection, comme décrit précédemment (Simonetti et al, 2017) : ARNi ciblant SNX1 avec ceux ciblant SNX2 et ARNi ciblant SNX5 avec ceux ciblant SNX6, à 44 nM final en utilisant le réactif Lipofectamine RNAiMax selon le protocole du fournisseur (ThermoFisher). Les séquences des ARNi utilisées (Simonetti et al, 2017) pour les SNX (Sigma) sont les suivantes : SNX1 (5'-GUGGCUCUUGGUUCUUGUUUU-3'), SNX2 (5'-GGUUCUGGAGAUGAUGGACUU-3'), SNX5 (5'-UCAAAGUCGGCUUCGUAG-3'), et SNX6 (5'-UACUCCAUCUGCUGAUAAA-3'). Pour Beclin1 un kit contenant plusieurs ARNi a été utilisé (ON-TARGETplus Human BECN1 (8678) siRNA – SMARTpool). Les séquences des trois ARNi (Sigma) pour NCOA7-AS sont : NCOA7-AS.1 (5'-GGAUGUCCAAGGGUAUCUU-3'), NCOA7-AS.2 (5'-AAAAGGCUCUUCGUCAGGUC-3') et NCOA7-AS.3 (5'-GUCUGGCACAAUAGAAAAUC-3').

4) Western blots

Les cellules sont lysées dans du tampon de lyse (10 mM TRIS pH 7,6 ; 150 mM NaCl ; 1% triton ; 1mM EDTA et 1% deoxycholate) contenant 1X de Laemmli final (50 mM TRIS/HCl pH 8 ; 12% SDS ; 5% glycérol ; 100 mM dithiothréitol et 0,1% bleu de bromophénol). Les échantillons sont dénaturés à 95°C pendant 10 min. Les protéines sont séparées par SDS-PAGE sur un gel à 10% d'acrylamide avant d'être transférées sur une membrane Millipore Immobilon PVDF pendant 1h à 100V dans un appareil à transfert liquide. Le blocage des sites non spécifiques est réalisé pendant 30 min en utilisant une solution de PBS 1X - lait 5%. Les anticorps primaires générés chez le lapin ou la souris anti-SNX1 (10304-1-AP Proteintech), SNX2 (611308 BD biosciences), SNX5 (17918-1-AP Proteintech), SNX6 (10114-1-AP Proteintech), anti-ATP6V1A (17115-1-AP Proteintech), anti-ATP6V1B2 (15097-1-AP Proteintech), anti-ATP6V1E1 (15280-1-AP Proteintech), anti-SEC13 (15397-1-AP Proteintech), anti-SEC31A (17913-1-AP Proteintech), anti-MCM7 (11225-1-AP Proteintech), anti-Beclin1 (11306-1-AP Proteintech), anti-IFITM3 (11714-1-AP Proteintech), anti-IFNAR1 (13083-1-AP Proteintech), anti-MX1 (PA5-22101 Thermo-Fisher Scientifique) et anti-LC3B (L7543 Sigma) sont utilisés au 1/1000 puis incubés pendant 1h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C. Les étiquettes FLAG (A8592 Sigma)

et Myc (A5598 Sigma) sont reconnus par des anticorps couplé à la HRP dilué respectivement au 1/10000 et au 1/5000. Un contrôle de charge est réalisé en utilisant un anticorps anti-actine de souris (A1978 Sigma), dilué au 1/5000. Des anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris (Thermo-Fisher Scientifique) couplés à l'enzyme HRP (horseradish peroxydase) sont ensuite utilisés au 1/2500. Les membranes sont révélées à l'aide d'un imageur ChemiDoc en utilisant du substrat Clarity de BioRad.

5) Co-immunoprécipitation

Pour la spectrométrie de masse, trois expériences indépendantes de co-immunoprécipitations (co-IP) ont été réalisées sur des lysats de cellules U87MG exprimant soit NCOA7-AS possédant une étiquette triple-FLAG soit NCOA7-AS seul, sans tag (contrôle négatif), selon le protocole décrit dans (Doyle et al, 2018) et les conseils de la plateforme de protéomique fonctionnelle montpelliéraise (FPP) pour le contrôle négatif. $25 \cdot 10^6$ cellules sont lysées en tampon de lyse (20 mM Hepes-NaOH pH7,5 ; 150 mM NaCl ; 1% NP-40 et cocktail inhibiteur de protéases (Roche)). Les lysats sont ensuite clarifiés par centrifugation à 1000g pendant 10 min et les protéines étiquetées avec un Flag sont immunoprécipitées en utilisant un anticorps anti-Flag conjugué à des billes magnétiques (Sigma-Aldrich). Après 5 lavages des billes magnétiques en tampon de lyse, l'élution est réalisée avec un peptide triple Flag à 150 µg/mL final. Après vérification de l'IP sur gel SDS-PAGE, les échantillons sont envoyés à la Plateforme de Protéomique de Montpellier (PPF) qui réalise une identification et une quantification des protéines associées à NCOA7-AS par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

Pour les expériences d'interaction entre NCOA7-AS et SNX1, une co-IP a été réalisée sur des lysats de cellules U87MG coexprimant Flag-SNX1 avec soit Myc-NCOA7-AS soit Myc-Firefly (contrôle). Le protocole de la co-IP est le même que celui décrit dans Doyle et al,2018.

6) Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse a été réalisée par la plateforme de protéomique fonctionnelle montpelliéraise (FPP). Les échantillons de co-IP sont migrés sur un gel de concentration et après migration une bande unique est excisée. Les protéines sont digérées par la trypsine et les peptides obtenus analysés par nano-flow HPL-nanoelectrospray ionization utilisant un

Qexactive HF mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) couplé à un système nano-LC. La préconcentration des échantillons est réalisée sur une colonne Pepmap® (0.3 × 10 mm ; Dionex). L’analyse des données brutes est effectuée par l’ingénieur de la plateforme en utilisant le logiciel MaxQuant. Pour mettre en avant les protéines les plus abondantes dans l’échantillons NCOA7-AS en comparaison au contrôle, le logiciel Perseus est utilisé avec les paramètres standards et un test de Student réalisé. Cette analyse a été réalisée par la plateforme FPP.

7) Immunofluorescence

Les cellules sont ensemencées en plaque 24 puits sur lamelle de verre puis traitées ou non avec de la bafilomycine A1 (B1793 Sigma) à 10 nM pendant 1h. 24h après ensemencement des cellules, elles sont fixées au méthanol à -20°C pendant 10 min. Une étape de blocage est réalisée en incubant pendant au moins 30 min dans du tampon de blocage (0,1% saponine ; 1% sérum de veau fétal). Les anticorps primaires anti-CI-MPR (MCA2048 BioRad) et anti-LC3B (L7543 Sigma) sont utilisé au 1/100 dans le NGB pendant 1h. Après 3 lavages au PBS, l’anticorps secondaire AlexaFluor488 dilué au 1/2000 est mis en contact pendant 45 min dans l’obscurité. Après lavages, les lamelles sont montées sur lames grâce au milieu de montage Prolong Gold contenant du DAPI. Les immunofluorescences sont ensuite analysées sur un microscope confocal LSM880 (Zeiss) par Dr. Caroline Goujon.

8) Calcul des coefficients de colocalisation

Chaque image a été recadrée et enregistrée en un seul fichier. Un floutage médian a été appliqué (3.0 du canal CI-MPR uniquement) avant que l’arrière-plan ne soit supprimé. Les images ont été importées dans le logiciel JACoP puis les calculs du coefficient de Pearson et des coefficients M1 et M2 ont été appliqués.

9) Test d'acidification des organelles

Les cellules sont ensemencées en plaque 96 puits puis 24h plus tard, les cellules sont traitées avec du LysoTracker™ Green DND-26 (Invitrogen) à une concentration de 75 nM (ou avec du DMSO pour le contrôle) durant 30min à 37°C. Puis les cellules sont lavées en PBS, tryspinées puis resuspendues dans du FACS-buffer (PBS supplémenté de 2% de SVF). La fluorescence est ensuite lue à une longueur d'onde de 488 nm au cytomètre Novocyte ACEA 1.

10) Inhibition du complexe PI3K classe III

Les cellules sont ensemencées en plaque 96 puits avant d'être pré-traitées avec du PIK-III (TA-T6945-2MG Euromedex) à une concentration de 0,5 µM ou avec du DMSO pour le contrôle) pendant 1h à 37°C. Les cellules sont ensuite infectées avec IAV-NanoLuc. Puis les cellules sont infectées pendant 7h avec $2,5 \cdot 10^4$ PFU/puits d'IAV-NanoLuc. 1h après infection, les cellules sont de nouveau traitées ou non avec 0,5 µM de PIK-III pendant 7h à 37°C avant d'être lysées.

11) Quantification de l'expression des ARNm

Les cellules traitées ou non avec IFN sont récupérées et les ARN sont extraits en utilisant le kit RNeasy (Qiagen) avec une étape de traitement à la DNase. 250 ng d'ARN ont été utilisés pour générer les ADN complémentaires (ADNc) par transcription inverse avec el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (4374967 Applied Biosystems). Les ADNc sont analysés par PCR quantitative grâce au TaqMan Universal PCR Master Mix (430571 Applied Biosystems) spécifique pour l'actineB (Hs99999903_m1) et de GAPDH (Hs99999905_m1). Les primers utilisés pour NCOA7-AS sont les suivants : 5'-GATTACCCTGGACATCCAGATTTCTATT-3' et 5'-CACCTCTCGCCTCGTCTTCATAGT-3' et la séquence de la sonde interne fluorescente est 5'-FAM-AGGCAAAGCGCAGGAAGAGCACATGC-TAMRA-3'. Chaque répétition d'expérience est réalisée en triplicats technique. Les ARNm de GAPDH et ACTB ont été utilisés pour normaliser les échantillons. Les résultats sont analysés grâce à la quantification relative.

13) Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec un test de Mann-Whitney à l'aide du logiciel GraphPad.

Résultats

I) Etude des partenaires protéiques de NCOA7-AS

1) Recherche des interactants de NCOA7-AS par spectrométrie de masse : identification des protéines SNX-BAR 1/2/5/6

Afin de nous aider à comprendre le mode d'action de NCOA7-AS, nous avons décidé d'identifier ses partenaires protéiques. Nous avons donc réalisé des expériences de co-immunoprécipitation (co-IP) de la protéine NCOA7-AS étiquetée avec un peptide triple Flag, exprimée de façon ectopique dans une lignée cellulaire modèle, en parallèle d'un contrôle négatif (NCOA7-AS sans étiquette, ce qui est classiquement recommandé comme contrôle négatif par nos collaborateurs de la plateforme de protéomique fonctionnelle montpelliéraise, FPP). La plateforme FPP a analysé le contenu de ces échantillons par spectrométrie de masse (Figure 16). Les résultats issus de cette analyse ont permis de confirmer l'interaction de NCOA7-AS avec différentes sous-unités de la V-ATPase (ATP6V1A, ATP6V1B2 et ATP6V1E1) (Doyle *et al.* 2018) ainsi que de montrer une interaction avec les sous-unités ATP6V1D, ATP6V1C1 et ATP6V1G1 (en rouge sur la figure 16. A).

Les peptides retrouvés en plus grands nombres sur la liste d'enrichissement permettent d'identifier 4 protéines de la famille des Sorting Nexins (SNX) : SNX1, SNX2, SNX5 et SNX6 (en vert sur la figure 16. A). D'après ces résultats, cette famille de protéines serait donc capable d'interagir avec NCOA7-AS. Les SNX sont un groupe important de protéines qui facilitent le tri des protéines (Cullen et Korswagen 2011). Elles peuvent s'associer aux membranes grâce à leur domaine spécifique BAR (Bin-Amphiphysin and Rvs domain) et/ou grâce à des interactions protéine-protéine avec des complexes protéiques associés à la membrane. A ce stade, l'interaction entre NCOA7-AS et ces SNX n'était pas connue, et, de façon très intéressante, il n'existe par ailleurs aucun rôle connu des SNX dans la régulation de l'activité de la V-ATPase. C'étaient donc des résultats préliminaires ouvrant la voie à de nouvelles pistes d'investigation.

Dans un premier temps, pour confirmer cette interaction, j'ai réalisé des western blots sur plusieurs échantillons de co-IP de Flag-NCOA7-AS et de Flag-E2-Crimson (contrôle négatif) que nous avions conservé au laboratoire en utilisant des anticorps ciblant SNX1, SNX2, SNX5 et SNX6. Les résultats obtenus valident ceux obtenus indépendamment sur les échantillons analysés en spectrométrie de masse : les western blots permettent de détecter les SNX

d'intérêt suite à l'immunoprécipitation de Flag-NCOA7-AS (Figure 16. B) mais pas suite à l'immunoprécipitation de la protéine contrôle Flag-E2-Crimson.

D'autres peptides ont été retrouvés en grand nombre sur la liste d'enrichissement qui correspondent aux familles de protéine des SEC (SEC13 et SEC31A) (en jaune sur la figure 16. A) et les MCM (MCM2, MCM4, MCM6, MCM7) (en gris sur la figure 16. A). Des western blot ont également été réalisés afin de valider certaines de ces interactions avec NCOA7-AS (Figure 16. B). Cependant, nous n'avons pas poursuivi l'étude du rôle de ces protéines.

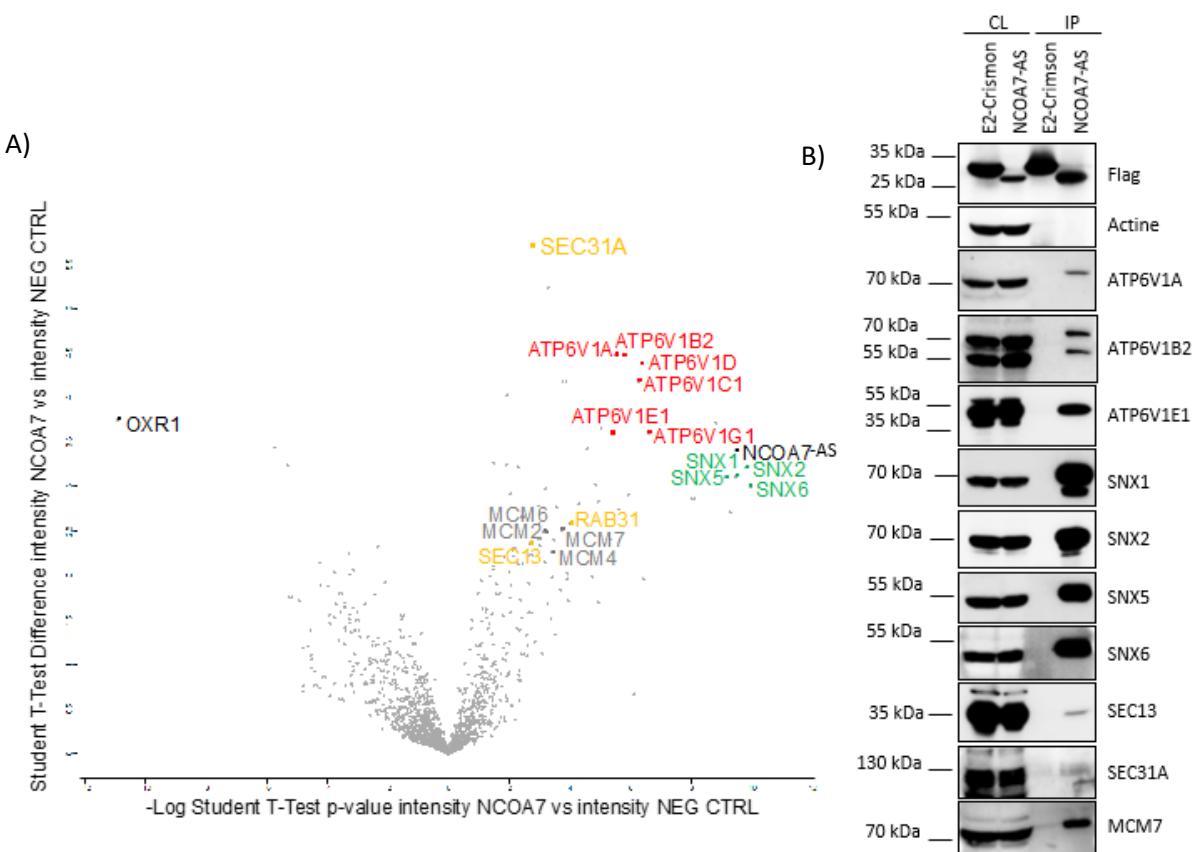


Figure 16 : Identification des partenaires protéiques cellulaires de NCOA7-AS.

A) Trois expériences indépendantes de co-immunoprécipitations (co-IP) ont été réalisées sur des lysats de cellules U87-MG exprimant soit NCOA7-AS possédant une étiquette triple-FLAG soit NCOA7-AS, sans étiquette (contrôle négatif), selon le protocole décrit dans (Doyle et al, 2018). Les échantillons ont été transmis à la Plateforme de Protéomique de Montpellier (PPF) qui a réalisé l'identification et une quantification des protéines associées à NCOA7-AS par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) ($n=3$). Un volcano-plot représente ici les protéines identifiées dans les échantillons 3xFlag-NCOA7-AS en comparaison du contrôle négatif (NCOA7-AS sans étiquette). NCOA7-AS est inscrit en noir, en rouge sont les partenaires attendus (sous-unités de la V-ATPase) et en vert, jaune et gris les nouveaux partenaires d'intérêt. **B)** Validation de l'interaction de NCOA7-AS avec les SNX1, SNX2, SNX5, SNX6, SEC13, SEC31A et MCM7. Un western blot représentatif est montré ici. CL : lysats cellulaires, IP : immunoprécipitats, E2-Crimson : 3x-Flag-E2-Crimson, NCOA7-AS : 3x-Flag-NCOA7-AS.

2) Confirmation de l'interaction entre les SNX-BAR et NCOA7-AS

Nous avons décidé pour la suite de cette étude de nous focaliser sur les SNX, d'une part car il s'agissait des partenaires les plus abondants et d'autres parts car leur rôle cellulaire semblait potentiellement pertinent au regard de ce que nous savions sur NCOA7-AS.

Dans un premier temps, comme nous savions que l'immunoprécipitation de NCOA7-AS permettait de co-immunoprécipiter certaines SNX, nous avons voulu savoir si l'inverse était vrai également. Dans ce but, nous avons cloné la séquence codante de *SNX1*, *SNX5* et *SNX6* (nous n'avons pas réussi le clonage moléculaire pour *SNX2*) dans un vecteur lentiviral. Des tests d'expression ectopique en lignée cellulaire, nous ont permis de déterminer que *SNX1* s'exprimait fortement contrairement à *SNX5* (peu exprimée) et *SNX6* (non détectée (résultats non montrés). Nous avons donc sélectionné *SNX1* pour la suite.

Des lignées cellulaires stables ont été générées par co-transduction de cellules modèles avec des lentivecteurs codants Flag-SNX1 et des lentivecteurs codant Myc-NCOA7-AS ou bien le contrôle négatif (Myc-Firefly). La protéine Flag-SNX1 a ensuite été immunoprécipitée. Les lysats de départs et les immunoprécipitats ont ensuite été analysés par western blot. Nous constatons que l'immunoprécipitation de SNX1 entraîne la co-immunoprécipitation de NCOA7-AS, confirmant l'interaction entre ces deux partenaires protéiques (Figure 17). Ces résultats confirment aussi l'interaction de SNX1 avec les trois autres SNX d'intérêt, ce qui était attendu puisqu'elles interagissent entre elles et fonctionnent en hétérodimères (Wassmer *et al.* 2007) (Figure 17). De façon très intéressante, nous constatons qu'en présence de NCOA7-AS, l'immunoprécipitation de SNX1 permet d'immunoprécipiter des sous-unités de la V-ATPase (Figure 17), ce qui n'est pas le cas dans la condition où les cellules expriment le contrôle négatif Myc-Firefly. Il est toutefois à noter que cette expérience devra être répétée car elle n'a été réalisée qu'une seule fois.

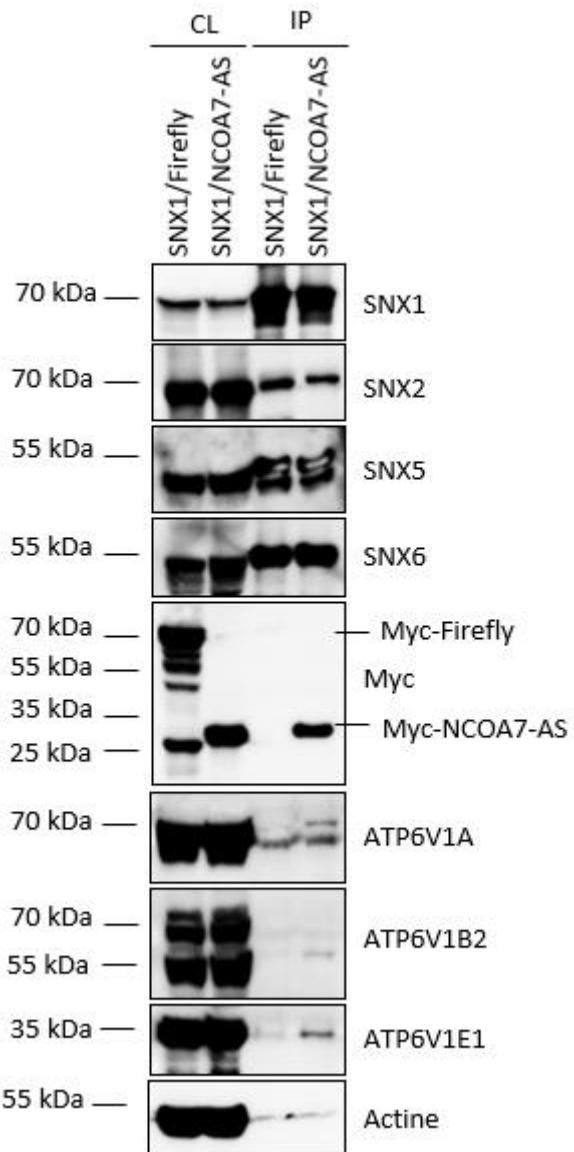


Figure 17 : Interaction de SNX1 avec NCOA7-AS et des sous-unités de la V-ATPase.

Des cellules U87-MG ont été co-transduites avec des vecteurs lentiviraux qui expriment Flag-SNX1 (SNX1) et myc-Firefly ou myc-NCOA7-AS. Les cellules ont été lysées et les protéines ont été immunoprécipitées en utilisant des billes magnétiques conjuguées à un anticorps anti-Flag avant d'être éluées avec un peptide triple Flag. Les protéines ont été analysées par western blot en utilisant un anticorps anti-SNX1, anti-SNX2, anti-SNX5, anti-SNX6, anti-Myc, anti-ATP6V1A, anti-ATP6V1B2, anti-ATP6V1E1 et un anti-actine comme contrôle de charge, comme indiqué. CL : lysats cellulaires, IP : immunoprécipitats (n=1).

II) Etude de l'impact des SNX sur l'activité antivirale de NCOA7-AS

1) Impact de NCOA7-AS sur la localisation du CI-MPR

Nos expériences de co-immunoprecipitation ont montré que NCOA7-AS interagit avec certaines SNX-BAR : les SNX1/2/5 et 6. Celles-ci sont impliquées dans le recyclage (ou transport rétrograde du récepteur au mannose-6-phosphate cation dépendant, le CI-MPR (Cation-Independent Mannose-6-Phosphate Receptor en anglais) des endosomes vers le trans-golgi network (TGN). En effet, deux études récentes ont notamment montré que la déplétion des SNX1/2/5/6 entraîne une délocalisation du CI-MPR du TGN vers les endosomes précoces et tardifs et donc une perturbation de leur transport rétrograde (Kvainickas *et al.* 2017; Simonetti *et al.* 2017). Nous avons émis l'hypothèse que NCOA7-AS pouvait usurper et/ou perturber la fonction de ces SNX et que, si c'était le cas, cela pourrait potentiellement être mis en évidence en étudiant la localisation du CI-MPR.

Nous avons donc analysé par immunofluorescence (IF) et microscopie confocale la localisation du CI-MPR dans des cellules contrôles (exprimant la Firefly) et des cellules exprimant NCOA7-AS (Figure 18. A et B). Nous avons constaté que le CI-MPR est concentré dans une zone périnucléaire dans les cellules contrôles fixées (Figure 18. A). Des expériences de co-marquages avec un marqueur du TGN (TGN46) nous ont permis de confirmer que le CI-MPR est bien présent principalement au niveau du TGN dans les cellules fixées (Figure 18. B) comme attendu d'après la littérature (Kvainickas *et al.* 2017; Simonetti *et al.* 2017). Par contre, dans les cellules exprimant NCOA7-AS (Figure 18. A et B), on observe un patron de localisation du CI-MPR qui semble beaucoup plus vésiculaire, avec un marquage ponctué réparti dans le cytoplasme. Nous avons utilisé des outils de bio-informatique afin d'analyser la colocalisation du CI-MPR avec le TGN en présence et en absence de NCOA7-AS. Les coefficients de Pearson, M1 et M2 permettent de calculer le rapprochement spatial entre deux marqueurs fluorescents qui se chevauchent dans une image prise par microscopie (Figure 18. B). Ces analyses montrent une diminution de la colocalisation entre le CI-MPR et le TGN dans les cellules exprimant NCOA7-AS (Figure 18. C). Ainsi, l'expression ectopique de NCOA7-AS semble mimer l'impact de la déplétion (par ARNi ou KO) des SNX1/2/5/6 en induisant la délocalisation du CI-MPR (Kvainickas *et al.* 2017; Simonetti *et al.* 2017). Cela permet d'émettre l'hypothèse que NCOA7-AS détourne la fonction des SNX1/2/5/6.

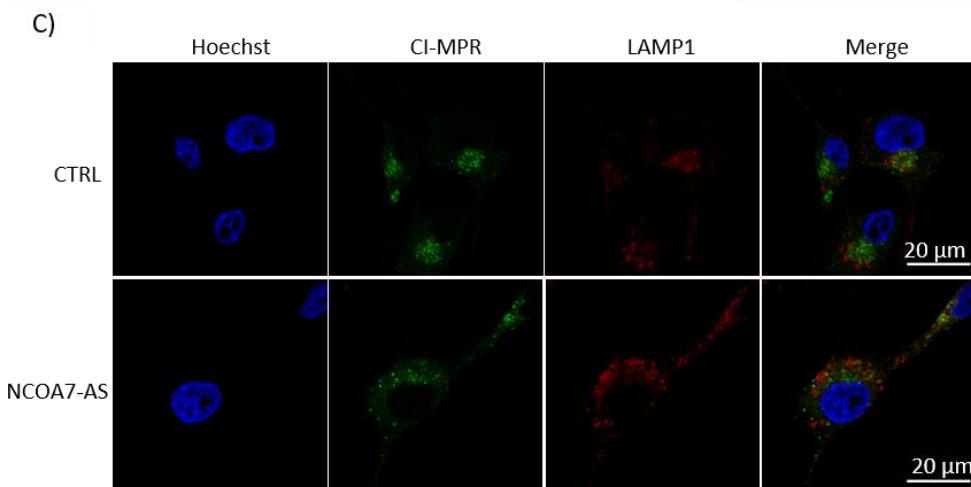
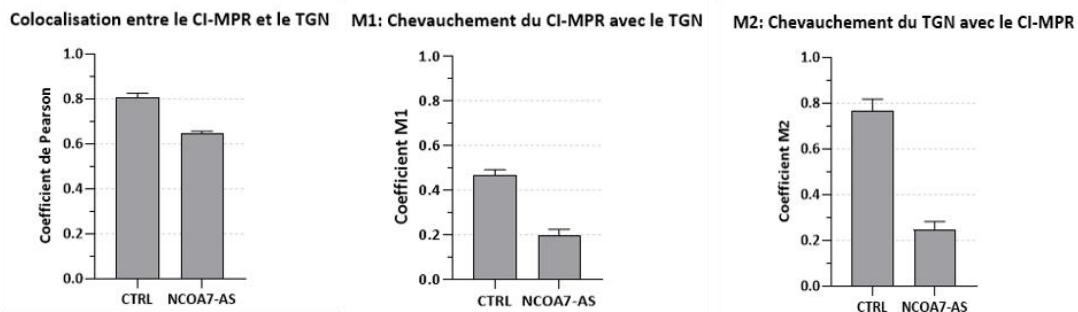
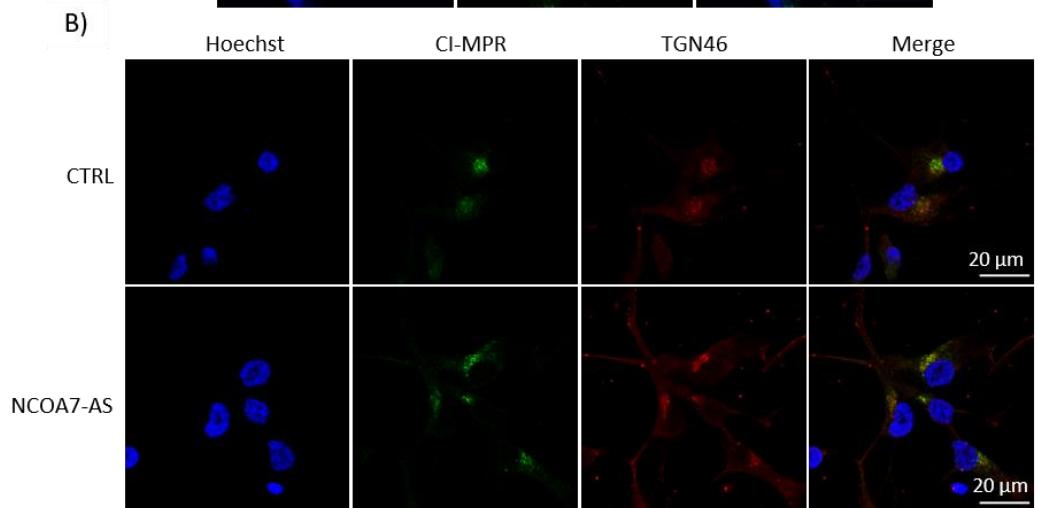
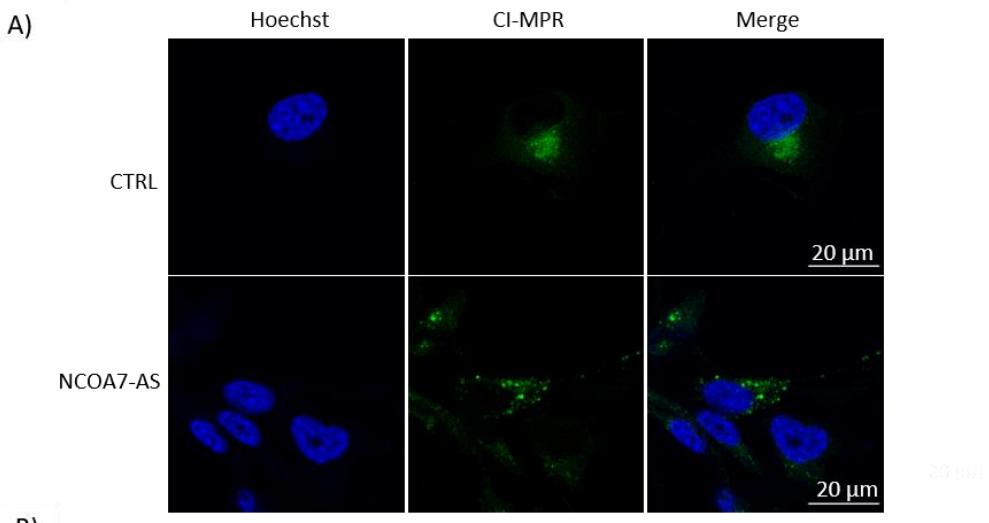


Figure 18 : Impact de l'expression de NCOA7-AS sur la localisation du CI-MPR.

Des cellules A549 exprimant NCOA7-AS ou un contrôle (Firefly) ont été ensemencées sur lamelles de verre et fixées à la PFA (Paraformaldéhyde) 2% puis marquées avec un anticorps anti- CI-MPR (en vert), anti-TGN46 (en rouge) (**B**) et un anti-Lamp1 (en rouge) (**C**). Les noyaux ont été marqués avec du DAPI **A), B) et C).** La colocalisation entre le CI-MPRL et le TGN a été analysée en calculant le coefficient de Pearson **B)**. Les coefficients M1 et M2 ont été calculés afin d'analyser la proximité du CI-MPR avec le TGN **B)**. Les images d'immunofluorescence ont été réalisées avec le microscope Zeiss LSM880 et le module Airyscan a été utilisé pour le marquage du CI-MPR seul.

Au vu de la redistribution du CI-MPR dans les cellules exprimant NCOA7-AS, nous avons ensuite étudié la colocalisation potentielle du CI-MPR avec Lamp1, un marqueur des lysosomes en présence ou non de NCOA7-AS. Nous n'avons pas observé une redistribution claire du CI-MPR vers les lysosomes en présence de NCOA7-AS. Il nous faudra répéter ces expériences avec des marqueurs des endosomes précoces et tardifs (Kvainickas *et al.* 2017; Simonetti *et al.* 2017). Cependant, nos résultats préliminaires confirment une perturbation de la fonction des SNX1/2/5/6 par l'expression ectopique de NCOA7-AS et nous avons donc décidé d'étudier l'importance de ces protéines dans l'activité antivirale de NCOA7-AS.

2) Impact de la déplétion des SNX d'intérêt sur l'activité antivirale de NCOA7-AS

Afin de tester l'importance des quatre SNX-BAR d'intérêt dans l'activité antivirale de NCOA7-AS, nous avons réalisé des expériences d'ARN interférence (ARNi). Pour ces expériences, des ARNi ciblant SNX1 et SNX2 ou bien SNX5 et SNX6 ont été utilisés en combinaison puisque ces SNX fonctionnent en hétérodimères, comme décrit précédemment (Simonetti *et al.*, 2017).

L'impact de la déplétion des SNX par ARNi dans les cellules NCOA7-AS et les cellules contrôles sur l'infection par un virus influenza A rapporteur exprimant la Nanoluciférase (IAV-NanoLuc) (Doyle *et al.* 2018a) a été analysée par mesure de l'activité NanoLuc (Figure 19. A et B). En parallèle, l'efficacité de la déplétion est analysée par western blot (Figure 19. C).

On constate dans les cellules contrôles E2-Crimson une diminution de l'efficacité d'infection par IAV-NanoLuc de près de 50% lorsque SNX1/2 sont déplétées, alors que la déplétion des SNX5/6 n'a pas d'effet sur l'infection (Figure 19. A). En ce qui concerne les cellules exprimant NCOA7-AS, le niveau d'infection après déplétion des SNX1/2 est le même que dans le contrôle

ARNi. Par contre, on aperçoit une restauration de l'infection d'environ 50% lorsque les SNX5/6 sont déplétées par rapport au siARN contrôlé (Figure 19. A et B). La différence dans le niveau d'inhibition par NCOA7-AS dans le cas des ARNi contrôle et SNX5/6 est significative (Figure 19. B) (elle l'est aussi dans le cas des SNX1/2 mais cela est dû au fait que l'efficacité d'infection dans la condition contrôle est diminuée, pas à une restauration réelle de l'infection en présence de NCOA7-AS). D'après ces résultats les SNX5 et SNX6 semblent particulièrement importantes pour la fonction de NCOA7-AS.

Le western blot montre, d'une part, que la déplétion par ARNi des quatre SNX d'intérêt est efficace et que, d'autre part, NCOA7-AS ne semble pas avoir d'impact sur le niveau d'expression des quatre SNX (Figure 19. C). Par contre, il est important de noter ici que la déplétion des SNX1/2 impacte fortement les SNX5/6 et vice-versa. Ceci peut être expliqué par le fait que les quatre protéines fonctionnent en complexe. Néanmoins, cette particularité rend la compréhension des résultats complexes puisque les quatre SNX sont impactées par la déplétion de deux d'entre elles, or seulement la déplétion de SNX5/6 restaure l'infection.

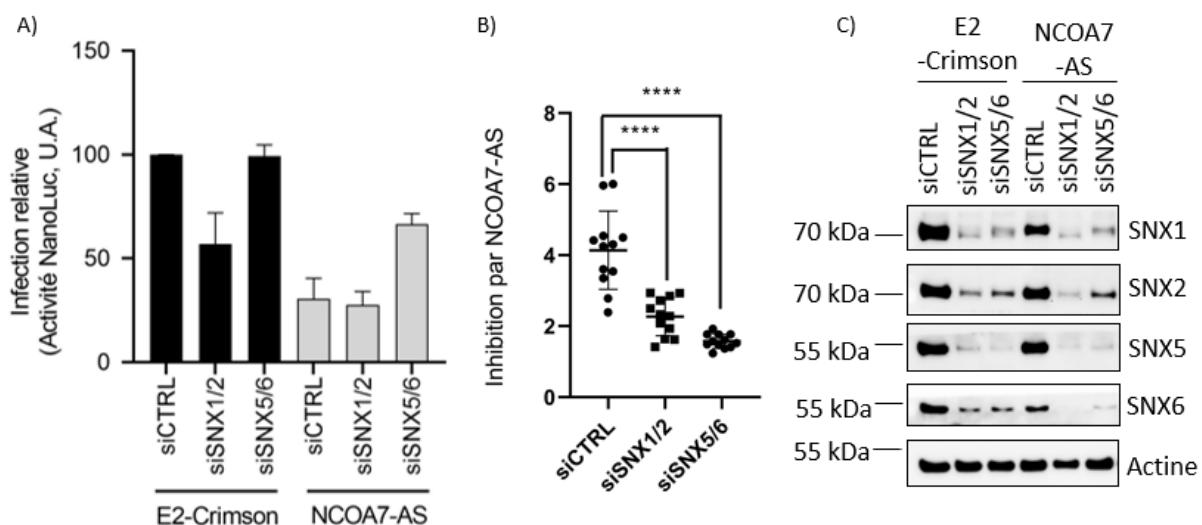


Figure 19 : Effet de la déplétion des SNX1/2 et SNX5/6 sur l'activité antivirale de NCOA7-AS.

Les ARNi ciblant SNX1/2 ou SNX5/6 sont transfectés en combinaison, ainsi qu'un ARNi irrelevant (ARNi contrôle), CTRL dans des cellules A549 exprimant de façon constitutive la luciférase Firefly et utilisée pour normaliser les petites variations de quantités de cellules dans les différentes conditions, et soit Flag-E2-Crimson (E2-Crimson) ou Flag-NCOA7-AS (NCOA7-AS). 72h après transfection des ARNi, les cellules sont infectées par IAV-NanoLuc ou bien lysées pour analyse par western blot. **A)** Les niveaux d'infection sont mesurés dans les cellules exprimant E2-Crimson et NCOA7-AS après 7h d'incubation avec $2,5 \cdot 10^4$ PFU/puits d'IAV-NanoLuc, grâce à la mesure du ratio des activités Nanoluciférase / Firefly dans les lysats cellulaires. Les résultats correspondent à la moyenne de 4 expériences indépendantes, chacune réalisées en dupliques ou triplicates techniques. **B)** Le niveau d'inhibition de l'infection par NCOA7-AS en comparaison du contrôle E2-Crimson a été calculé dans les cellules ARNi CTRL, SNX1/2

ou SNX5/6 et une analyse statistique a été réalisée (test de Mann-Whitney) à l'aide du logiciel GraphPad ; **** : p-value < 0,0001. **C)** Niveaux d'expression des protéines d'intérêt, SNX1, SNX2, SNX5, SNX6, analysés par western blot. L'actine est utilisée comme contrôle de charge.

3) Impact des SNX sur l'acidification endosomale

Nos travaux précédents (Doyle *et al.* 2018), ont montré que l'expression ectopique de NCOA7-AS augmente l'acidification des endolysosomes et nous avons émis l'hypothèse que c'est parce biais que NCOA7-AS inhibe l'entrée virale. Nous nous sommes donc demandé si les SNX d'intérêts ont un rôle sur l'augmentation de l'acidification des organelles induite par NCOA7-AS. Comme dans l'expérience précédente (Figure 19), nous avons utilisé des cellules exprimant soit E2-Crimson (contrôle) soit des cellules exprimant NCOA7-AS et nous avons déplété ces cellules de SNX1/2 ou SNX5/6. Les cellules ont ensuite été traitées avec du Lysotracker, un colorant vert fluorescent qui colore les compartiments acides dans les cellules vivantes.

Ces expériences employant le Lysotracker ont permis de confirmer simplement nos résultats publiés et obtenus avec d'autres réactifs : en effet, dans les cellules traitées avec un ARNi non relevant, nous observons l'importante augmentation de la moyenne de fluorescence (MFI) dans les cellules exprimant NCOA7-AS en comparaison avec les cellules exprimant E2-Crimson (cellules contrôles) (Figure 20). Cela confirme l'impact de NCOA7-AS sur l'acidification de la voie endolysosomale. Lorsque l'on déplete les SNX1/2 ou bien SNX5/6, l'effet de NCOA7-AS sur l'intensité de fluorescence semble moins important que dans la condition ARNi contrôle (si CTRL ; Figure 20), alors que l'impact est moindre dans les cellules contrôles exprimant E2-Crismon. Il est à noter ici que la déplétion de SNX1/2 a un effet plus drastique que celle de SNX5/6 sur l'acidité des organelles intracellulaires dans les cellules exprimant NCOA7-AS. Or, comme nous venons de le voir, les siSNX1/2 semblent moins impacter l'activité antivirale de NCOA7-AS que SNX5/6. On aurait pu s'attendre à ce que l'acidification des cellules ne changent pas or ici ce n'est pas le cas, l'acidification diminue de 50%. A ce stade nous pouvons émettre l'hypothèse que l'activité antivirale et l'acidification pourraient potentiellement être deux mécanismes dissociables.

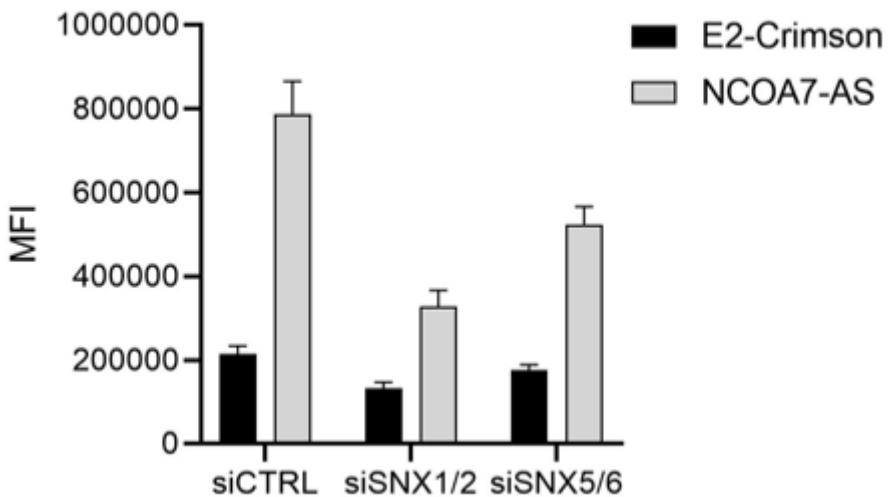


Figure 20 : Effet de la déplétion des SNX1/2 et SNX5/6 par ARNi sur l'acidification des organelles.

Les ARNi ciblant SNX1/2 ou SNX5/6 sont combinés et transfectés, ainsi qu'un ARNi irrelevant (ARNi contrôle, CTRL), dans des cellules A549 exprimant de façon stable la luciférase Firefly et soit Flag-E2-Crimson (E2) soit Flag-NCOA7-AS. 72h après transfection des ARNi, les cellules ont été traitées ou non avec du lysotracker green DND-26 à une concentration de 75 nM pendant 30 min à 37°C. L'intensité de fluorescence a été analysée avec un laser à 488 nm au cytomètre (Novocyte ACEA 1) (n=5).

III) Etude du rôle de l'autophagie dans l'activité antivirale de NCOA7-AS

1) Un Lien entre l'autophagie et NCOA7-AS ?

Comme décrit précédemment dans l'introduction (chapitre V.4.2), SNX5 est essentielle au fonctionnement de l'autophagie viro-induite. SNX5 interagit avec Beclin1 et PI3K classe III permettant la génération de PI3P dans ce contexte (Dong *et al.* 2021). De façon intéressante, nous savons que NCOA7-AS est aussi une protéine qui a un impact sur l'autophagie. En effet, dans l'équipe des expériences avaient été réalisées montrant que la surexpression de NCOA7-AS favorise l'accumulation de LC3-II et une augmentation du flux autophagique (résultats non montrés). Comme nous savons que SNX5 interagit avec Beclin1 (Don *et al.* 2021) et que nous avons démontré que NCOA7-AS interagit avec SNX5 nous nous sommes demandé dans un premier temps si NCOA7-AS pouvait interagir avec Beclin1 et nous avons utilisé d'anciens lysats de co-IP pour tester cette hypothèse (lysats de la Figure 17). Nous n'avons pas détecté Beclin1 dans les immunoprecipitats de Flag-SNX1 (Figure 21). Il serait judicieux ici de répéter cette expérience dans des cellules exprimant NCOA7-AS ou un contrôle mais ne surexprimant pas de SNX et surtout d'utiliser un protocole d'IP adapté pour Beclin1. Cependant, on constate

dans les lysats cellulaires que l'expression ectopique de NCOA7-AS semble favoriser l'expression de Beclin1 (Figure 21).

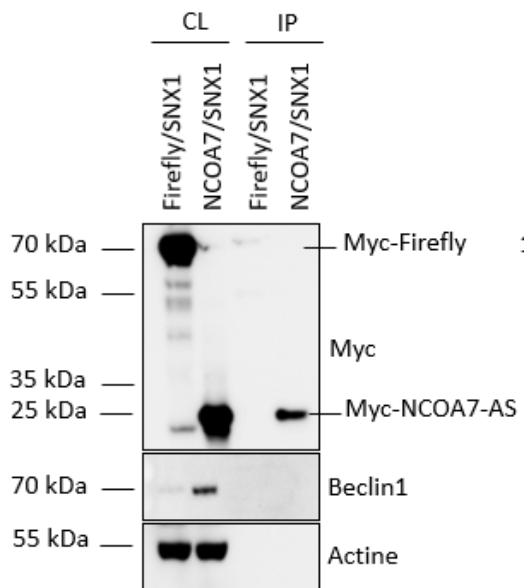


Figure 21 : NCOA7-AS favorise l'expression ou la stabilité de Beclin1 en présence de SNX1.

Des cellules U87-MG ont été co-transduites avec des vecteurs lentiviraux qui expriment Flag-SNX1, Myc-Firefly et Myc-NCOA7-AS. Les cellules ont été lysées et les protéines ont été immunoprécipitées en utilisant des billes magnétiques conjuguées à un anticorps anti-Flag avant d'être éluées avec un peptide triple Flag. Les protéines ont été analysées par western blot en utilisant un anti-Myc, anti-Beclin1 et un anti-actine comme contrôle de charge. CL : lysats cellulaires ; IP : immunoprécipitats.

2) Implication de Beclin1 dans l'activité antivirale de NCOA7-AS

NCOA7-AS semble favoriser l'expression et/ou la stabilité de Beclin1 (au moins en présence de la surexpression de SNX1 (Figure 22)). Par ailleurs, SNX5 est impliquée dans une forme particulière d'autophagie (l'autophagie viro-induite) et est capable d'interagir avec Beclin1 (Dong *et al.* 2021). Enfin SNX5/6 semblent importante pour la fonction antivirale de NCOA7-AS (Figure 22). Nous avons donc réalisé des expériences d'ARNi ciblant Beclin1 afin de déterminer si cette protéine pourrait être impliquée dans l'activité antivirale de NCOA7-AS.

Afin d'évaluer l'impact sur l'infection de la déplétion de Beclin1 (en comparaison d'un contrôle), des cellules NCOA7-AS et cellules contrôles (exprimant la Renilla), déplétées de Beclin1 ou non, ont été infectées par IAV-NanoLuc et l'infection est analysée comme précédemment (Figure 22. A et B). L'efficacité de la déplétion a été évaluée par western blot en utilisant un anticorps anti-Beclin (Figure 22. C).

On constate dans les cellules contrôles (qui expriment Renilla) une très légère augmentation de l'infection (d'un facteur 1,2 fois) lorsque Beclin1 est déplétée par rapport au ARNi contrôle (Figure 22. A). En ce qui concerne les cellules exprimant NCOA7-AS, la déplétion de Beclin1 semble entraîner une augmentation un peu plus importante du niveau d'infection (d'un facteur de 2,8 fois) (Figure 22. A et B).

La différence dans le niveau d'inhibition de l'infection par NCOA7-AS dans le cas des ARNi contrôle en comparaison de la déplétion de Beclin1 est significative (Figure 22. B). La déplétion de Beclin1 semble donc restaurer partiellement l'infection dans les cellules exprimant NCOA7-AS. Le western blot nous permet de vérifier l'efficacité de la déplétion de Beclin1 (Figure 22. C). On constate aussi que NCOA7-AS favorise l'expression de Beclin1 ce qui confirme nos précédents résultats (Figure 22. C). De plus NCOA7-AS semble favoriser l'augmentation et/ou l'accumulation de LC3-II mais la déplétion de SNX5/6 ou bien de Beclin1 réduit cet effet (Figure 23. C). Cette expérience serait à répéter en utilisant de la bafilomycine pour confirmer, comme observé précédemment par l'équipe, que l'accumulation de LC3-II en présence de NCOA7-AS correspond bien à une augmentation du flux autophagique.

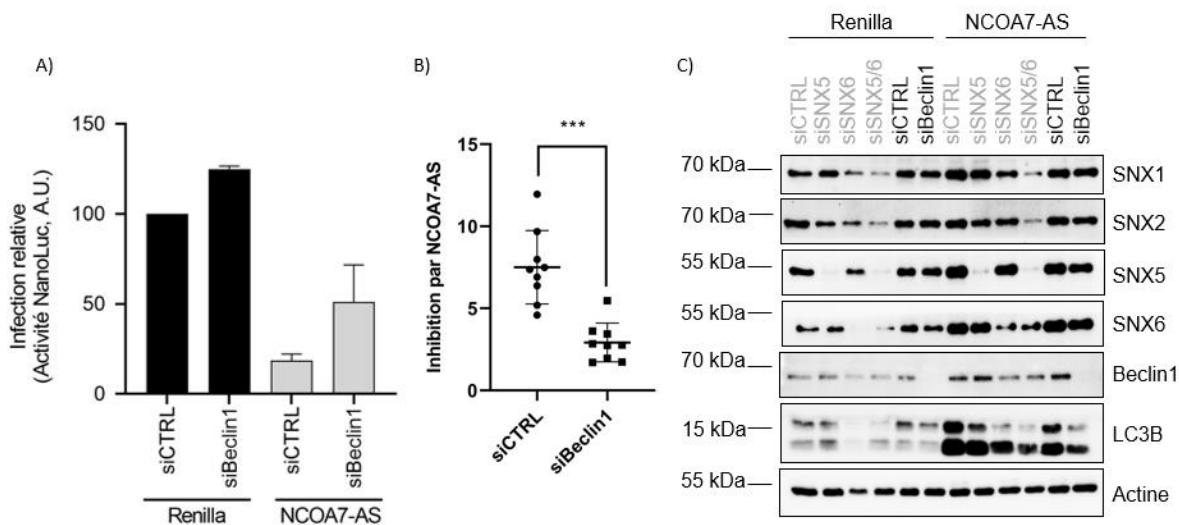


Figure 22 : Effet de la déplétion de Beclin1 sur l'activité antivirale de NCOA7-AS.

Les ARNi ciblant Beclin1 sont transfectés, ainsi qu'un ARNi irrelevant (ARNi contrôle, CTRL) dans des cellules A549 exprimant de façon stable la luciférase Firefly (contrôle interne) et soit Flag-Renilla (contrôle négatif) ou Flag-NCOA7-AS. 72h après transfection des ARNi, les cellules sont infectées ou bien lysées pour analyse par western blot. **A)** Les niveaux d'infection sont mesurés dans les cellules Renilla et NCOA7-AS après 7h d'incubation avec $2,5 \cdot 10^4$ PFU/puits d'IAV-NanoLuc. Les résultats correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes, chacune réalisées en dupliques ou tripliques techniques. **B)** Le niveau d'inhibition de l'infection par NCOA7-AS a été calculé dans les

cellules ARNi CTRL ou Beclin1 et une analyse statistique réalisée (test de Mann-Whitney) à l'aide du logiciel GraphPad ; *** : p-value < 0,0002. C) Niveaux d'expression de Beclin1, SNX1, SNX2, SNX5, SNX6, Beclin1 et LC3 sont analysés par western blot. L'actine est utilisée comme contrôle de charge. Un western blot représentatif de 4 expériences est présenté.

3) Impact des siSNX5/6 et siBeclin1 sur l'accumulation de LC3-II

Nous avons en parallèle effectué des analyses en immunofluorescence afin de confirmer l'impact de NCOA7-AS sur l'induction de LC3-II et l'impact de la déplétion des SNX5/6 sur ce phénotype observé en western blot.

Des cellules ont été transfectées avec un siCTRL ou des siSNX5/6 puis ensemencées sur des lamelles de verre. Des cellules ont été traitées ou non avec de la bafilomycine A1 (BafA1) pendant 1h avant de réaliser des marquages avec un anti-LC3B et du DAPI. La bafilomycine A1 est une molécule qui inhibe la V-ATPase (et donc l'acidification endolysosomale) et la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. La bafilomycine est utilisée ici pour bloquer l'étape de dégradation ce qui induit l'accumulation des autophagosomes qui ne peuvent plus être dégradés.

Dans un premier temps on constate l'efficacité du traitement de la bafilomycine sur les cellules contrôles. En effet on constate que LC3B est répartie de manière ponctuée, ce qui correspond à LC3-II, lorsque les cellules sont traitées à la bafilomycine (Figure 23). Ce qui n'est pas le cas dans les cellules non traitées où LC3B est présent de manière diffuse dans la cellule, correspondant à LC3-I. On constate, comme attendu d'après les données précédentes de l'équipe, une accumulation de structures ponctuées (punctas) de LC3B, correspondant à LC3-II (Klionsky et Codogno 2013) en présence de NCOA7-AS (Figure 23). En effet, nous pouvons facilement observer la différence de pattern entre les cellules contrôles et les cellules qui expriment NCOA7-AS. LC3B semble principalement diffus dans la condition contrôle, ce qui correspond donc à LC3-I, tandis que l'on peut observer des punctas en présence de NCOA7-AS (ce qui correspond à LC3-II). Lorsque les SNX5/6 sont déplétées, on observe une diminution de l'accumulation de LC3-II dans les cellules qui expriment NCOA7-AS (Figure 23). Ces résultats corrèlent avec ce que nous avions observé sur le western blot malgré l'absence de bafilomycine (Figure 22. C).

En parallèle, nous avons réalisé la même expérience dans des cellules déplétées pour Beclin1. Comme précédemment nous observons une accumulation de LC3-II en présence de NCOA7-AS dans la condition contrôle (Figure 24). Mais cette accumulation de LC3-II diminue lorsque Beclin1 est déplétée, ce qui était attendu puisque que Beclin1 est une protéine régulatrice de l'autophagie.

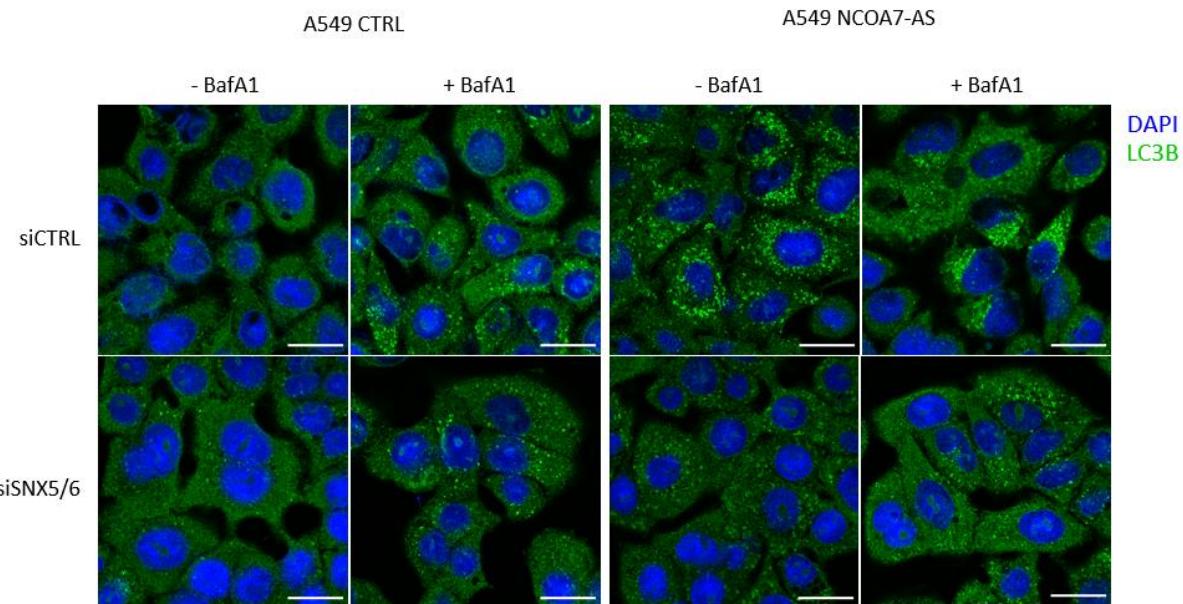


Figure 23 : Effet de la déplétion de SNX5 et SNX6 sur l'autophagie dans des cellules exprimant de façon ectopique Renilla ou NCOA7-AS.

Les ARNi ciblant SNX5/6 sont transfectés, ainsi qu'un ARNi irrelevant (ARNi contrôle, CTRL) dans des cellules A549 exprimant de façon stable la luciférase Firefly et soit Flag-Renilla ou Flag-NCOA7-AS. 72h après transfection des ARNi, les cellules ont été ensemencées sur lamelles de verre et traitées avec du DMSO ou avec de la bafilomycine A1 (BafA1) pendant 1h. Les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-LC3 et un anticorps secondaire AlexaFluor488. Le noyau est marqué avec du DAPI. Les images d'immunofluorescence ont été réalisées par microscopie confocale au ZeissLSM880. Images représentatives d'une expérience (Echelle : 20 µm).

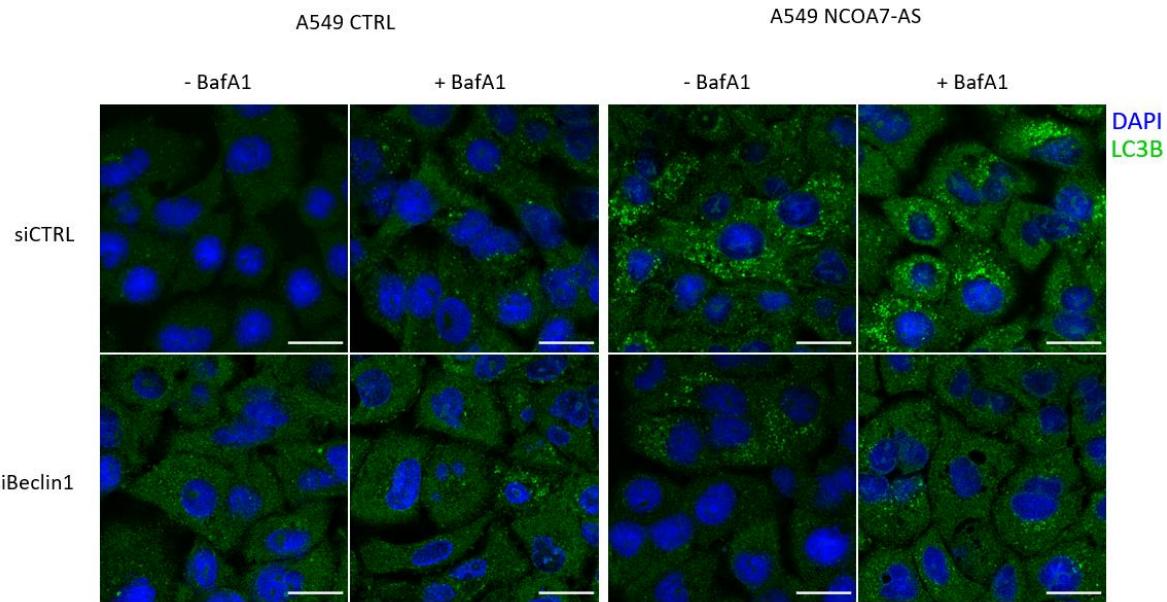


Figure 24 : Effet de la déplétion de Beclin1 sur l'autophagie dans des cellules exprimant de façon ectopique Renilla ou NCOA7-AS.

Un ARNi ciblant Beclin1 a été transfecté, ainsi qu'un ARNi irrelevant (ARNi contrôle, CTRL) dans des cellules A549 exprimant de façon stable la luciférase Firefly et soit Flag-Renilla ou Flag-NCOA7-AS. 72h après transfection des ARNi, les cellules ont été ensemencées sur lamelles de verre et traitées avec du DMSO ou avec de la bafilomycine A1 (BafA1) pendant 1h. Les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-LC3 et un anticorps secondaire AlexaFluor488. Le noyau est marqué avec du DAPI. Les images d'immunofluorescence ont été réalisées par microscopie confocale au ZeissLSM880. Images représentatives d'une expérience (Echelle : 20 µm).

4) Importance de l'autophagie dans l'activité antivirale de NCOA7-AS

Nous savons que Beclin1 interagit avec SNX5 (Dong *et al.* 2021) et qu'elle pourrait jouer un rôle, direct ou indirect dans l'activité antivirale de NCOA7-AS (Figure 22). Nous nous sommes donc demandé si l'autophagie est importante pour la fonction antivirale de NCOA7-AS. Nous avons testé cette hypothèse en inhibant le complexe PI3K classe III qui est essentiel à la génération de PI3P. Pour cela nous avons utilisé une molécule appelée PIK-III qui est un inhibiteur enzymatique de PI3K classe III. L'impact sur l'infection par IAV-NanoLuc de la molécule PIK-III est analysé par mesure de l'activité luciférase.

On constate une inhibition de l'infection (d'un facteur 3 fois) dans les cellules exprimant NCOA7-AS dans la condition contrôle (Figure 25). On constate que l'inhibition de PI3K classe III n'a pas ou peu d'effet sur les cellules contrôles qui expriment la Renilla (Figure 25). Par contre on voit que l'inhibition de PI3K classe III restaure partiellement l'infection dans les

cellules NCOA7-AS (Figure 25). Il semble donc que l'autophagie soit importante dans l'activité antivirale de NCOA7-AS. A noter que cette expérience n'a été réalisé qu'une seule fois, elle sera donc à répéter.

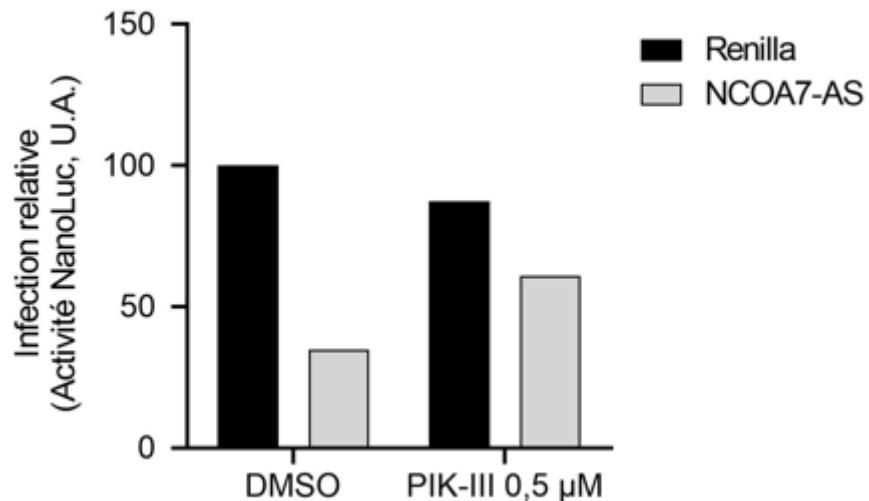


Figure 25 : Effet de la déplétion du complexe PI3K classe III sur l'activité antivirale de NCOA7-AS.
Des cellules A549 qui expriment stablement la Firefly (contrôle interne) ou soit Flag-Renilla soit Flag-NCOA7-AS ont été générées, puis prétraitées avec la molécule (un inhibiteur du complexe PI3K classe III) à une concentration de 0,5 μM pendant 1h à 37°C ou non (traitement DMSO pour le contrôle négatif). Puis les cellules ont été incubées pendant 1h avec 2,5.10⁴ PFU/puits d'IAV-NanoLuc et le milieu renouvelé avec 0,5 μM de PIK-III ou DMSO. Les niveaux d'infection ont été évalués par mesure du ratio des activités Nanoluciférase / Firefly dans les lysats (n=1).

5) Impact des SNX et Beclin1 sur l'effet antiviral de l'IFN

Nous savons que les protéines SNX5/6 et Beclin1 ont un impact sur l'activité antivirale de NCOA7-AS, lequel est l'un des acteurs de l'inhibition d'IAV induite par l'IFN (Doyle *et al.* 2018). Nous avons donc voulu tester le rôle des SNX5/6 et de Beclin1 dans l'activité antivirale de l'IFN. Pour cela des ARNi ciblant SNX1 et SNX2 ou bien SNX5 et SNX6 ont été utilisés en combinaison comme précédemment, ainsi qu'un ARNi ciblant Beclin1 et trois ARNi différents ciblant NCOA7-AS. Les cellules ont ensuite été incubées avec de l'IFN pour induire l'état antivirale. L'impact sur l'infection par IAV-NanoLuc des différents ARNi SNX dans les cellules traitées ou non à l'IFN a été évalué, comme précédemment (Figure 26. A). En parallèle, l'efficacité de la déplétion des protéines d'intérêt a été analysée par western blot (Figure 26.

B). Il n'existe pas d'anticorps contre NCOA7-AS donc l'efficacité de la déplétion par les ARNi est quantifiée dans ce cas par RT-qPCR. (Figure 26. C).

Dans un premier temps on constate que l'IFN a un effet inhibiteur sur l'infection dans la condition contrôle (Figure 26. A). Cependant cet effet est moindre par rapport à ce qui était attendu (1-2 logs d'inhibition de l'infection par l'IFN sont observés classiquement). De même, l'induction de NCOA7-AS par l'IFN est moins importante que ce que l'on observe classiquement (Figure 26. C, voir Doyle *et al.* 2018). Ces expériences sont donc à interpréter avec prudence. On constate que la déplétion de NCOA7-AS restaure les niveaux d'infections pour le ARNi 1 et 3 comme attendu d'après nos résultats obtenus en KO (Figure 26. A) (Doyle *et al.* 2018). Mais nous n'observons pas cela avec l'ARNi 2, sans doute car le niveau de déplétion est moins efficace d'après la RT-qPCR (Figure 26. C). De façon intéressante, nous constatons que l'IFN n'a plus d'impact sur l'infection lorsque les SNX1/2 ou SNX5/6 sont déplétées (Figure 26. A), par contre Beclin1 a un effet mineur (Figure 26. A). Nous voyons sur le western blot que la déplétion des SNX1/2 et SNX5/6 est efficace et que la déplétion de SNX1/2 diminue un peu l'expression de Beclin1 (Figure 26. B). De même, la déplétion de Beclin1 est efficace. Enfin, nous n'observons pas d'effet de l'IFN sur l'accumulation de LC3-II (il est à noter que nous n'avons pas utiliser de bafilomycine dans cette expérience).

Comme, de façon très surprenante, la déplétion des SNX1/2 ou des SNX5/6 restaure complètement l'infection, nous nous sommes demandés si les cellules étaient toujours bien capables de répondre à l'IFN via l'induction d'ISG dans ce contexte. Pour le vérifier nous avons regardé l'expression de certains ISG prototypes par western blot (Figure 26. B). On constate que MX1 et IFITM3 sont bien induits en présence d'IFN (Figure 26. B). De façon surprenante nous constatons une diminution partielle et totale de l'induction de MX1 et de IFITM3 dans les cellules déplétées de SNX1/2 (Figure 26. B). Par contre, la déplétion de SNX5/6 n'a aucun impact sur ces protéines qui sont bien induites en présence d'IFN (Figure 26. B).

Enfin, nous avons également vérifié l'expression de IFNAR1, une des deux sous-unités du récepteur de l'IFN de type I dans ces cellules et celle-ci ne semble pas impactée (Figure 26. B).

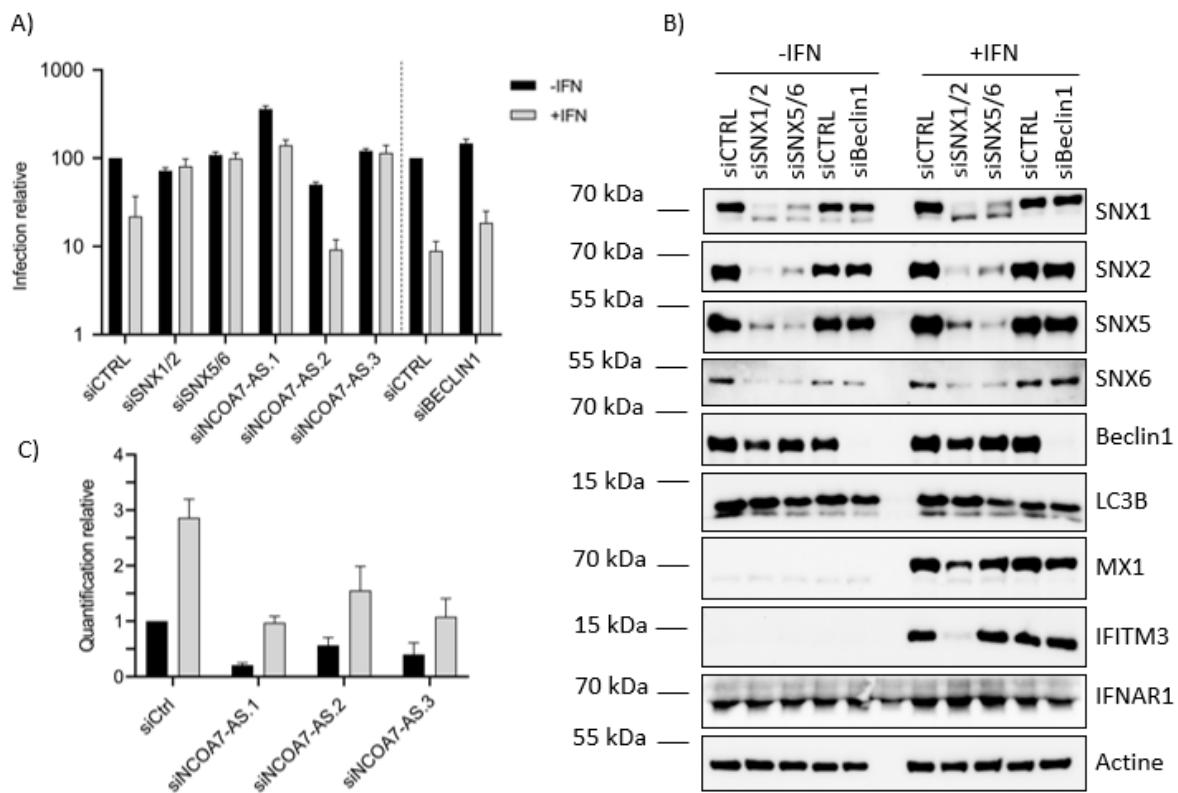


Figure 26 : Effet de la déplétion des SNX1/2, SNX5/6, NCOA7-AS et Beclin1 par ARNi sur l'activité antivirale de NCOA7-AS.

Les ARNi ciblant SNX1/2, SNX5/6 sont transfectées en combinaison et trois ARNi différents ont été utilisés pour cibler NCOA7-AS (siNCOA7-AS.1, siNCOA7-AS.2 et siNCOA7-AS.3). Les ARNi sont transfectés, ainsi qu'un ARNi irrelevant (ARNi contrôle, CTRL), dans des cellules A549 exprimant de façon stable la luciférase Firefly. 48h après transfection, les cellules sont traitées ou non avec de l'IFN à 2000 U/ml pendant 24h puis les cellules sont infectées ou bien lysées pour analyse par western blot. **A)** Les niveaux d'infection sont mesurés dans les cellules après 7h d'incubation avec $2,5 \cdot 10^4$ PFU/puits d'IAV-NanoLuc. Les résultats correspondent à la moyenne de 3, 2 ou 4 expériences indépendantes pour les siSNX, siNCOA7-AS et siBeclin1 respectivement, chacune réalisée en dupliques ou tripliques techniques. **B)** Niveaux d'expression des protéines d'intérêt, SNX1, SNX2, SNX5, SNX6, Beclin1, LC3B, MX1, IFITM3 et IFNAR1 sont analysés par western blot. L'actine est utilisée comme contrôle de charge. Un western blot représentatif de 4 expériences est présenté **C)** La quantification de l'efficacité de la déplétion de NCOA7-AS déterminée par RT-qPCR ($n=4$).

Discussion et perspectives

L'objectif de mon projet était de comprendre le mode d'action de la protéine antivirale NCOA7-AS. Les précédents travaux menés par l'équipe nous ont permis de découvrir que la protéine NCOA7-AS, induite par l'interféron, interagit avec la V-ATPase et stimule l'acidification des vésicules et l'activité des protéases lysosomales. Ces perturbations entraînent l'inhibition de l'infection des virus entrant par endocytose en bloquant la fusion entre les membranes virales et endosomales (Doyle *et al.* 2018 – Annexe 1).

Afin de comprendre comment NCOA7-AS agi au niveau moléculaire, nous avons entrepris de chercher ses partenaires protéiques par spectrométrie de masse. Nous avons identifié quatre protéines de la famille des Sorting Nexins (SNX) : SNX1, SNX2, SNX5 et SNX6. Deux études avaient montré que la déplétion des SNX1/2 ou bien SNX5/6 entraîne une délocalisation du CI-MPR du TGN vers les endosomes précoce et tardifs et donc une perturbation de son transport rétrograde (Kvainickas *et al.* 2017; Simonetti *et al.* 2017). Il a été établi que des hétérodimères composés SNX1 ou 2 avec SNX5 ou 6 assurent le transport rétrograde du CI-MPR des endosomes vers le TGN grâce à une interaction directe entre ce dernier et le domaine PX de SNX5 (Simonetti *et al.* 2019) (et probablement de SNX6 puisqu'elle peut jouer le même rôle, mais cela n'a pas encore été démontré).

Dans un premier temps, nous avons émis l'hypothèse que NCOA7-AS pouvait peut-être usurper et/ou perturber la fonction de ces SNX et donc impacter la localisation de leur cargo CI-MPR, hypothèse que nous avons vérifiée en immunofluorescence et microscopie. En effet, la surexpression de NCOA7-AS favorise la délocalisation du CI-MPR dans ce qui semble être des structures vésiculaires. Nous n'avons pas observé de redistribution claire du CI-MPR dans les endosomes. Il nous faudra cependant, tester s'il y a une colocalisation du CI-MPR avec des marqueurs endosomaux, comme attendu d'après la littérature (Kvainickas *et al.* 2017; Simonetti *et al.* 2017).

Nous avons alors cherché à étudier en profondeur les interactions entre NCOA7-AS et les SNX. Par analogie avec les résultats de Simonetti et ses collaborateurs, nous nous sommes d'abord concentrés sur l'interaction entre NCOA7-AS et la SNX5. Des études de biochimie structurale ont alors été menées par Mary Arnaud-Arnould dans l'équipe et notre collaborateur structuraliste Mickael Blaise. La protéine NCOA7-AS est très difficile à produire et purifier en

grandes quantités (nous n'avons pour l'instant réussi à obtenir de grandes quantités pures que de son domaine TLDc (Arnaud-Arnould *et al.* 2021)). Cependant, la prédiction de la structure de sa région N-terminale pouvait laisser supposer un agencement avec deux feuillets β comparable au domaine du CI-MPR interagissant avec le domaine PX de SNX5. En se basant sur la stratégie décrite dans la littérature qui a permis de résoudre la structure du complexe CI-MPR-PX-SNX5 (Simonetti *et al.* 2019), Mary Arnaud-Arnould a exprimé chez *E.coli* une protéine chimérique contenant le domaine PX de la SNX5 (acides aminés 25 à 172 de la protéine entière) fusionné à la partie N-terminale de NCOA7-AS (acides aminés 5 à 36 de la protéine entière) (Figure 27). Cette protéine chimérique s'étant révélée bien exprimée et soluble, elle a pu aisément être cristallisée. Mickael Blaise a donc réussi à obtenir la structure tridimensionnelle d'un complexe composé du domaine N-terminale de NCOA7-AS et du domaine PX de SNX5 (Figure 27). La structure obtenue est dimérique avec la partie N-terminale de NCOA7-AS d'un premier monomère interagissant avec le domaine PX de SNX5 d'un deuxième monomère et inversement. L'interaction entre NCOA7-AS et le domaine PX de SNX5 semble de plus dépendre de la Phe113 de la chimère (qui correspond à la Phe136 de SNX5 entière), comme ce qui est décrit pour l'interaction avec le CI-MPR.

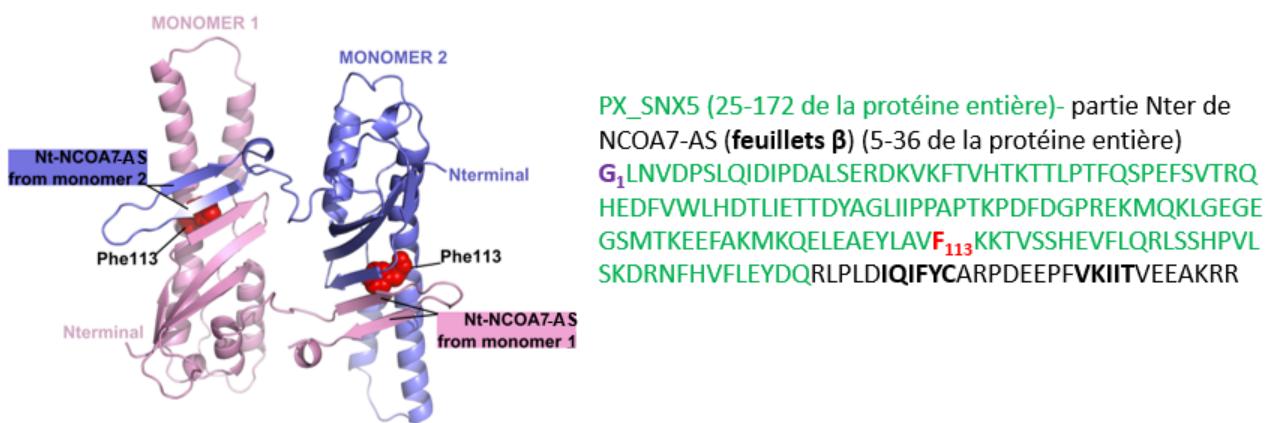


Figure 27 : Structure tridimensionnelle de la protéine chimérique Nter-NCOA7-AS/PX-SNX5 obtenue après diffraction aux rayons X.

La protéine chimérique a été obtenue en fusionnant les acides aminés 25 à 172 de SNX5 avec les acides aminés 5 à 36 de NCOA7-AS. La protéine chimérique forme un dimère. Les deux feuillets β de NCOA7-AS d'un monomère interagi avec le résidu Phe113 de SNX5 du deuxième monomère.

Afin de continuer à caractériser l'interaction entre NCOA7-AS et SNX5, des expériences de glutathion S-transférase (GST)-pull down ont été réalisées par Mary Arnould avec des protéines recombinantes purifiées. Les protéines purifiées suivantes ont été utilisées : GST-

NCOA7-AS « entière », GST-Nter-NCOA7-AS (fusion ne contenant que le domaine N-terminal de NCOA7-AS précédemment utilisé pour obtenir la structure des complexes) ou GST-TLDc-NCOA7-AS (fusion ne contenant que le domaine TLDc de NCOA7-AS), et le domaine PX de SNX5 sauvage ou muté F113A en fusion avec la Maltose Binding Protein (MBP)-PX-SNX5 ou MBP-PX-SNX5-F113A. Les résultats de ces GST-pull down montrent que l’interaction entre la partie N-terminale de NCOA7-AS et le domaine PX de SNX5 est bien directe (Figure 28), comme le laissait présager l’obtention des cristaux obtenus avec la fusion artificielle présentée plus haut. On constate que lorsque le résidu Phe113 est substitué par une alanine (F113A) on perd l’interaction entre le domaine N-terminal de NCOA7-AS et le domaine PX de SNX5, ce qui confirme le fait que la Phe113 est bien le résidu clé de l’interaction entre ces deux protéines (Figure 28).

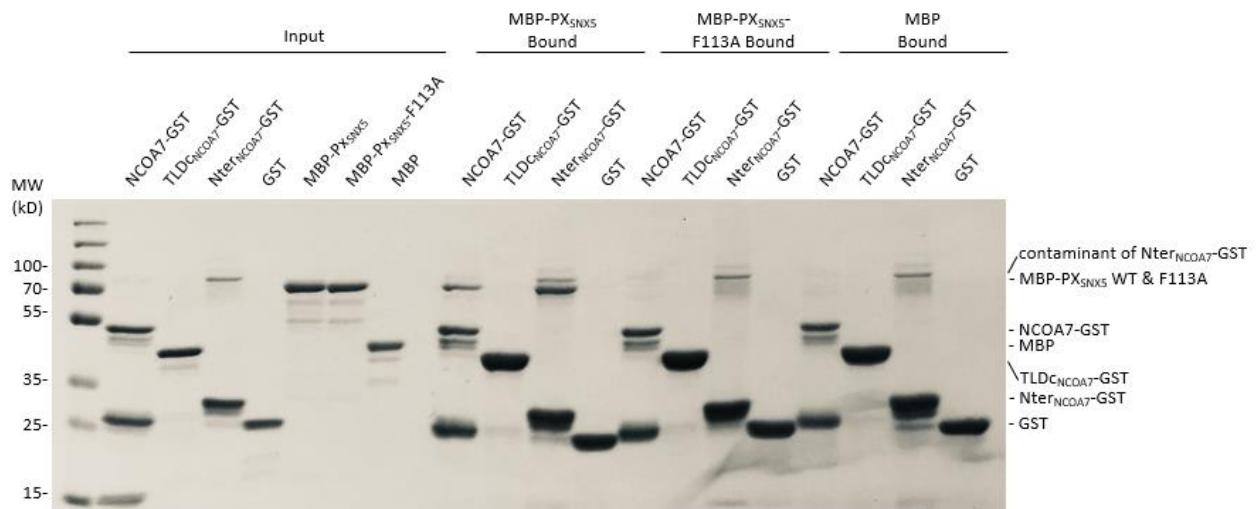


Figure 28 : Des expériences de GST-pull down montrent une interaction directe médiée par le domaine N-terminal de NCOA7-AS et la Phénylalanine 136 du domaine PX de SNX5.

Différentes protéines de fusion GST et MBP ont été utilisées : la partie TLDc de NCOA7-AS, la partie N-terminale de NCOA7-AS et la protéine entière NCOA7-AS pour les fusions GST, le domaine PX de SNX5 et le mutant du domaine PX de SNX5 F113A pour les fusions MBP. Les protéines GST sont couplées à des billes glutathion puis incubées avec des protéines MBP. Après lavage, les protéines associées aux billes sont éluées et analysées sur gel SDS-PAGE (coloration au Coomassie).

De façon intéressante, le CI-MPR et NCOA7-AS semblent donc interagir de la même manière avec le domaine PX de SNX5 via la Phe113. De plus le CI-MPR et NCOA7-AS ont des caractéristiques similaires puisque ces deux protéines interagissent avec SNX5 via leurs deux feuillets β . La délocalisation du CI-MPR lorsque les SNX sont déplétées pourrait s’expliquer par le fait que comme les SNX ne sont plus présentes, le CI-MPR ne peut plus se lier au domaine

PX de SNX5 (Figure 29. A et B). La délocalisation du CI-MPR lorsque les cellules surexpriment NCOA7-AS pourrait s'expliquer par le fait que puisque NCOA7-AS est présent, il pourrait il y avoir une compétition entre NCOA7-AS et le CI-MPR pour se lier à SNX5. NCOA7-AS en se liant à SNX5 empêcherait l'interaction de cette dernière avec le CI-MPR, qui ne pourrait plus être recyclé vers le TGN et NCOA7-AS perturberait la fonction des SNX (Figure 29. C). Dans ce contexte, il est possible que l'interaction entre NCOA7-AS et SNX5 puisse avoir des conséquences sur la relocalisation de SNX5. Il serait intéressant de visualiser cela par immunofluorescence (IF) mais nous n'avons actuellement pas d'anticorps anti-SNX5 qui fonctionne en IF. Nous développons donc actuellement des fusions des protéines SNX avec la GFP afin de réaliser de la microscopie en temps réel. Les protéines SEMA4C et IGF1R sont aussi capables de se fixer à SNX5 de la même manière que le CI-MPR (Simonetti *et al.* 2019). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'expression de NCOA7-AS entraîne également une relocalisation de ces protéines dans des cellules.

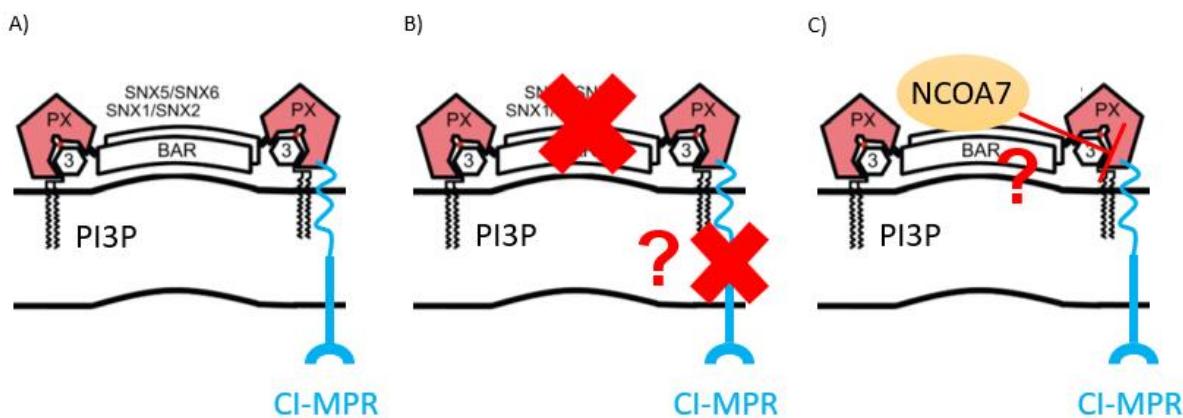


Figure 29 : Modèle du rôle des SNX et de NCOA7-AS.

A) Si des cellules sont déplétées des SNX, le CI-MPR ne peut plus se lier au domaine PX de SNX5 et ne peut pas être recyclé au TGN (Kvainickas *et al.* 2017; Simonetti *et al.* 2017). **B)** En présence de NCOA7-AS, le CI-MPR et NCOA7-AS pourraient entrer en compétition puisqu'ils possèdent le même site de fixation au domaine PX de SNX5. NCOA7-AS se lierait préférentiellement à SNX5 induisant ainsi la délocalisation du CI-MPR.

Il serait vraiment intéressant pour la suite de savoir quel est le ou les résidu(s) des deux feuillets β de la partie N-terminale de NCOA7-AS qui se lie(nt) au résidu Phe113 de SNX5. Dans ce but, nous avons déjà généré des mutants de la partie N-terminale de NCOA7-AS (mutant du motif DIQF ; délétion complète de la région N-terminale, Δ N-ter) pour voir si cela impactait son activité antivirale, mais ces mutants étaient malheureusement beaucoup plus exprimés

que NCOA7-AS sauvage et extrêmement toxiques pour les cultures de cellules humaines, rendant impossible toute conclusion. De nouveaux mutants pourraient être générés. De plus, ces analyses pourront potentiellement être réalisées *in vitro* (selon le protocole utilisé pour l'expérience présentée en figure 28).

De façon intéressante, nous avons observé que la déplétion des SNX5/6 restaure partiellement l'infection par le virus influenza A en présence de NCOA7-AS, suggérant que ces protéines sont nécessaires pour son activité antivirale. Par contre la déplétion de SNX1/2 n'a pas réellement d'impact sur l'activité antivirale de NCOA7-AS : elle entraîne une diminution de l'infection dans les cellules contrôles, rendant difficile l'interprétation des résultats en présence de NCOA7-AS.

Il est à noter ici que lorsque l'on déplete une de nos quatre SNX d'intérêt, toutes les autres SNX sont également déplétées. Cela est sûrement dû au fait que les SNX fonctionnent en complexe et se stabilisent mutuellement. Mais cela n'explique pas comment il peut il y avoir une différence de phénotype dans l'activité antivirale entre les expériences de siSNX1/2 et siSNX5/6 si finalement toutes les SNX sont déplétées dans toutes les conditions. Ici, il sera essentiel de faire des expériences de complémentation avec des séquences optimisées non ciblées par les ARNi et/ou des KO (une autre méthode de déplétion des SNX) pour être sûr de l'absence d'effet off-target. Si on confirme l'absence d'effet off-target, nous pourrons alors émettre l'hypothèse que ces quatre SNX puissent avoir des rôles indépendants des unes des autres. On pourrait imaginer qu'il existe une petite portion de SNX (par exemple de SNX5) qui n'est pas en complexe avec les autres SNX et qui ne serait donc pas régulé par la déplétion des SNX1/2. Le fait que cette portion de SNX soit minoritaire dans la cellule la rendrait non visible lors des analyses globales en western blot.

Nous savions que NCOA7-AS interagit avec des sous-unités de la V-ATPase (Doyle *et al.* 2018). Nous avons observé que NCOA7-AS pourrait favoriser l'interaction de SNX1 avec des sous-unités de la V-ATPase : ATP6V1A, ATP6V1B2 et ATP6V1E1. C'est un résultat potentiellement important qui, s'il est confirmé, nous permettrait de mettre en évidence un lien entre NCOA7-AS, les SNX et la V-ATPase. On peut se demander si le fait que la V-ATPase interagisse avec SNX1 quand NCOA7-AS est présent est significatif de la création d'un complexe fonctionnel, par exemple si les SNX régulent la V-ATPase. De même, est ce que les SNX jouent un rôle dans la régulation de l'activité de la V-ATPase observée avec l'expression de NCOA7-AS (c'est à dire

l'acidification de la voie endolysosomale) ? Une autre question importante est : est-ce que les SNX sont importantes pour l'interaction de NCOA7-AS avec la V-ATPase ? La déplétion des SNX peut-elle impacter l'expression, l'activité ou l'assemblage de la V-ATPase ou bien impacter l'interaction de NCOA7-AS avec la V-ATPase ? Pour répondre à ces questions, nous pouvons prévoir de réaliser des expériences de fractionnement cytoplasme/membrane. Nous pourrions faire des immunoprécipitations de NCOA7-AS dans des cellules délestées des SNX. A noter que ce résultat n'a été observé qu'une seule fois. Il serait alors important de répéter cette expérience pour confirmer ces interactions. Il serait aussi très intéressant de faire ces expériences avec la SNX5 comme nous savons qu'elle interagit avec la partie N-terminale de NCOA7-AS.

Les travaux précédant de l'équipe avaient montré que, l'expression ectopique de NCOA7-AS augmente l'acidification de la voie endolysosomale (Doyle *et al.* 2018) et nous avions supposé qu'une trop forte acidification (ou une acidification trop rapide) était à l'origine de la diminution de la capacité des virus à entrer dans la cellule hôte. Nous nous sommes donc demandés si les SNX sont importantes pour l'impact de NCOA7-AS sur l'acidification des organelles. Ainsi nous avons remarqué que la déplétion des SNX1/2 diminuait l'impact de NCOA7-AS sur l'acidité des vésicules intracellulaires, alors que la déplétion de ces SNX ne semble pas réellement contrecarrer l'activité antivirale de NCOA7-AS. On observe la même tendance avec la déplétion des SNX5/6 sur l'acidité des organelles intracellulaires mais de façon plus modérée, or la déplétion de ces derniers permet de restaurer partiellement l'infection. Il est important de se rendre compte que cette mesure de l'acidité des organelles est une mesure globale du pH de toutes les vésicules intracellulaires. Cela pourrait potentiellement masquer des effets locaux et il faudrait trouver une façon plus fine de mesurer le pH, seulement dans les compartiments qui nous intéressent comme les endolysosomes. Mais nos résultats différents entre les SNX1/2 et SNX5/6 pourraient potentiellement suggérer que l'activité antivirale de NCOA7-AS et l'acidification soient des mécanismes finalement dissociables. En tous cas, la restauration d'un niveau de pH normal (en moyenne) des organelles intracellulaires ne suffit pas à contrecarrer l'effet de NCOA7-AS.

SNX5 semble être une protéine clé dans la compréhension du mécanisme d'action de NCOA7-AS. De façon intéressante, SNX5 a récemment été impliquée dans le processus d'autophagie viro-induite (Dong *et al.* 2021). SNX5 est essentielle à l'induction de l'autophagie lors de

l'infection par le virus influenza A (et d'autres virus). SNX5 active l'autophagie en interagissant avec la protéine Beclin1 et le complexe PI3K classe III. Nous avons donc fait des expériences de déplétion de Beclin1 afin de voir son impact sur l'activité antivirale de NCOA7-AS. Nous avons constaté que la déplétion de Beclin1 restaure partiellement l'infection en présence de NCOA7-AS, et ce, de manière significative. L'autophagie et plus spécifiquement Beclin1 semblent donc jouer un rôle dans l'activité antivirale de NCOA7-AS. Pour ces expériences de déplétion de Beclin1 nous avons utilisé un pool d'ARNi validé de chez Dharmacon (limitant la possibilité d'effets off-target), mais il sera nécessaire de faire des expériences de complémentation avec une séquence optimisée non ciblée par les ARNi pour s'assurer réellement de l'absence d'effet off-target.

Comme SNX5 intéragit avec Beclin1 (Dong *et al.* 2021) et que NCOA7-AS intéragit avec SNX5 nous avons cherché une potentielle interaction entre NCOA7-AS et Beclin1. Nous n'avons pas observé d'interaction sur les anciens lysats d'immunoprécipitation que nous avions conservé, mais cela ne signifie pas qu'elle n'existe pas. Nous devons utiliser un protocole adapté décrit dans la littérature et connu pour fonctionner pour l'immunoprécipitation de Beclin1 (Dong *et al.* 2021). Nous pourrions aussi exprimer de façon ectopique Beclin1 afin de réaliser des immunoprécipitations et voir si lorsque l'on immunoprécipite Beclin1, nous retrouvons une interaction avec les SNX notamment avec SNX5 et avec NCOA7-AS. Nous avons remarqué de façon intéressante sur ces anciennes co-immunoprécipitations que NCOA7-AS favorise l'expression de Beclin1 en présence de SNX1 et SNX5. On suppose donc qu'il y a un lien entre NCOA7-AS et Beclin1 qui reste à explorer.

Des expériences d'immunofluorescence ont révélé que l'expression ectopique de NCOA7-AS induit l'accumulation de LC3-II, mais ceci n'est pas observé en absence des SNX5/6. Par ailleurs, ces SNX (ou au moins SNX5) seraient nécessaire à l'induction de l'autophagie par NCOA7-AS comme observé dans le cas de l'autophagie viro-induite (Dong *et al.* 2021). Cette expérience n'a été réalisé qu'une seule fois il est donc essentiel de la répéter. De plus, nous pourrions faire de même avec la déplétion de SNX1/2 pour voir si les structures ponctuées de LC3-II sont toujours visibles.

Beclin1 semble être importante dans l'activité antivirale de NCOA7-AS. Cependant on peut se demander si d'autres protéines du processus autophagique sont impliquées dans son mode d'action. Nous avons réalisé une première expérience d'inhibition du complexe PI3K classe III

(ou PI3KC3-C1) qui est essentielle à l’induction de l’autophagie et qui est capable d’interagir avec SNX5 (Dong *et al.* 2021). Le complexe PI3K classe III va produire du PI3P nécessaire à la formation du phagophore et permettre ainsi le recrutement de protéines de liaison au PI3P comme WIPI-1/2 et ATG14 ou bien ce qui nous intéresse dans notre cas les SNX (Figure 30. A). Nous avons constaté que l’inhibition du complexe PI3K classe III restaure partiellement l’infection en présence de NCOA7-AS (sans avoir d’impact en son absence). Cela confirme une nouvelle fois que l’autophagie pourrait être utilisée par NCOA7-AS pour son activité antivirale. Le PI3P est produit par l’activité de PI3K classe III donc si ce complexe est inhibé il n’y a plus de production de PI3P qui est essentiel au recrutement des SNX. Une hypothèse est donc que comme SNX5 ne peut plus être recrutée à la membrane, NCOA7-AS qui se lie à SNX5 ne pourrait plus exercer son activité antivirale (Figure 30. B). Cela pourrait expliquer la restauration de l’infection lorsque l’on inhibe le complexe PI3K classe III. Il est important de noter que l’expérience d’inhibition du complexe PI3K classe III n’a été réalisée qu’une seule fois. Afin de valider ces hypothèses, nous pourrions mesurer l’acidification des organelles, grâce au lysotracker, dans les cellules où PI3K classe III est inhibée en présence et en absence de NCOA7-AS. Puis comparer ces résultats avec ceux obtenus lors de la déplétion des SNX1/2 et SNX5/6. Nous pourrions également réaliser des western blots et regarder l’expression des SNX notamment SNX5. Nous pouvons étudier aussi les sous-unités de la V-ATPase pour voir si l’inhibition de l’autophagie impacte son expression ou son activité. Il reste compliqué à ce stade de réconcilier tous nos résultats et de comprendre le rôle de chacune de ces familles de protéine et notamment le rôle que pourrait jouer l’autophagie.

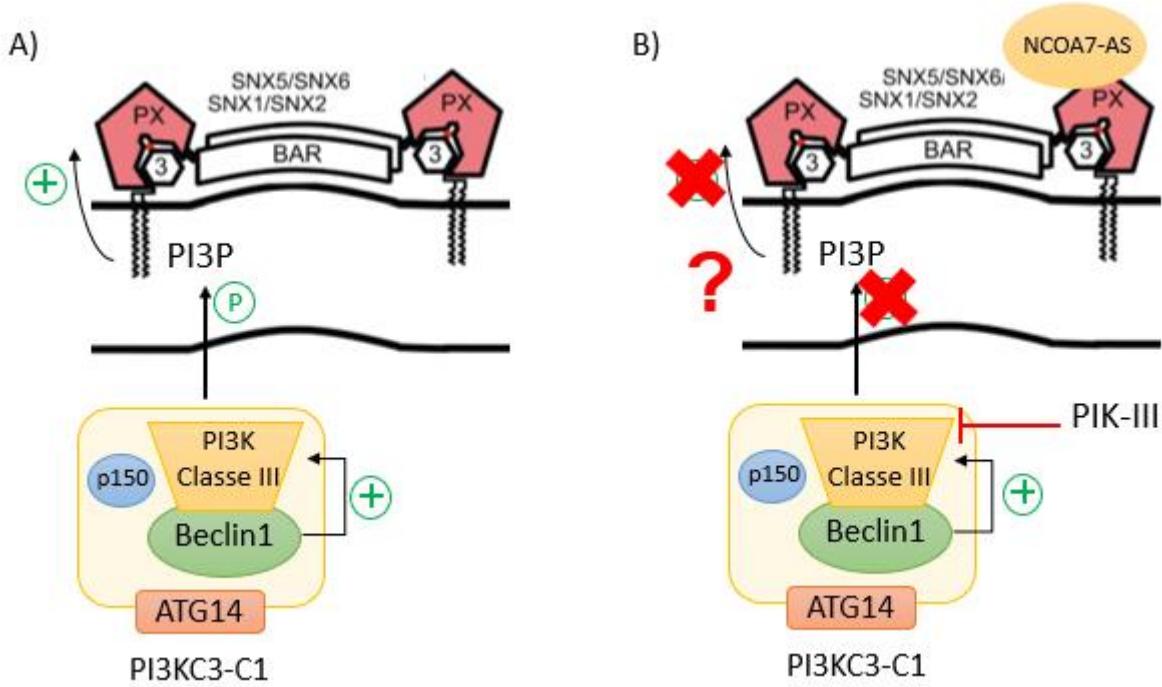


Figure 30 : Modèle du fonctionnement de PI3KC3-C1 lors de l'inhibition du complexe PI3K classe III.
A) Beclin1 est capable de réguler l'activité de PI3K classe III. Une fois activée, PI3K classe III induit la production de PI3P qui sert au recrutement des SNX1/2/5/6. **B)** Lorsque PI3K classe III est inhibé avec la molécule PIK-III, la production de PI3P est bloquée et donc les SNX1/2/5/6 ne peuvent plus se lier à la membrane.

Le rôle de SNX5 semble complexe et on pourrait penser qu'il est localisé et qu'il agit à divers endroits dans la cellule. D'après de récentes études (Dong *et al.* 2021), SNX5 est essentiel à l'autophagie viro-induite par un large panel de virus (Influenza A, Sindbis, Chikungunya). SNX5 interagit avec PI3KC3-C1 mais n'est pas requis pour sa localisation dans les endosomes. Par contre SNX5 est nécessaire pour la fonction de PI3KC3-C1 et donc la génération de PI3P dans les cellules infectées. Selon les travaux de Dong et son équipe (Dong *et al.* 2021), lors d'une infection, SNX5 serait localisée dans les endosomes précoce contenant les virions afin d'activer le complexe PI3KC3-C1 et donc le processus d'autophagie. Il serait intéressant dans nos futurs travaux de travailler dans des conditions et de visualiser en temps réel SNX5 afin voir si nous trouvons les mêmes résultats. Il serait intéressant de réaliser des marquages des sous-unités de la V-ATPase pour voir une potentielle colocalisation avec SNX5 (cependant aucun des nombreux anticorps que nous avons testé ne fonctionnent à ce jour en immunofluorescence, ce qui est une vraie limitation). Enfin, il est très important de noter que d'une part, il n'existe pas d'anticorps commercial spécifique de NCOA7-AS et que d'autre part,

alors que la localisation d'une version étiquetée (FLAG ou FAST) de NCOA7-AS en cellules fixées est diffuse dans le cytoplasme (Doyle *et al.* 2018), en live imaging employant une version de NCOA7-AS fusionnée à une étiquette FAST, celle-ci présente un pattern vésiculaire (non montré). Cette approche sera donc une méthode de choix pour le futur, même si l'ajout d'une étiquette FAST réduit le potentiel antiviral de NCOA7-AS.

Compte-tenu de l'importance de NCOA7-AS dans l'effet antiviral de l'interféron (Doyle *et al.* 2018) et du rôle de SNX5/6 et Beclin1 dans son activité antivirale, nous nous sommes demandé si les SNX et Beclin1 ont un impact sur l'activité antivirale de l'IFN. Il est à noter que d'après les précédents résultats publiés par l'équipe, nous savons que le knock out de NCOA7-AS n'impacte pas l'expression et l'induction des autres ISG antiviraux tels que IFITM3 (Doyle *et al.* 2018). De façon surprenante, dans nos expériences, nous avons constaté que l'IFN perd totalement son impact antiviral lorsque les SNX1/2 et SNX5/6 sont déplétées. Nous avons alors regardé l'expression de certains ISG pour contrôler l'induction de l'IFN et avons remarqué qu'il n'y avait une diminution partielle et totale, respectivement de l'induction de MX1 et IFITM3 dans les cellules déplétées de SNX1/2 rendant toute conclusion impossible. Il semblerait que les SNX1/2 puissent impacter l'induction de certains ISG et donc jouer un rôle complémentaire indirect dans l'effet antiviral. Mais il n'y avait absolument pas de différence au niveau de l'induction d'ISG prototypes suite à un traitement IFN dans les cellules déplétées de SNX5/6, montrant a priori un rôle essentiel de ces dernières dans l'effet antiviral. Nous savons que IFITM3 et NCOA7-AS sont deux acteurs majeurs de l'effet anti-influenza A de l'IFN : il se pourrait donc que SNX5/6 jouent non seulement un rôle dans l'activité antivirale de NCOA7-AS mais aussi d'IFITM3. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse. Par ailleurs, il serait essentiel de contrôler l'expression de NCOA7-AS dans ces expériences mais malheureusement il n'existe pas d'anticorps commerciaux spécifiques de cette protéine (et nos tentatives pour en faire générer ont toutes échouées).

Pour expliquer l'effet de la déplétion des SNX1/2 sur l'absence d'induction des ISG en présence d'IFN, on pourrait émettre l'hypothèse que IFNAR1 et IFNAR2, les deux sous-unités du récepteur à l'IFN de type I, ne sont plus présentes à la membrane plasmique par exemple : elles pourraient être des cargos des SNX. Cela pourrait être testé par un marquage de surface à l'aide d'anticorps spécifiques suivi d'une analyse en cytométrie en flux. Avant de réaliser de telles expériences, nous pourrions vérifier si la déplétion des SNX1/2 impacte l'expression

d'autres ISG par RT-qPCR. Nous pouvons aussi supposer que l'IFN se lie bien à son récepteur en surface mais que l'expression des ISG est bloqué au niveau de la voie de signalisation JAK/STAT. Cependant un rôle des SNX est difficile à expliquer. Il est très intéressant de voir que lorsque l'on déplete les SNX en combinaison deux à deux, nous avons des résultats si différents dans l'expression des ISG alors que finalement toutes les SNX sont déplétées à chaque fois puisqu'elles fonctionnent en hétérodimères. Cela semble confirmer que les SNX aient des rôles bien distincts indépendamment des unes des autres. Il sera intéressant d'étudier l'impact d'autres combinaisons de déplétion.

Conclusion générale

La recherche des partenaires protéiques de NCOA7-AS par spectrométrie de masse nous a permis d'identifier une sous-famille de SNX : les SNX1/2/5/6. Nous avons découvert que les SNX5/6 contribuent à l'activité antivirale de NCOA7-AS. Nos expériences de biochimie nous ont permis de montrer que la partie N-terminale de NCOA7-AS interagit de façon directe avec le domaine de PX de SNX5, et semble déplacer le Cl-MPR perturbant ainsi une des fonctions des SNX. De plus, SNX5 est connue pour être impliquée dans le processus d'autophagie viro-induite en interagissant avec Beclin1. Nos résultats préliminaires semblent indiquer que l'autophagie pourrait être un mécanisme nécessaire à la fonction de NCOA7-AS. Cette dernière est ainsi capable d'induire l'accumulation de LC3-II dans les cellules (et ce, de façon dépendante de SNX5). La déplétion de Beclin1 et l'inhibition du complexe PI3K classe III impactent l'activité antivirale de NCOA7-AS. Avec ces résultats, nous supposons que NCOA7-AS détourne la fonction des SNX5/6 et utilise ainsi l'autophagie pour inhiber l'infection contre le virus influenza A. Il nous reste encore à comprendre ici le rôle exact de toutes ses protéines, mais également l'implication de la V-ATPase (et de l'acidification de la voie endolysosomale) dans l'activité antivirale de NCOA7-AS. Les résultats que nous avons obtenus et les expériences à venir nous permettront de mieux comprendre les mécanismes antiviraux mis en place lors d'une infection par influenza A.

Bibliographie

- Alexander, D. J. 2000. « A Review of Avian Influenza in Different Bird Species ». *Veterinary Microbiology* 74 (1-2): 3-13. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00160-7](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00160-7).
- Amarante-Mendes, Gustavo P., Sandy Adjemian, Laura Migliari Branco, Larissa C. Zanetti, Ricardo Weinlich, et Karina R. Bortoluci. 2018. « Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery ». *Frontiers in Immunology* 9: 2379. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02379>.
- Antón, Zuriñe, Virginie M. S. Betin, Boris Simonetti, Colin J. Traer, Naomi Attar, Peter J. Cullen, et Jon D. Lane. 2020. « A Heterodimeric SNX4:SNX7 SNX-BAR Autophagy Complex Coordinates ATG9A Trafficking for Efficient Autophagosome Assembly ». *Journal of Cell Science*, janvier, jcs.246306. <https://doi.org/10.1242/jcs.246306>.
- Arighi, Cecilia N., Lisa M. Hartnell, Ruben C. Aguilar, Carol R. Haft, et Juan S. Bonifacino. 2004. « Role of the Mammalian Retromer in Sorting of the Cation-Independent Mannose 6-Phosphate Receptor ». *The Journal of Cell Biology* 165 (1): 123-33. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312055>.
- Arnaud-Arnould, M., M. Tauziet, O. Moncorgé, C. Goujon, et M. Blaise. 2021. « Crystal Structure of the TLDC Domain of Human NCOA7-AS ». *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications* 77 (8): 230-37. <https://doi.org/10.1107/S2053230X21006853>.
- Bailey, Charles C., I.-Chueh Huang, Christina Kam, et Michael Farzan. 2012. « Ifitm3 Limits the Severity of Acute Influenza in Mice ». *PLoS Pathogens* 8 (9): e1002909. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002909>.
- Beaton, A. R., et R. M. Krug. 1986. « Transcription Antitermination during Influenza Viral Template RNA Synthesis Requires the Nucleocapsid Protein and the Absence of a 5' Capped End ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (17): 6282-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.17.6282>.
- Blaise, Mickaël, Husam M. A. B. Alsaaraf, Jaslyn E. M. M. Wong, Søren Roi Midgaard, Fabrice Laroche, Lotte Schack, Herman Spaink, Jens Stougaard, et Søren Thirup. 2012. « Crystal Structure of the TLDC Domain of Oxidation Resistance Protein 2 from Zebrafish ». *Proteins* 80 (6): 1694-98. <https://doi.org/10.1002/prot.24050>.
- Bouvier, Nicole M., et Peter Palese. 2008. « The Biology of Influenza Viruses ». *Vaccine* 26 (septembre): D49-53. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.039>.
- Braam, J., I. Ulmanen, et R. M. Krug. 1983. « Molecular Model of a Eucaryotic Transcription Complex: Functions and Movements of Influenza P Proteins during Capped RNA-Primed Transcription ». *Cell* 34 (2): 609-18. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90393-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90393-8).
- Brass, Abraham L, I-Chueh Huang, Yair Benita, Sinu P John, Eric M Feeley, Bethany Ryan, Jessica L Weyer, et al. 2010. « IFITM Proteins Mediate the Innate Immune Response to Influenza A H1N1 Virus, West Nile Virus and Dengue Virus », 22.
- Bravo, J., D. Karathanassis, C. M. Pacold, M. E. Pacold, C. D. Ellison, K. E. Anderson, P. J. Butler, et al. 2001. « The Crystal Structure of the PX Domain from P40(Phox) Bound to Phosphatidylinositol 3-Phosphate ». *Molecular Cell* 8 (4): 829-39. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00372-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00372-0).
- Buonagurio, D. A., S. Nakada, J. D. Parvin, M. Krystal, P. Palese, et W. M. Fitch. 1986. « Evolution of Human Influenza A Viruses over 50 Years: Rapid, Uniform Rate of Change

- in NS Gene ». *Science (New York, N.Y.)* 232 (4753): 980-82. <https://doi.org/10.1126/science.2939560>.
- Burnet, F. M. 1936. « Influenza Virus on the Developing Egg: I. Changes Associated with the Development of an Egg-passage Strain of Virus ». *British Journal of Experimental Pathology* 17 (4): 282-93.
- Castroflorio, Enrico, Joery den Hoed, Daria Svistunova, Mattéa J. Finelli, Alberto Cebrian-Serrano, Silvia Corrochano, Andrew R. Bassett, Benjamin Davies, et Peter L. Oliver. 2021. « The Ncoa7 Locus Regulates V-ATPase Formation and Function, Neurodevelopment and Behaviour ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 78 (7): 3503-24. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03721-6>.
- Chi, Richard J., Megan S. Harrison, et Christopher G. Burd. 2015. « Biogenesis of Endosome-Derived Transport Carriers ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMS* 72 (18): 3441-55. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1935-x>.
- Cros, Jerome F., Adolfo García-Sastre, et Peter Palese. 2005. « An Unconventional NLS Is Critical for the Nuclear Import of the Influenza A Virus Nucleoprotein and Ribonucleoprotein ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 6 (3): 205-13. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00263.x>.
- Cros, Jerome F., et Peter Palese. 2003. « Trafficking of Viral Genomic RNA into and out of the Nucleus: Influenza, Thogoto and Borna Disease Viruses ». *Virus Research* 95 (1-2): 3-12. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(03\)00159-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(03)00159-x).
- Croze, E., K. D. Yamaguchi, V. Knappertz, A. T. Reder, et H. Salamon. 2013. « Interferon-Beta-1b-Induced Short- and Long-Term Signatures of Treatment Activity in Multiple Sclerosis ». *The Pharmacogenomics Journal* 13 (5): 443-51. <https://doi.org/10.1038/tpj.2012.27>.
- Desai, Tanay M., Mariana Marin, Christopher R. Chin, George Savidis, Abraham L. Brass, et Gregory B. Melikyan. 2014. « IFITM3 Restricts Influenza A Virus Entry by Blocking the Formation of Fusion Pores Following Virus-Endosome Hemifusion ». *PLoS Pathogens* 10 (4): e1004048. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004048>.
- Diamond, Michael S., et Michael Farzan. 2013. « The Broad-Spectrum Antiviral Functions of IFIT and IFITM Proteins ». *Nature Reviews Immunology* 13 (1): 46-57. <https://doi.org/10.1038/nri3344>.
- Dias, Alexandre, Denis Bouvier, Thibaut Crépin, Andrew A. McCarthy, Darren J. Hart, Florence Baudin, Stephen Cusack, et Rob W. H. Ruigrok. 2009. « The Cap-Snatching Endonuclease of Influenza Virus Polymerase Resides in the PA Subunit ». *Nature* 458 (7240): 914-18. <https://doi.org/10.1038/nature07745>.
- Diebold, Sandra S., Tsuneyasu Kaisho, Hiroaki Hemmi, Shizuo Akira, et Caetano Reis e Sousa. 2004. « Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA ». *Science* 303 (5663): 1529-31. <https://doi.org/10.1126/science.1093616>.
- Doerks, Tobias, Richard R. Copley, Jörg Schultz, Chris P. Ponting, et Peer Bork. 2002. « Systematic Identification of Novel Protein Domain Families Associated with Nuclear Functions ». *Genome Research* 12 (1): 47-56. <https://doi.org/10.1101/gr.203201>.
- Dong, Xiaonan, Yuting Yang, Zhongju Zou, Yuting Zhao, Bo Ci, Lin Zhong, Madhura Bhave, et al. 2021. « Sorting Nexin 5 Mediates Virus-Induced Autophagy and Immunity ». *Nature* 589 (7842): 456-61. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03056-z>.
- Doyle, Tomas, Olivier Moncorgé, Boris Bonaventure, Darja Pollpeter, Marion Lussignol, Marine Tauziet, Luis Apolonia, Maria-Teresa Catanese, Caroline Goujon, et Michael H. Malim.

- 2018a. « The interferon inducible isoform of NCOA7 inhibits endosome-mediated viral entry ». *Nature microbiology* 3 (12): 1369-76. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0273-9>.
- Drake, J W. 1993. « Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (9): 4171-75.
- Duhaut, S. D., et N. J. Dimmock. 2002. « Defective Segment 1 RNAs That Interfere with Production of Infectious Influenza A Virus Require at Least 150 Nucleotides of 5' Sequence: Evidence from a Plasmid-Driven System ». *The Journal of General Virology* 83 (Pt 2): 403-11. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.0221317>-83-2-403.
- Durand, Mathieu, Adrienne Kolpak, Timothy Farrell, Nathan A. Elliott, Wenlin Shao, Myles Brown, et Michael R. Volkert. 2007. « The OXR Domain Defines a Conserved Family of Eukaryotic Oxidation Resistance Proteins ». *BMC Cell Biology* 8 (mars): 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-8-13>.
- Elliott, Nathan A., et Michael R. Volkert. 2004. « Stress Induction and Mitochondrial Localization of Oxr1 Proteins in Yeast and Humans ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (8): 3180-87. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.8.3180-3187.2004>.
- Finelli, Mattéa J., Luis Sanchez-Pulido, Kevin X. Liu, Kay E. Davies, et Peter L. Oliver. 2016a. « The Evolutionarily Conserved Tre2/Bub2/Cdc16 (TBC), Lysin Motif (LysM), Domain Catalytic (TLDc) Domain Is Neuroprotective against Oxidative Stress ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (6): 2751-63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.685222>.
- Fouchier, Ron A. M., Vincent Munster, Anders Wallensten, Theo M. Bestebroer, Sander Herfst, Derek Smith, Guus F. Rimmelzwaan, Björn Olsen, et Albert D. M. E. Osterhaus. 2005. « Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls ». *Journal of Virology* 79 (5): 2814-22. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.2814-2822.2005>.
- Fu, Bishi, Lingyan Wang, Shitao Li, et Martin E. Dorf. 2017. « ZMPSTE24 Defends against Influenza and Other Pathogenic Viruses ». *Journal of Experimental Medicine* 214 (4): 919-29. <https://doi.org/10.1084/jem.20161270>.
- Ganley, Ian G. 2013. « Autophagosome Maturation and Lysosomal Fusion ». Édité par Jon D. Lane. *Essays in Biochemistry* 55 (septembre): 65-78. <https://doi.org/10.1042/bse0550065>.
- Ghosh, Pradipta, Nancy M. Dahms, et Stuart Kornfeld. 2003. « Mannose 6-Phosphate Receptors: New Twists in the Tale ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (3): 202-12. <https://doi.org/10.1038/nrm1050>.
- Gottschalk, Alfred. 1959. « On the Mechanism Underlying Initiation of Influenza Virus Infection ». In *Ergebnisse der Mikrobiologie Immunitätsforschung und Experimentellen Therapie*, édité par W. Kikuth, K. F. Meyer, E. G. Nauck, A. M. Pappenheimer, et J. Tomcsik, 32:1-22. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-42618-0_1.
- Goujon, Caroline, et Michael H. Malim. 2010. « Characterization of the Alpha Interferon-Induced Postentry Block to HIV-1 Infection in Primary Human Macrophages and T Cells ». *Journal of Virology* 84 (18): 9254-66. <https://doi.org/10.1128/JVI.00854-10>.
- Goujon, Caroline, Olivier Moncorgé, Hélène Bauby, Tomas Doyle, Christopher C. Ward, Torsten Schaller, Stéphane Hué, Wendy S. Barclay, Reiner Schulz, et Michael H. Malim. 2013. « Human MX2 Is an Interferon-Induced Post-Entry Inhibitor of HIV-1 Infection ». *Nature* 502 (7472): 559-62. <https://doi.org/10.1038/nature12542>.

- Gubareva, L. V., L. Kaiser, et F. G. Hayden. 2000. « Influenza Virus Neuraminidase Inhibitors ». *Lancet (London, England)* 355 (9206): 827-35. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)11433-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)11433-8).
- Håberg, Karin, Richard Lundmark, et Sven R. Carlsson. 2008. « SNX18 Is an SNX9 Paralog That Acts as a Membrane Tubulator in AP-1-Positive Endosomal Trafficking ». *Journal of Cell Science* 121 (Pt 9): 1495-1505. <https://doi.org/10.1242/jcs.028530>.
- Haft, C. R., M. de la Luz Sierra, R. Bafford, M. A. Lesniak, V. A. Barr, et S. I. Taylor. 2000. « Human Orthologs of Yeast Vacuolar Protein Sorting Proteins Vps26, 29, and 35: Assembly into Multimeric Complexes ». *Molecular Biology of the Cell* 11 (12): 4105-16. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4105>.
- Haft, Carol Renfrew, Maria de la Luz Sierra, Valarie A. Barr, Daniel H. Haft, et Simeon I. Taylor. 1998. « Identification of a Family of Sorting Nexin Molecules and Characterization of Their Association with Receptors ». *Molecular and Cellular Biology* 18 (12): 7278-87.
- Haller, Otto, et Georg Kochs. 2010. « Human MxA Protein: An Interferon-Induced Dynamin-Like GTPase with Broad Antiviral Activity ». *Journal of Interferon & Cytokine Research* 31 (1): 79-87. <https://doi.org/10.1089/jir.2010.0076>.
- Heaton, Brook E., Edward M. Kennedy, Rebekah E. Dumm, Alfred T. Harding, Matthew T. Sacco, David Sachs, et Nicholas S. Heaton. 2017. « A CRISPR Activation Screen Identifies a Pan-Avian Influenza Virus Inhibitory Host Factor ». *Cell Reports* 20 (7): 1503-12. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.060>.
- Helene Minyi Liu, Yueh-Ming Loo, Stacy M. Horner, Gregory A. Zornetzer, Michael G. Katze, et Michael Gale. 2012. « The Mitochondrial Targeting Chaperone 14-3-3 ϵ Regulates a RIG-I Translocon That Mediates Membrane Association and Innate Antiviral Immunity ». *Cell Host & Microbe* 11 (5): 528-37. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.04.006>.
- Helenius, A. 1992. « Unpacking the Incoming Influenza Virus ». *Cell* 69 (4): 577-78. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90219-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90219-3).
- Horazdovsky, B. F., B. A. Davies, M. N. Seaman, S. A. McLaughlin, S. Yoon, et S. D. Emr. 1997. « A Sorting Nexin-1 Homologue, Vps5p, Forms a Complex with Vps17p and Is Required for Recycling the Vacuolar Protein-Sorting Receptor ». *Molecular Biology of the Cell* 8 (8): 1529-41. <https://doi.org/10.1091/mbc.8.8.1529>.
- Horimoto, Taisuke, et Yoshihiro Kawaoka. 2005. « Influenza: Lessons from Past Pandemics, Warnings from Current Incidents ». *Nature Reviews. Microbiology* 3 (8): 591-600. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1208>.
- Jin, Yi, et Trevor M. Penning. 2007. « Aldo-Keto Reductases and Bioactivation/Detoxication ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 47: 263-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105337>.
- Joseph, Udayan, Yvonne C. F. Su, Dhanasekaran Vijaykrishna, et Gavin J. D. Smith. 2017. « The Ecology and Adaptive Evolution of Influenza A Interspecies Transmission ». *Influenza and Other Respiratory Viruses* 11 (1): 74-84. <https://doi.org/10.1111/irv.12412>.
- Klionsky, Daniel J., et Patrice Codogno. 2013. « The Mechanism and Physiological Function of Macroautophagy ». *Journal of Innate Immunity* 5 (5): 427-33. <https://doi.org/10.1159/000351979>.
- Knævelsrød, Helene, Sven R. Carlsson, et Anne Simonsen. 2013. « SNX18 Tubulates Recycling Endosomes for Autophagosome Biogenesis ». *Autophagy* 9 (10): 1639-41. <https://doi.org/10.4161/auto.26124>.

- Krug, Robert M. 2015. « Functions of the Influenza A Virus NS1 Protein in Antiviral Defense ». *Current Opinion in Virology* 12 (juin): 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.01.007>.
- Kurten, R. C., D. L. Cadena, et G. N. Gill. 1996. « Enhanced Degradation of EGF Receptors by a Sorting Nexin, SNX1 ». *Science (New York, N.Y.)* 272 (5264): 1008-10. <https://doi.org/10.1126/science.272.5264.1008>.
- Kvainickas, Arunas, Ana Jimenez-Orgaz, Heike Nägele, Zehan Hu, Jörn Dengjel, et Florian Steinberg. 2017a. « Cargo-Selective SNX-BAR Proteins Mediate Retromer Trimer Independent Retrograde Transport ». *The Journal of Cell Biology* 216 (11): 3677-93. <https://doi.org/10.1083/jcb.201702137>.
- Lazear, Helen M., John W. Schoggins, et Michael S. Diamond. 2019. « Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons ». *Immunity* 50 (4): 907-23. <https://doi.org/10.1016/j.jimmuni.2019.03.025>.
- Liang, X. H., L. K. Kleeman, H. H. Jiang, G. Gordon, J. E. Goldman, G. Berry, B. Herman, et B. Levine. 1998. « Protection against Fatal Sindbis Virus Encephalitis by Beclin, a Novel Bcl-2-Interacting Protein ». *Journal of Virology* 72 (11): 8586-96. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.11.8586-8596.1998>.
- Liu, B. L., M. Robinson, Z.-Q. Han, R. H. Branston, C. English, P. Reay, Y. McGrath, et al. 2003. « ICP34.5 Deleted Herpes Simplex Virus with Enhanced Oncolytic, Immune Stimulating, and Anti-Tumour Properties ». *Gene Therapy* 10 (4): 292-303. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301885>.
- Liu, GuanQun, Yao Lu, Sathya N. Thulasi Raman, Fang Xu, Qi Wu, Zhubing Li, Robert Brownlie, Qiang Liu, et Yan Zhou. 2018. « Nuclear-resident RIG-I senses viral replication inducing antiviral immunity ». *Nature Communications* 9 (août): 3199. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05745-w>.
- Liu, Lin, Istvan Botos, Yan Wang, Joshua N. Leonard, Joseph Shiloach, David M. Segal, et David R. Davies. 2008. « Structural Basis of Toll-Like Receptor 3 Signaling with Double-Stranded RNA ». *Science* 320 (5874): 379-81. <https://doi.org/10.1126/science.1155406>.
- Lupiani, Blanca, et Sanjay M. Reddy. 2009. « The History of Avian Influenza ». *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 32 (4): 311-23. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2008.01.004>.
- Mahauad-Fernandez, Wadie D., et Chioma M. Okeoma. 2016. « The Role of BST-2/Tetherin in Host Protection and Disease Manifestation ». *Immunity, Inflammation and Disease* 4 (1): 4-23. <https://doi.org/10.1002/iid3.92>.
- Martin, Paul M.V., et Estelle Martin-Granel. 2006. « 2,500-year Evolution of the Term Epidemic ». *Emerging Infectious Diseases* 12 (6): 976-80. <https://doi.org/10.3201/eid1206.051263>.
- Matlin, K. S., H. Reggio, A. Helenius, et K. Simons. 1981. « Infectious Entry Pathway of Influenza Virus in a Canine Kidney Cell Line ». *The Journal of Cell Biology* 91 (3 Pt 1): 601-13. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.3.601>.
- McKellar, Joe, Antoine Rebendenne, Mélanie Wencker, Olivier Moncorgé, et Caroline Goujon. 2021. « Mammalian and Avian Host Cell Influenza A Restriction Factors ». *Viruses* 13 (3): 522. <https://doi.org/10.3390/v13030522>.
- Meerzaman, Daoud, Paul S. Shapiro, et K. Chul Kim. 2001. « Involvement of the MAP Kinase ERK2 in MUC1 Mucin Signaling ». *American Journal of Physiology-Lung Cellular and*

- Molecular Physiology* 281 (1): L86-91.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.281.1.L86>.
- Merkulova, Maria, Teodor G. Păunescu, Anie Azroyan, Vladimir Marshansky, Sylvie Breton, et Dennis Brown. 2015. « Mapping the H(+) (V)-ATPase Interactome: Identification of Proteins Involved in Trafficking, Folding, Assembly and Phosphorylation ». *Scientific Reports* 5 (octobre): 14827. <https://doi.org/10.1038/srep14827>.
- Monne, Isabella, Alice Fusaro, Martha I. Nelson, Lebana Bonfanti, Paolo Mulatti, Joseph Hughes, Pablo R. Murcia, et al. 2014. « Emergence of a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus from a Low-Pathogenic Progenitor ». *Journal of Virology* 88 (8): 4375-88. <https://doi.org/10.1128/JVI.03181-13>.
- Murphy, Kenan C., et Michael R. Volkert. 2012. « Structural/Functional Analysis of the Human OXR1 Protein: Identification of Exon 8 as the Anti-Oxidant Encoding Function ». *BMC Molecular Biology* 13 (août): 26. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-13-26>.
- Nimmerjahn, Falk, Slavoljub Milosevic, Uta Behrends, Elizabeth M. Jaffee, Drew M. Pardoll, Georg W. Bornkamm, et Josef Mautner. 2003. « Major Histocompatibility Complex Class II-Restricted Presentation of a Cytosolic Antigen by Autophagy ». *European Journal of Immunology* 33 (5): 1250-59. <https://doi.org/10.1002/eji.200323730>.
- Oliver, Peter L., Mattéa J. Finelli, Benjamin Edwards, Emmanuelle Bitoun, Darcy L. Butts, Esther B. E. Becker, Michael T. Cheeseman, Ben Davies, et Kay E. Davies. 2011. « Oxr1 Is Essential for Protection against Oxidative Stress-Induced Neurodegeneration ». *PLoS Genetics* 7 (10): e1002338. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002338>.
- Omoto, Shinya, Valentina Speranzini, Takashi Hashimoto, Takeshi Noshi, Hiroto Yamaguchi, Makoto Kawai, Keiko Kawaguchi, et al. 2018. « Characterization of Influenza Virus Variants Induced by Treatment with the Endonuclease Inhibitor Baloxavir Marboxil ». *Scientific Reports* 8 (1): 9633. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27890-4>.
- O'Neill, Luke A. J., Douglas Golenbock, et Andrew G. Bowie. 2013. « The History of Toll-like Receptors — Redefining Innate Immunity ». *Nature Reviews Immunology* 13 (6): 453-60. <https://doi.org/10.1038/nri3446>.
- O'Neill, R. E., R. Jaskunas, G. Blobel, P. Palese, et J. Moroianu. 1995. « Nuclear Import of Influenza Virus RNA Can Be Mediated by Viral Nucleoprotein and Transport Factors Required for Protein Import ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (39): 22701-4. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.39.22701>.
- O'Neill, R E, J Talon, et P Palese. 1998. « The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. » *The EMBO Journal* 17 (1): 288-96. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.1.288>.
- Otsuki, Tetsuya, Sachiko Kajigaya, Keiya Ozawa, et Johnson M. Liu. 1999. « SNX5, a New Member of the Sorting Nexin Family, Binds to the Fanconi Anemia Complementation Group A Protein ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265 (3): 630-35. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1731>.
- Park, Joohyun, Yoonju Kim, Suho Lee, Jae Jun Park, Zee Yong Park, Woong Sun, Hyun Kim, et Sunghoe Chang. 2010. « SNX18 Shares a Redundant Role with SNX9 and Modulates Endocytic Trafficking at the Plasma Membrane ». *Journal of Cell Science* 123 (Pt 10): 1742-50. <https://doi.org/10.1242/jcs.064170>.
- Peter, Brian J., Helen M. Kent, Ian G. Mills, Yvonne Vallis, P. Jonathan G. Butler, Philip R. Evans, et Harvey T. McMahon. 2004a. « BAR Domains as Sensors of Membrane Curvature: The Amphiphysin BAR Structure ». *Science (New York, N.Y.)* 303 (5657): 495-99. <https://doi.org/10.1126/science.1092586>.

- Pinto, L. H., et R. A. Lamb. 1995. « Understanding the Mechanism of Action of the Anti-Influenza Virus Drug Amantadine ». *Trends in Microbiology* 3 (7): 271. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)88942-8](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)88942-8).
- Pringle, C. R. 1996. « Virus Taxonomy 1996 - a Bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem ». *Archives of Virology* 141 (11): 2251-56. <https://doi.org/10.1007/BF01718231>.
- Pylypenko, Olena, Richard Lundmark, Erika Rasmuson, Sven R. Carlsson, et Alexey Rak. 2007. « The PX-BAR Membrane-Remodeling Unit of Sorting Nexin 9 ». *The EMBO Journal* 26 (22): 4788-4800. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601889>.
- Rossmann, Jeremy S., et Robert A. Lamb. 2011. « Influenza Virus Assembly and Budding ». *Virology* 411 (2): 229-36. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.003>.
- Rott, Rudolf. 1992. « The Pathogenic Determinant of Influenza Virus ». *Veterinary Microbiology* 33 (1): 303-10. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(92\)90058-2](https://doi.org/10.1016/0378-1135(92)90058-2).
- Rust, Michael J, Melike Lakadamyali, Feng Zhang, et Xiaowei Zhuang. 2004. « Assembly of Endocytic Machinery around Individual Influenza Viruses during Viral Entry ». *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (6): 567-73. <https://doi.org/10.1038/nsmb769>.
- Schlee, Martin, Andreas Roth, Veit Hornung, Cristina Amparo Hagmann, Vera Wimmenauer, Winfried Barchet, Christoph Coch, et al. 2009. « Recognition of 5' Triphosphate by RIG-I Helicase Requires Short Blunt Double-Stranded RNA as Contained in Panhandle of Negative-Strand Virus ». *Immunity* 31 (1): 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.008>.
- Schmitt, Anthony P., et Robert A. Lamb. 2005. « Influenza Virus Assembly and Budding at the Viral BudZone ». *Advances in Virus Research* 64: 383-416. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(05\)64012-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(05)64012-2).
- Schneider, William M., Meike Dittmann Chevillotte, et Charles M. Rice. 2014. « Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses ». *Annual Review of Immunology* 32 (1): 513-45. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>.
- Schoggins, John W, et Charles M Rice. 2011. « Interferon-Stimulated Genes and Their Antiviral Effector Functions ». *Current Opinion in Virology* 1 (6): 519-25. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.008>.
- Scholtissek, C., et R. Rott. 1970. « Synthesis in Vivo of Influenza Virus plus and Minus Strand RNA and Its Preferential Inhibition by Antibiotics ». *Virology* 40 (4): 989-96. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(70\)90145-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(70)90145-5).
- Schwarz, Dana Gilbert, Courtney T. Griffin, Elizabeth A. Schneider, Della Yee, et Terry Magnuson. 2002. « Genetic Analysis of Sorting Nexins 1 and 2 Reveals a Redundant and Essential Function in Mice ». *Molecular Biology of the Cell* 13 (10): 3588-3600. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-03-0145>.
- Seaman, Matthew N. J. 2004. « Cargo-Selective Endosomal Sorting for Retrieval to the Golgi Requires Retromer ». *The Journal of Cell Biology* 165 (1): 111-22. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312034>.
- Seaman, Matthew N.J., J. Michael McCaffery, et Scott D. Emr. 1998. « A Membrane Coat Complex Essential for Endosome-to-Golgi Retrograde Transport in Yeast ». *The Journal of Cell Biology* 142 (3): 665-81.
- Shao, Wenlin, Shlomit Halachmi, et Myles Brown. 2002. « ERAP140, a Conserved Tissue-Specific Nuclear Receptor Coactivator ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (10): 3358-72. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.10.3358-3372.2002>.

- Shi, Chong-Shan, et John H. Kehrl. 2008. « MyD88 and Trif Target Beclin 1 to Trigger Autophagy in Macrophages ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (48): 33175-82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804478200>.
- Shope, R. E. 1931. « SWINE INFLUENZA : III. FILTRATION EXPERIMENTS AND ETIOLOGY ». *The Journal of Experimental Medicine* 54 (3): 373-85. <https://doi.org/10.1084/jem.54.3.373>.
- Simonetti, Boris, Chris M. Danson, Kate J. Heesom, et Peter J. Cullen. 2017a. « Sequence-Dependent Cargo Recognition by SNX-BARs Mediates Retromer-Independent Transport of CI-MPR ». *The Journal of Cell Biology* 216 (11): 3695-3712. <https://doi.org/10.1083/jcb.201703015>.
- Simonetti, Boris, Blessy Paul, Karina Chaudhari, Saroja Weeratunga, Florian Steinberg, Madhavi Gorla, Kate J. Heesom, Greg J. Bashaw, Brett M. Collins, et Peter J. Cullen. 2019. « Molecular Identification of a BAR Domain-Containing Coat Complex for Endosomal Recycling of Transmembrane Proteins ». *Nature Cell Biology* 21 (10): 1219-33. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0393-3>.
- Skehel, J. J., et D. C. Wiley. 2000. « Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin ». *Annual Review of Biochemistry* 69: 531-69. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.531>.
- Spackman, Erica. 2008. « A Brief Introduction to the Avian Influenza Virus ». In *Avian Influenza Virus*, édité par Erica Spackman, 1-6. Methods in Molecular Biology™. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-279-3_1.
- Stegmann, T, J M White, et A Helenius. 1990. « Intermediates in influenza induced membrane fusion. » *The EMBO Journal* 9 (13): 4231-41.
- Su, Shuo, Xinliang Fu, Gairu Li, Fiona Kerlin, et Michael Veit. 2017. « Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics ». *Virulence* 8 (8): 1580-91. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1365216>.
- Sugawara, Kenji, Nobuo N. Suzuki, Yuko Fujioka, Noboru Mizushima, Yoshinori Ohsumi, et Fuyuhiko Inagaki. 2004. « The Crystal Structure of Microtubule-Associated Protein Light Chain 3, a Mammalian Homologue of Saccharomyces Cerevisiae Atg8 ». *Genes to Cells* 9 (7): 611-18. <https://doi.org/10.1111/j.1356-9597.2004.00750.x>.
- Suzuki, Kuninori, Takeshi Noda, et Yoshinori Ohsumi. 2004. « Interrelationships among Atg Proteins during Autophagy InSaccharomyces Cerevisiae ». *Yeast* 21 (12): 1057-65. <https://doi.org/10.1002/yea.1152>.
- Tanida, Isei, Takashi Ueno, et Eiki Kominami. 2004. « LC3 conjugation system in mammalian autophagy ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (12): 2503-18. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.009>.
- Taubenberger, Jeffery K., et David M. Morens. 2010. « Influenza: The Once and Future Pandemic ». *Public Health Reports (Washington, D.C.: 1974)* 125 Suppl 3 (avril): 16-26.
- Teasdale, R. D., D. Loci, F. Houghton, L. Karlsson, et P. A. Gleeson. 2001. « A Large Family of Endosome-Localized Proteins Related to Sorting Nexin 1 ». *The Biochemical Journal* 358 (Pt 1): 7-16. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3580007>.
- Teasdale, Rohan D., et Brett M. Collins. 2012. « Insights into the PX (Phox-Homology) Domain and SNX (Sorting Nexin) Protein Families: Structures, Functions and Roles in Disease ». *The Biochemical Journal* 441 (1): 39-59. <https://doi.org/10.1042/BJ20111226>.
- Volkert, M. R., N. A. Elliott, et D. E. Housman. 2000. « Functional Genomics Reveals a Family of Eukaryotic Oxidation Protection Genes ». *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America 97 (26): 14530-35.
<https://doi.org/10.1073/pnas.260495897>.

- Vyncke, Laurens, Celia Bovijn, Ewald Pauwels, Tim Van Acker, Elien Ruyssinck, Elianne Burg, Jan Tavernier, et Frank Peelman. 2016. « Reconstructing the TIR Side of the Myddosome: A Paradigm for TIR-TIR Interactions ». *Structure (London, England: 1993)* 24 (3): 437-47. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.12.018>.
- Wang, Hongbing, Fiona K. Bedford, Nicholas J. Brandon, Stephen J. Moss, et Richard W. Olsen. 1999. « GABAA-Receptor-Associated Protein Links GABAA Receptors and the Cytoskeleton ». *Nature* 397 (6714): 69-72. <https://doi.org/10.1038/16264>.
- Wassmer, Thomas, Naomi Attar, Miriam V. Bujny, Jacqueline Oakley, Colin J. Traer, et Peter J. Cullen. 2007. « A Loss-of-Function Screen Reveals SNX5 and SNX6 as Potential Components of the Mammalian Retromer ». *Journal of Cell Science* 120 (Pt 1): 45-54. <https://doi.org/10.1242/jcs.03302>.
- Webster, R G, W J Bean, O T Gorman, T M Chambers, et Y Kawaoka. 1992. « Evolution and ecology of influenza A viruses. » *Microbiological Reviews* 56 (1): 152-79.
- Webster, R. G., M. Yakhno, V. S. Hinshaw, W. J. Bean, et K. G. Murti. 1978. « Intestinal Influenza: Replication and Characterization of Influenza Viruses in Ducks ». *Virology* 84 (2): 268-78. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90247-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90247-7).
- Weering, Jan R. T. van, Paul Verkade, et Peter J. Cullen. 2010. « SNX-BAR Proteins in Phosphoinositide-Mediated, Tubular-Based Endosomal Sorting ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21 (4): 371-80. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.11.009>.
- Williams, Erin T., Xi Chen, et Darren J. Moore. 2017. « VPS35, the Retromer Complex and Parkinson's Disease ». *Journal of Parkinson's Disease* 7 (2): 219-33. <https://doi.org/10.3233/JPD-161020>.
- Wu, Ying, Yan Wu, Boris Tefsén, Yi Shi, et George F. Gao. 2014. « Bat-Derived Influenza-like Viruses H17N10 and H18N11 ». *Trends in Microbiology* 22 (4): 183-91. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.010>.
- Xu, Yi, Chinnaswamy Jagannath, Xian-De Liu, Amir Sharafkhaneh, Katarzyna E. Kolodziejska, et N. Tony Eissa. 2007. « Toll-like Receptor 4 Is a Sensor for Autophagy Associated with Innate Immunity ». *Immunity* 27 (1): 135-44. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.022>.
- Yamamoto, Masahiro, Shintaro Sato, Hiroaki Hemmi, Katsuaki Hoshino, Tsuneyasu Kaisho, Hideki Sanjo, Osamu Takeuchi, et al. 2003. « Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-like Receptor Signaling Pathway ». *Science (New York, N.Y.)* 301 (5633): 640-43. <https://doi.org/10.1126/science.1087262>.
- Yu, Lijian, Ed Croze, Ken D. Yamaguchi, Tiffany Tran, Anthony T. Reder, Vladimir Litvak, et Michael R. Volkert. 2015. « Induction of a Unique Isoform of the NCOA7 Oxidation Resistance Gene by Interferon β -1b ». *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 35 (3): 186-99. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0115>.
- Zhao, Jin, Jiaoshan Chen, Minchao Li, Musha Chen, et Caijun Sun. 2020. « Multifaceted Functions of CH25H and 25HC to Modulate the Lipid Metabolism, Immune Responses, and Broadly Antiviral Activities ». *Viruses* 12 (7): 727. <https://doi.org/10.3390/v12070727>.

Annexe 1 : Doyle *et al.*, *Nature Microbiology*, 2018

The interferon-inducible isoform of NCOA7 inhibits endosome-mediated viral entry

Tomas Doyle^{1,3}, Olivier Moncorgé², Boris Bonaventure², Darja Pollpeter¹, Marion Lussignol¹, Marine Tauziet², Luis Apolonia¹, Maria-Teresa Catanese¹, Caroline Goujon^{1,2*} and Michael H. Malim¹

Interferons (IFNs) mediate cellular defence against viral pathogens by upregulation of IFN-stimulated genes whose products interact with viral components or alter cellular physiology to suppress viral replication^{1–3}. Among the IFN-stimulated genes that can inhibit influenza A virus (IAV)⁴ are the myxovirus resistance 1 GTPase⁵ and IFN-induced transmembrane protein 3 (refs ^{6,7}). Here, we use ectopic expression and gene knockout to demonstrate that the IFN-inducible 219-amino acid short isoform of human nuclear receptor coactivator 7 (NCOA7) is an inhibitor of IAV as well as other viruses that enter the cell by endocytosis, including hepatitis C virus. NCOA7 interacts with the vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) and its expression promotes cytoplasmic vesicle acidification, lysosomal protease activity and the degradation of endocytosed antigen. Step-wise dissection of the IAV entry pathway demonstrates that NCOA7 inhibits fusion of the viral and endosomal membranes and subsequent nuclear translocation of viral ribonucleoproteins. Therefore, NCOA7 provides a mechanism for immune regulation of endolysosomal physiology that not only suppresses viral entry into the cytosol from this compartment but may also regulate other V-ATPase-associated cellular processes, such as physiological adjustments to nutritional status, or the maturation and function of antigen-presenting cells.

Previously, we characterized a panel of primary and immortalized cells for interferon α (IFN α)-inducible resistance to human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection as the basis for the transcriptomic-led identification of IFN-stimulated genes (ISGs) that suppress virus infection^{8,9}. Among the complementary DNAs (cDNAs) of interest, the IFN-inducible short isoform (isoform 4) of human nuclear receptor coactivator 7 (NCOA7)—also termed NCOA7-alternative start¹⁰—was cloned into pEasiLV-MCS—a doxycycline-inducible, E2-crimson-expressing lentiviral vector⁹—and evaluated for anti-retroviral activity.

HIV-1 susceptible U87MG CD4 $^{+}$ CXCR4 $^{+}$ cultures were transduced with NCOA7-expressing EasiLV or a negative control vector. Cells were challenged with a vesicular stomatitis virus G-glycoprotein (VSV-G)-pseudotyped HIV-1-derived lentiviral vector that expresses green fluorescent protein (GFP)¹¹. At 48 h, E2-crimson-positive cells were gated and the percentage of infected cells was enumerated by flow cytometry. At multiple viral doses, NCOA7 expression decreased virus infectivity (Fig. 1a), with similar effects seen with VSV-G-pseudotyped vectors derived from diverse retroviruses, including simian immunodeficiency virus,

equine infectious anaemia virus and feline immunodeficiency virus (Supplementary Fig. 1a). In contrast, in challenges with HIV-1/Nef-internal ribosome entry signal (IRES)-GFP carrying its natural envelope glycoprotein (Env), NCOA7 displayed no discernible antiviral activity (Fig. 1a). We surmised that the differences in NCOA7 sensitivity between HIV-1 particles carrying HIV-1 Env or VSV-G could be dictated by the viral entry pathway: HIV-1 is believed to mediate pH-independent membrane fusion¹², whereas VSV-G undergoes pH-dependent fusion in early endosomes¹³. We therefore extended this pseudotyping analysis to additional viral envelope glycoproteins; the rabies virus glycoprotein (RABV-G) mediates entry via endosomes, whereas Env of amphotropic murine leukaemia virus (MLV) and the feline endogenous retrovirus RD114 are thought to facilitate pH-independent membrane fusion. NCOA7 inhibited infection by pseudotypes carrying RABV-G but not amphotropic MLV or RD114 Env (Fig. 1b), consistent with suppressed entry from the endocytic pathway.

Next, we tested the effect of NCOA7 on two replication-competent viruses from diverse families that naturally enter by endocytic uptake—namely, influenza A virus (IAV; an orthomyxovirus) and hepatitis C virus (HCV; a flavivirus). A549 cells transduced with a constitutively expressing NCOA7 lentiviral vector, or control cells, were challenged with IAV, fixed at 5 h and stained with an antibody specific for viral nucleoprotein—a viral protein that accumulates to high levels in the nucleus during productive viral replication following de novo expression. NCOA7 expression reduced the number of cells with nuclear nucleoprotein staining by around sixfold (Fig. 1c,d); similarly, an engineered IAV expressing NanoLuc luciferase was also inhibited across a range of viral doses (Supplementary Fig. 1b). The suppressive effects of NCOA7 were most evident at earlier time points, as illustrated by IAV infection of control versus NCOA7-expressing 293T cultures and time-lapse microscopy (Supplementary Video 1). For HCV infection, Huh-7.5 cell cultures were stably transduced with an NCOA7-expressing (or control) lentiviral vector, challenged with HCV, and harvested and stained with an anti-NS5A antibody at 48 h: NCOA7 expression resulted in a decrease in HCV infection of ~50% (Fig. 1e).

Having demonstrated that the provision of NCOA7 was sufficient to inhibit IAV infection, we complemented this approach by assessing the contribution of endogenous NCOA7 to the IFN α -induced suppression of IAV infection. We used clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-CRISPR-associated protein 9 (Cas9)-mediated genome editing and guide RNAs targeting the unique region of the short isoform to

¹Department of Infectious Diseases, School of Immunology and Microbial Sciences, King's College London, London, UK. ²IRIM, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France. ³Present address: GlaxoSmithKline Medicines Research Centre, Stevenage, UK. *e-mail: caroline.goujon@irim.cnrs.fr; michael.malim@kcl.ac.uk

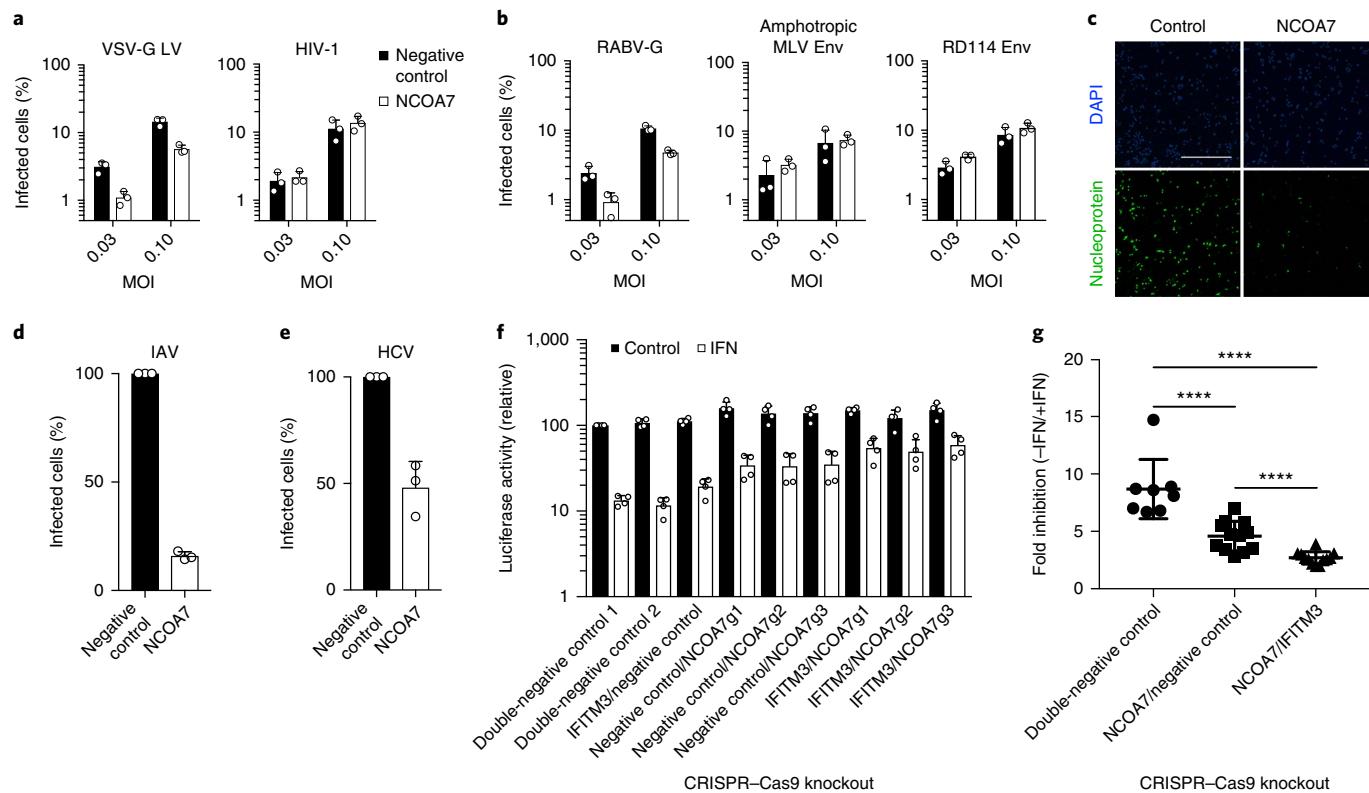


Fig. 1 | NCOA7 inhibits infection by viruses entering through the endocytic pathway. U87MG CD4⁺ CXCR4⁺ cells were transduced with EasiLV expressing NCOA7 or a control (CD8 or luciferase) and treated with doxycycline for 48 h. **a,b**, Cells were challenged with VSV-G-pseudotyped, HIV-1-based GFP-expressing lentiviral vector (VSV-G LV) or HIV-1(NL4.3/Nef-IRES-GFP) (**a**) or lentiviral vectors pseudotyped with RABV-G, amphotropic MLV Env or RD114 Env (**b**). At 48 h, E2-crimson-positive cells were gated and the percentage of infected, GFP-positive cells was determined by flow cytometry. **c**, A549 cells expressing NCOA7 or CD8 were infected with A/Eng/195/2009, fixed at 5 h, stained with anti-nucleoprotein antibody (green) and visualized by confocal microscopy. Scale bar, 200 μ m. **d**, Percentages of cells in **c** infected with IAV, quantitated by ImageJ. **e**, Huh-7.5 cells were transduced with lentiviral vectors expressing NCOA7 or GFP, and infected with HCV. After 48 h, cells were fixed and stained with anti-NS5A antibody, and the percentage of infected cells was determined by flow cytometry. **f**, NCOA7 requirement for effective IFN α -induced inhibition of IAV. A549-Cas9 cells were transduced with lentiviral vectors expressing CRISPR non-targeting guide RNAs (g1/g2-CTRL) or guide RNAs targeting IFITM3 or NCOA7, singly or in combination. Cells were antibiotic selected for at least 15 d, seeded and treated for 24 h with IFN α before challenge with 5×10^4 plaque-forming units per well of IAV NanoLuc. The cells were lysed 7 h post-infection and the luciferase activity was measured. The relative luminescence results for IFN α -treated and -untreated conditions are shown. **g**, Statistical analysis of infectivity in the absence (−) or presence (+) of IFN α from **f** combining different guides from control ($n=8$), NCOA7 knockout ($n=12$) and NCOA7/IFITM3 double-knockout ($n=12$) cell populations. ****P values (95% confidence interval) were 6.351×10^{-5} (2.2–5.3), 1.588×10^{-5} (4.3–6.3) and 4.955×10^{-5} (0.8–2.9) for the double-negative control versus NCOA7/negative control, the double-negative control versus NCOA7/IFITM3 and NCOA7/negative control versus NCOA7/IFITM3, respectively. Statistical significance was determined by unadjusted, two-sided Mann-Whitney U-test. The means of three independent experiments are shown in **a**, **b**, **d** and **e**, and the means of four independent experiments are shown in **f**. Error bars indicate one s.d. from the mean.

generate A549 cell populations (Fig. 1f,g and Supplementary Fig. 2a) and clones (Supplementary Fig. 2b–e) lacking this isoform. All cultures in which the short isoform had been inactivated displayed diminished IFN α -induced suppression of IAV relative to control cells. We additionally created matching cell populations in which the integral membrane protein IFN-induced transmembrane protein 3 (IFITM3; ref. ⁶) was knocked out alone or in combination with NCOA7 (Fig. 1f,g). Reductions in IFN α -mediated inhibition were seen in cells that expressed or lacked NCOA7 in the context of IFITM3 knockout (around sixfold inhibition in single IFITM3 knockout versus 2.7-fold inhibition in IFITM3/NCOA7 double knockout), indicating that the antiviral effects of NCOA7 and IFITM3 are cumulative as well as independent.

To further verify that NCOA7 and IFITM3 inhibit IAV independent of each other, we showed (using knockout clonal lines) that NCOA7-mediated inhibition of infection is unaffected by IFITM3 knockout and vice versa (Supplementary Fig. 3a–c). Reintroduction

of codon-optimized NCOA7 isoform 4, which cannot be targeted by our guide RNAs, into NCOA7 knockout cell lines reconstituted the full IFN α -mediated inhibition of IAV (Supplementary Fig. 3d). Together, these findings confirm that NCOA7 is a significant component of IFN α -induced protection against IAV infection.

Next, we employed a series of sequential imaging flow cytometry-based assays to dissect the step(s) in IAV infection inhibited by NCOA7 (Fig. 2a) ^{14,15}. First, using A549 cells expressing NCOA7 or a negative control (CD8), we quantified low pH-induced conformational changes in haemagglutinin at 1 h post-infection using monoclonal antibody A1, which specifically recognizes acidified haemagglutinin ^{14,16}. Haemagglutinin acidification was not compromised in the presence of NCOA7 (Fig. 2b). Second, to study viral membrane fusion, we labelled IAV particles with the self-quenching dye SP-DiOC18. Fluorescence dequenching of SP-DiOC18 occurs on viral-endosome membrane fusion (reported to occur at pH < 5 for A/Victoria/3/75 and ~pH 5.5 for A/Eng/195/2009; refs ^{17,18}), and

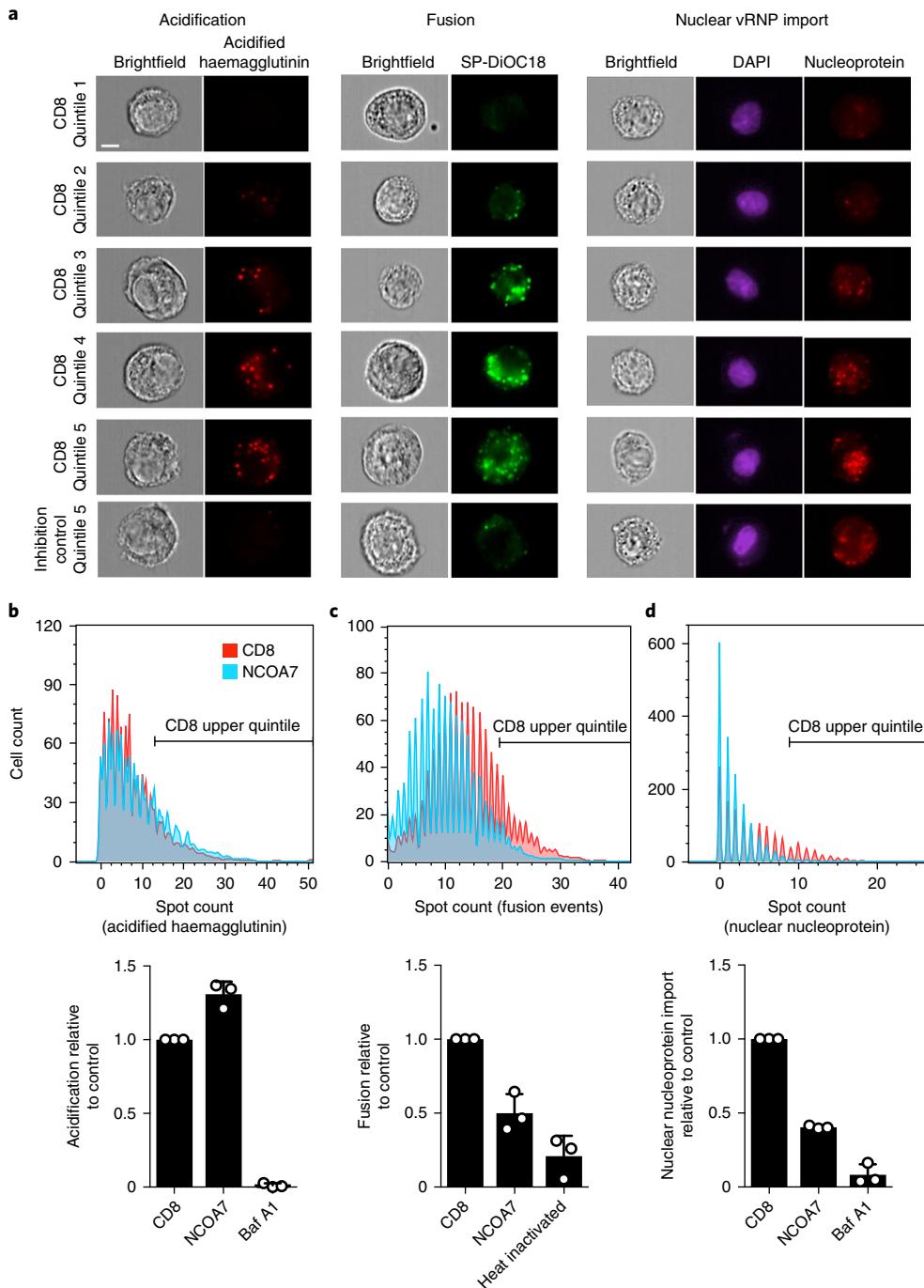


Fig. 2 | NCOA7 function inhibits IAV membrane fusion. **a**, Images from haemagglutinin acidification, IAV membrane fusion and nuclear vRNP import assays performed by imaging flow cytometry. For the acidification assay, A549 cells expressing NCOA7 or CD8, or treated for 1 h with bafilomycin A1, were challenged with A/Victoria/3/75 in serum-free medium. At 1 h, cells were fixed and stained with the A1 antibody that recognizes the acidified form of haemagglutinin. For the fusion assay, cells were challenged with SP-DiOC18-labelled A/Victoria/3/75 and fixed at 1.5 h post-infection. The control virus was heat inactivated before labelling and infection. For the nuclear vRNP import assay, cells were challenged with A/Eng/195/2009, and the medium was changed at 1 and 3 h while maintained in 1 mM cycloheximide. Cells were fixed at 5 h and stained with anti-nucleoprotein antibody; nuclei were demarcated with DAPI. Acidified haemagglutinin staining, fluorescent SP-DiOC18 and nuclear nucleoprotein spot counts were quantitated by imaging flow cytometry. Representative images (from three independent experiments) from spot-count-defined quintiles for the CD8 control population are shown in addition to the highest quintile for the bafilomycin A1 and heat-inactivation (inhibition) controls. Scale bar, 7 μ m. **b-d**, Top, histograms show spot-count distributions across the CD8 control and NCOA7 populations (equal numbers of cells displayed; >1,000 per condition) from a representative experiment for each assay; haemagglutinin acidification (**b**), IAV membrane fusion (**c**) and vRNP import (**d**) ($n=3$ independent experiments each). Populations are gated on the upper quintile of the CD8 control, with the bar graphs (bottom) indicating the mean relative proportion of the gated populations from three independent experiments. Error bars represent one s.d. from the mean.

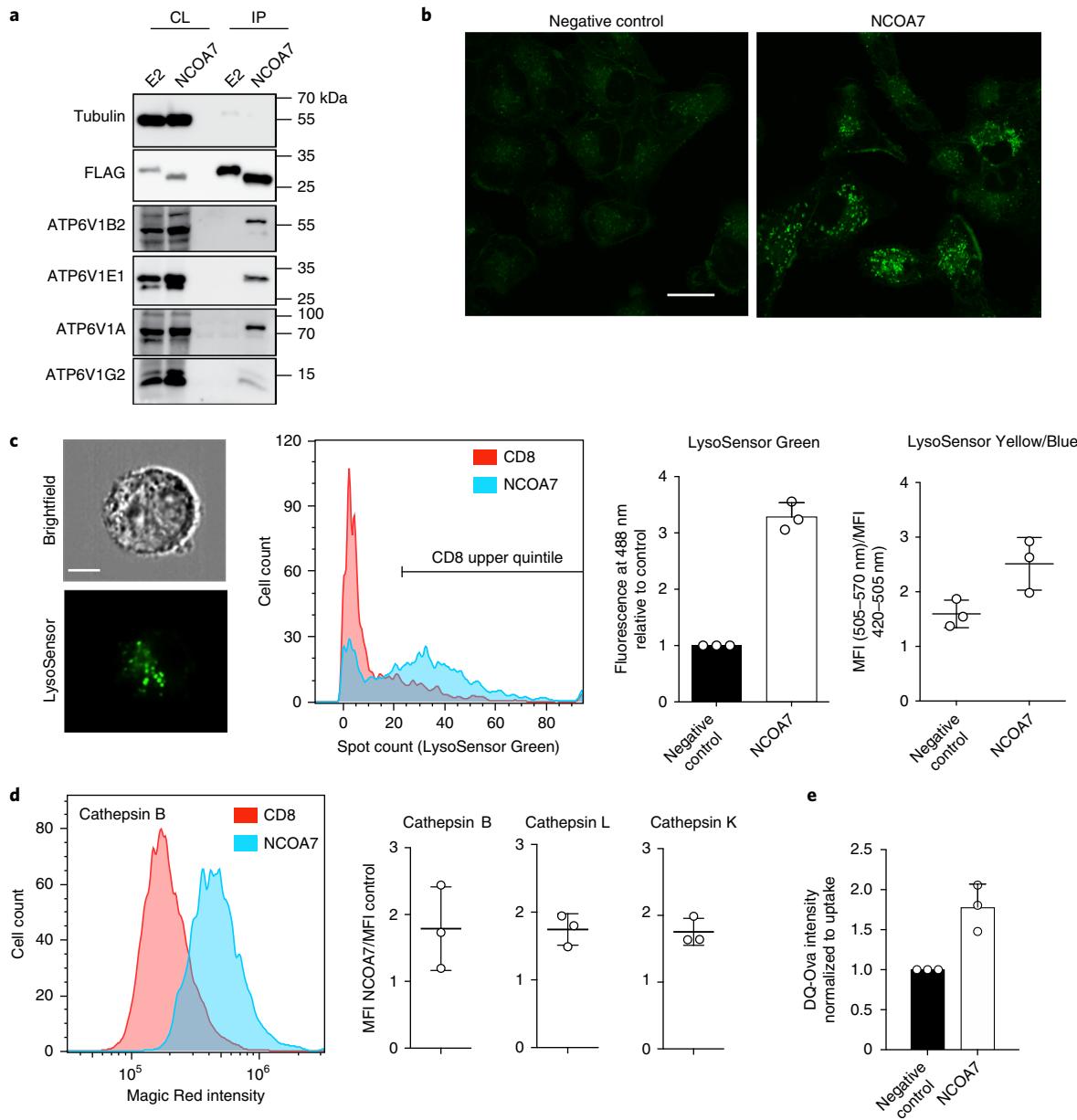


Fig. 3 | NCOA7 interacts with V-ATPase and promotes cytoplasmic vesicle acidification and lysosomal protease activation. **a**, U87MG cells were transduced with lentiviral vectors constitutively expressing Flag-tagged E2-crimson (E2) or NCOA7. Cells were lysed, and the Flag-tagged proteins recovered by immunoprecipitation and analysed by immunoblotting using anti-tubulin (loading control), anti-Flag, anti-ATP6V1B2, anti-ATP6V1A, anti-ATP6V1E or anti-ATP6V1G2 antibodies. One representative immunoblot from three independent experiments is shown. CL, whole cell lysate; IP, immunoprecipitate. **b**, A549 cells expressing NCOA7 or CD8 were plated on glass-bottomed dishes and treated for 1 h with 1 mM LysoSensor Green. Cells were subsequently washed, incubated in clear medium and visualized (live) by confocal microscopy. Representative images from three independent experiments are shown. Scale bar, 20 μ m. **c**, A549 cells (as in **b**) were seeded, treated with 0.1 μ M LysoSensor Green DND-189 for 1 h, or with 10 μ M LysoSensor Yellow/Blue DND-160 for 30 min, trypsinized and washed. For LysoSensor Green, fluorescent spot counts were determined by imaging flow cytometry and the data are represented as in Fig. 2. For LysoSensor Yellow/Blue, the ratio of the mean fluorescence intensity (MFI) of the cells in channels 420–505 nm and 505–570 nm was measured for the analysis (>2,000 cells per condition). Scale bar, 7 μ m. **d**, As in **c**, but the cells were trypsinized before treatment with Magic Red cathepsin B, L or K reagents for 1.5 h. Cells were fixed and analysed by imaging flow cytometry (>3,000 cells per condition are displayed). **e**, As in **c**, but cells were incubated in serum-free media containing 250 μ g ml⁻¹ of DQ-Ova or Ova-647 for 1 h followed by washing. Ova-647-containing cells were subsequently fixed, whereas DQ-Ova-containing samples were incubated for a further 4 h before washing and fixation. DQ-Ova fluorescence was enumerated by flow cytometry and Ova-647 was used to normalize for uptake. The mean of three independent experiments is shown, with error bars representing one s.d. from the mean.

there was a decrease of ~50% in the proportion of cells exhibiting high numbers of fusion events in the presence of NCOA7 (defined by the upper quintile of the control population) (Fig. 2c)¹⁴. NCOA7's ability to inhibit viral–endosome membrane fusion was indepen-

dently demonstrated by challenging U87MG CD4⁺ CXCR4⁺ cells expressing NCOA7 (or a control) with VSV-G-pseudotyped HIV-1 containing a β -lactamase/Vpr fusion protein that induces the cleavage of CCF2-AM dye on viral entry into the cytosol. After loading

cells with CCF2-AM dye, cleavage was analysed by flow cytometry, showing that cytosolic entry was consistently reduced in NCOA7-expressing cells (Supplementary Fig. 4a,b). Third, to examine the nuclear import of incoming viral ribonucleoproteins (vRNPs), we infected A549 cells with IAV at a high multiplicity of infection (MOI) in the presence of cycloheximide (to prevent de novo protein synthesis), and quantified nuclear nucleoprotein staining at 5 h. Consistent with the fusion assays, NCOA7 expression resulted in a decrease of ~60% in the number of cells exhibiting a high level of nucleoprotein import (defined by the control upper quintile) (Fig. 2d). Supplementary Fig. 4c confirms this result by confocal microscopy. In summary, our mapping strategy indicated that NCOA7 inhibits viral membrane fusion, whereas neither haemagglutinin acidification nor viral uptake into the endocytic pathway (Supplementary Fig. 4d) was compromised.

NCOA7 was first identified as an oestrogen receptor-associated protein that localizes to the nucleus on oestradiol treatment^{19,20}. It is thought to have arisen from gene duplication of its homologue, OXR1, with which it shares oxidation resistance properties²⁰. The short isoform of NCOA7, studied herein, has a unique amino-terminal region of 25 amino acids and otherwise contains the carboxy-terminal five exons of the longest isoform¹⁰. The carboxy-terminal region of OXR/NCOA7 comprises a TLDc (TBC/LysM domain-containing) domain, the function of which is currently not understood²⁰. In contrast with the longer isoforms, the short isoform displays cytoplasmic staining on stable expression (Supplementary Fig. 5a) with no observable co-localization or accumulation with markers of early/late endosomes (Supplementary Fig. 5a), and is the only isoform that is IFN inducible (and lipopolysaccharide inducible)¹⁰—a property presumably conferred by the canonical IFN-sensitive response element sequence located upstream of its unique amino-terminal exon (Supplementary Fig. 5b)¹⁰.

Previous proteomic analyses of the V-ATPase have reported interactions between the ATP6V1B1 subunit (a component of the catalytic motor) and both NCOA7 and OXR1 (refs ^{21,22}), consistent with activity as potential V-ATPase regulators²³. ATP6V1B1 is the B-subunit that is expressed primarily in kidney cells and cells of the inner ear, whereas ATP6V1B2 is expressed in non-renal tissues. Because NCOA7 disrupts endosome-mediated virus entry, we used co-immunoprecipitation to assess whether NCOA7 associates with ATP6V1B2. Flag-tagged NCOA7 (or E2-crimson) was expressed in U87MG cells, and whole cell lysates subjected to anti-Flag immunoprecipitation, followed by immunoblot analysis using an ATP6V1B2-specific antibody. As shown in Fig. 3a, interactions between the short isoform of NCOA7 and ATP6V1B2, as well as multiple other subunits of V-ATPase, were readily detected.

Next, we used cell-based assays of V-ATPase function to seek evidence of NCOA7-mediated upregulation. The effect of NCOA7 on cytoplasmic vesicle acidification was examined using LysoSensor Green DND-189 dye, the fluorescence dequenching of which is pH dependent (pK_a 5.2). Living cells were treated for 1 h before visualization, with NCOA7 expression markedly increasing the number of LysoSensor Green-positive punctae (Fig. 3c), as well as the fluorescence intensity in individual vesicles (Fig. 3b). Ratiometric pH analysis using LysoSensor Yellow/Blue demonstrated that this was at least partly due to true decreases in vesicular pH (Fig. 3c). These observations are consistent with NCOA7 promoting increased vesicular acidification through a regulatory interaction with V-ATPase.

The regulation of V-ATPase has been well described in the context of lipopolysaccharide-induced maturation of dendritic cells, where increased acidification results in increased antigen degradation in the lysosome and increased antigen presentation on major histocompatibility complex class II^{24,25}. To examine the effects of NCOA7 on V-ATPase-dependent lysosomal activation, we quantified the degradative activity of three different lysosomal cysteine

proteases—cathepsins B, L and K—using Magic Red assays, which employ cathepsin-specific target peptide sequences coupled to a fluorophore that is activated on peptide cleavage (thought to occur primarily within endolysosomes²⁶). As shown in Fig. 3d, the degradative activity of each cathepsin was substantially increased by NCOA7 expression. To verify that NCOA7 increases the degradation of endocytosed antigen (as opposed to membrane-permeable substrates), we measured the degradation rate of boron-dipyromethene dye-conjugated ovalbumin (DQ Ovalbumin (DQ-Ova)) by flow cytometry in NCOA7-expressing and control cells (controlling for any difference in endocytic uptake with Alexa Fluor 647-conjugated ovalbumin (Ova-647)). Fig. 3e shows that NCOA7 promotes the degradation of DQ-Ova, demonstrating that the increase in acid-dependent lysosomal protease activity enhances the degradation of material entering cells by endocytosis, further supporting the assertion that NCOA7 promotes V-ATPase activity.

Here, we identify the short isoform of human NCOA7 (isoform 4) as an IFN α -inducible inhibitor of viruses entering the cell by endocytosis. NCOA7 interacts with V-ATPase and stimulates vesicle acidification, lysosomal protease activity and the degradation of endocytosed material. These perturbations compromise the fusion capabilities of viruses that are adapted to the dynamics of the endolysosomal pathway, thereby inhibiting infection. The endocytic pathway is also important for the entry of many bacterial pathogens and toxins, and a role for OXR1/NCOA7 homologues has been suggested in protection from *Vibrio cholera* infection in *Drosophila* models²⁷. These findings add innate immunity to the growing number of biological contexts for which regulation of V-ATPase is a focus of investigation: for instance, cellular nutrition, the pathology of neurodegeneration, adaptive immunity and the growth of transformed cells^{24,28,29}. Finally, in addition to providing important insights into the antiviral action of IFN, the identification of this cytokine-responsive mechanism for regulating the endolysosomal system may facilitate therapeutic manipulation of disease processes that stem from V-ATPase-associated endolysosomal dysfunction.

Methods

Requests for materials. Requests for materials should be addressed to the corresponding authors.

Plasmids and constructs. The EasiLV system including pEasiLV-MCS and pEasiLV-CD8-Flag (negative control) has been described, as has the lentiviral vector system employing pRRL.sin.cPPT.CMV/IRES-puro.WPRE used for the generation of cell lines stably expressing genes of interest³. The cytomegalovirus promoter from the pRRL.sin.cPPT.CMV/IRES-puro.WPRE system was replaced with a spleen focus-forming virus promoter (amplified from HR SIN CSGW, a gift from P. Lehner and cloned using Clai/BamHI) to yield pRRL.sin.cPPT.SFFV/IRES-puro.WPRE. NCOA7 variant 6 (NM_001199622.1) (encoding isoform 4 NP_001186551.1) was amplified using the SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq (Invitrogen) from 100 ng RNA obtained from IFN α -treated monocyte-derived macrophages using primers 5'-aaatttgatccATGAGAGGCCAAAGATTACCCCTGG-3' and 5'-aaatttCTCGAGTCATCAAATGCCACACCTCCAG-3' (or the Flag-tagged 5'-aaatttgatccATGGACTACAAGACGACGACAAAAGAGGCCAAAGATTAC CCTTGG-3'). A codon-optimized version of the NCOA7 coding sequence, with the 25 first codons modified, was synthesized (Eurofins; 5'-atgcgcgtcgctgcgtccactagatattcaaatctttactgcgcgtccgataggaccgttcgtaaaa) and amplified by PCR. Firefly luciferase cDNA was amplified from pGL4 (Promega) and E2-crimson cDNA was amplified from pEasiLV-MCS. The cDNAs were inserted into BamHI-XhoI-digested pRRL.sin.cPPT.CMV/IRES-puro.WPRE, pRRL.sin.cPPT.SFFV/IRES-puro.WPRE or pEasiLV-MCS. NL4-3/Nef-IRES-GFP and NL4-3/Nef-IRES-Renilla were obtained from the National Institutes of Health (NIH) AIDS Reagent Program (pBR43IeG; catalogue number 11349) and S. Chanda, respectively. pBlM-Vpr and pAdVantage have been described³⁰.

HIV-1-, feline immunodeficiency virus-, simian immunodeficiency virus- and equine infectious anaemia virus-based vector plasmids, which express GFP on infection, have previously been described^{31–34}, as have the Env-encoding constructs phCMV-MLV-A³⁵, phCMV-RD114/TR³⁵ and pRABIES Env³⁶.

To modify the A/Victoria/3/75 polymerase acidic protein gene for co-expression with NanoLuc luciferase, a polymerase acidic protein-NanoLuc-encoding fragment³⁷, in which polymerase acidic protein is fused with the porcine teschovirus P2A and the NanoLuc luciferase gene, was inserted into the Pasi site

of the PolI-RT-Victoria polymerase acidic protein plasmid. The 12-plasmid system used to rescue IAV Victoria-NanoLuc reporter virus was provided by W. Barclay. The firefly luciferase gene from pHSP1-Firefly⁹ was replaced by the enhanced GFP (eGFP) coding sequence to generate pHSP1-eGFP.

HCV particles were generated using the cell culture-adapted clone J6/JFH-1 (ref. ³⁸).

The LentiCas9-Blast and LentiGuide-Puro vectors were a gift from F. Zhang³⁹ (Addgene). The LentiGuide-Neo vector was generated by replacing the puromycin resistance gene in LentiGuide-Puro with the neomycin resistance gene (amplified using PCR from pcDNA3.1+) and using BsiWI and MluI sites. Guide RNA coding oligonucleotides were annealed and ligated into BsmBI-digested LentiGuide-Puro or LentiGuide-Neo vectors, as described (Addgene). The guide RNA coding sequences used were as follows: g1-GFP 5'-gagctggacggcgcgtaaa, g1-CTRL 5'-aggcacgttaatgtccgttgtt, g2-CTRL 5'-caatcgccgacgtttataa, g1-IFITM3 5'-taggcctggaaatcgac, g1-NCOA7 5'-aaaaggcttcgtcggc, g2-NCOA7 5'-ttccaaaggcttcgtc and g3-NCOA7 5'-ggatgtccaaagggtatctt. The three NCOA7 guides were designed to target the first coding exon of NCOA7 variant 6 (NM_001199622.1), which is unique to the short IFN-inducible isoform 4 (NP_001186551.1) studied herein.

Cell lines. Human 293T, U87MG CD4⁺ CXCR4⁺⁹, A549, Madin-Darby canine kidney (MDCK) and Huh-7.5 cells were maintained in complete Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco) and THP-1 cells were maintained in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (Gibco), both supplemented with 10% foetal bovine serum and penicillin/streptomycin. Non-essential amino acids were added for Huh-7.5 cells. 293T, A549, MDCK and THP-1 cells were obtained from the American Type Culture Collection. Huh-7.5 cells were originally obtained from the Rice Laboratory⁴⁰. U87MG cells were originally obtained from the NIH AIDS Reagent Program and modified to express CD4 and CXCR4 (ref. ⁹). A549, 293T, U87MG CD4⁺ CXCR4⁺ and Huh-7.5 cells stably expressing NCOA7, CD8 or E2-crimson were generated by transduction with either RRL.sin.cPPT.CMV/IRES-puro, WPRE- or RRL.sin.cPPT.SFFV/IRES-puro, WPRE-containing vectors (cDNA as indicated) and maintained under 1 µg ml⁻¹ puromycin selection.

For CRISPR-Cas9-mediated gene disruption, A549 cells stably expressing Cas9 were first generated by transduction with the LentiCas9-Blast vector followed by blasticidin selection at 10 µg ml⁻¹. Cas9-expressing A549s were then transduced with guide RNA expressing LentiGuide-Puro and Lentiguide-Neo vectors and cells selected with antibiotics for at least 15 d. Single CRISPR-Cas9 knockout cellular clones were isolated using a FACS Aria IIu cell sorter (Becton Dickinson).

When indicated, IFN α (INTRON A; Merck Sharp & Dohme) was added at 1,000 U ml⁻¹ for 16–24 h before virus infection. Cells were treated with 50 nM baflomycin A1 (an inhibitor of V-ATPase) (Sigma-Aldrich) for 1 h before infection and throughout the assay where indicated; cycloheximide (Sigma-Aldrich) was used at 1 mM to prevent de novo protein synthesis, and the media was replenished every 2 h if required.

Lentiviral production and infection. Lentiviral vector stocks were obtained by polyethylenimine, Transit-2020 (Mirus Bio) or Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific)-mediated multiple transfection of 293T cells in six-well plates with vectors expressing Gag-Pol, the miniviral genome, the Env glycoprotein and, when required (that is, for EasiLV production), a TetR-KRAB expression plasmid⁴¹ (pptTRKrab) at a ratio of 1:1:0.25:0.5. The culture medium was changed 6 h post-transfection, and vector-containing supernatants were harvested 36 h later, filtered and stored at -80 °C. Wild-type HIV-1 particles (NL4-3/Nef-IRES-GFP and NL4-3/Nef-IRES-Renilla) were generated by polyethylenimine-based transfection of 293T cells. β -lactamase-Vpr (BlaM-Vpr)-carrying viruses, VSV-G-pseudotyped or bearing the wild-type Env, were produced by co-transfection of 293T cells with pMD.G (or not), the NL4-3/Nef-IRES-Renilla provirus expression vector, pBlaM-Vpr and pAdVantage at a ratio of (1.33):4:1:0.5, as previously described³⁰.

For the EasiLV-based experiments, U87MG CD4⁺ CXCR4⁺ cells were transduced with EasiLV stocks encoding genes of interest and the medium changed at 6 h. Doxycycline (0.4–1 µg ml⁻¹) was added for 24–48 h, and the cells were plated at 2.5 × 10⁴ per well in 96-well plates, then challenged with GFP-expressing virus stocks or NL4-3. The percentage of infected, GFP-expressing cells was enumerated by flow cytometry 48 h after infection.

HIV-1_{NL4-3}-containing, filtered supernatants were routinely purified by ultracentrifugation through a sucrose cushion (20% w/v; 75 min; 4 °C, 28,000 r.p.m. using a Beckman Coulter SW 32 rotor), resuspended in DMEM medium without serum and stored in small aliquots at -80 °C. Viral particles were normalized by p24^{Gag} enzyme-linked immunosorbent assay or p24^{Gag} AlphaLisa (PerkinElmer) and/or by determining their infectious titres on U87MG cells (for GFP-expressing lentiviral vectors, retroviral vectors and HIV-1). The MOI for lentiviral vector stocks was determined by infecting a known number of cells with standardized amounts of viral particles and evaluating by flow cytometry the percentage of infected cells 2–3 d later. For instance, an MOI of 0.1 would theoretically correspond to the volume of virus necessary to obtain 10% of GFP-expressing cells.

IAV production and infection. A/Eng/195/2009 and A/Victoria/3/75 particles were provided by W. Barclay and amplified in MDCK cells using serum-free

DMEM containing 0.5 µg ml⁻¹ L-1-p-Tosylamino-2-phenylethyl chloromethyl ketone (TPCK)-treated trypsin (Sigma-Aldrich). Stocks were titrated by plaque assays on MDCK cells, or on A549 cells to determine MOIs defined by the proportion of nucleoprotein-positive nuclei at 12 h post-infection. A 12-plasmid system was used to rescue A/Victoria/3/75 and the IAV Victoria-NanoLuc reporter virus. The 8 PolI plasmids (0.5 µg each) and 4 rescue plasmids (PB1, PB2 and polymerase acidic protein (0.32 µg each) and nucleoprotein (0.64 µg)) were co-transfected into 293T cells in 6-well plates using Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific). After 24 h, the cells were removed and co-cultured with MDCK cells in 25 ml flasks. The first 8 h of co-culture was carried out in 10% serum, after which the medium was replaced with serum-free medium containing 0.5 µg ml⁻¹ of TPCK-treated trypsin. Supernatants from day 5 post-transfection were used for virus amplification on MDCK cells.

All IAV challenges were performed in serum-free DMEM for 1 h (unless otherwise specified) and the medium was subsequently replaced with DMEM containing 10% foetal bovine serum (where the experiment lasted more than 1.5 h). For microscopy-based infectivity assays, A549 cells stably expressing CD8 or NCOA7 were plated on coverslips in 12-well plates at a density of 1 × 10³ cells per well. The following day, cells were infected with A/Eng/195/2009 (MOI = 10). Fixation was performed at 5 h post-infection using 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffered saline (PBS) for 10 min, and the cells were permeabilized using 0.2% Triton X-100 for 10 min. After quenching and blocking in buffer NGB (50 mM NH₄Cl, 2% goat serum and 2% bovine serum albumin in PBS) for 1 h, cells were incubated with anti-nucleoprotein antibody (Hb65; provided by Y. Yamauchi)⁴², diluted in buffer NGB for 1 h and subsequently incubated with an Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse secondary antibody. Cells were then stained with 1 µg ml⁻¹ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), washed, mounted on coverslips and examined using a Nikon A1 confocal microscope (10× objective) with captured images analysed using Fiji⁴³ to determine the percentage of GFP-expressing cells. For time-lapse microscopy, 293T cells stably expressing CD8 or NCOA7 were seeded (5 × 10⁴ per well) in a 48-well plate and transfected with 0.1 µg pHSP1-eGFP using Lipofectamine 2000 (Thermo Scientific). pHSP1-eGFP is a minigenome-like reporter construct that expresses GFP and, when transfected into target cells, is transcribed by host RNA polymerase to produce a negative sense, viral genomic-like segment (with 5'-triphosphate and 3'-hydroxyl). On IAV infection, this segment is recognized by the viral RNA polymerase to generate GFP-expressing messenger RNA (mRNA). After ~24 h, the cells were infected with A/Eng/195/2009 (MOI = 1), then monitored by time-lapse microscopy with images acquired at 20-min intervals from 2 to ~18 h post-infection using a Nikon Ti-Eclipse wide-field inverted microscope (40× objective) and controlled by NIS-Elements software. Videos were created using Fiji⁴². The Victoria-NanoLuc infection experiments were performed in duplicate or triplicate in 96-well plates with cultures maintained for 7 h post-challenge. NanoLuc activity was measured with the Nano-Glo assay system (Promega), and luminescence was detected using a plate reader (Infinite 200 PRO; Tecan).

HCV production and infection. Cell culture-derived HCV particle stocks were produced by electroporation of in vitro-transcribed viral RNA into Huh-7.5 cells using a Gene Pulser Xcell (Bio-Rad)⁴³. A cell culture-adapted J6/JFH-1 derivative virus named Clone 2 was used for this study. Virus-containing supernatants were collected 48, 72 and 96 h post-electroporation and titrated by limiting dilution assay, as described⁴⁴. Transduced Huh-7.5 cells were seeded in 24-well plates, challenged with virus (MOI = 0.5) and incubated for 48 h. Cells were harvested using Accumax (eBioscience), fixed with 4% PFA, permeabilized with PBS-saponin (0.2%) and stained for 1 h at room temperature with an Alexa Fluor 647-conjugated antibody (YE10 clone) specific for the HCV non-structural protein NS5A in PBS-saponin (0.2%). The percentage of infected cells was determined by flow cytometry.

Quantification of mRNA expression. 3–5 × 10⁵ cells with or without 24 h treatment with IFN α were harvested and total RNA was extracted using an RNeasy kit (Qiagen) employing on-column DNase treatment. Some 500 ng RNA was used to generate cDNA, which was analysed by quantitative PCR using TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) for ACTB (Hs99999903_m1) or GAPDH (Hs99999905_m1). For the short isoform of NCOA7, the primers used were 5'-GATTACCTCTGGACATCCAGATTCTATT-3' and 5'-CACCTCTCGCTCTCGTCTCATAGT-3', and the probe sequence was 5'-FAM-AGGCCAAAGCGCAGGAAGAGCACATGC-TAMRA-3'. Triplicate reactions were run according to the manufacturer's instructions using an ABI Prism model 7900HT sequence-detection platform, and the data were analysed using RQ software (Applied Biosystems). GAPDH and ACTB mRNA expression was used to normalize the samples.

T7 endonuclease assay. To assess CRISPR-Cas9-mediated editing of the NCOA7 and IFITM3 loci, genomic DNA was extracted from cell populations (DNeasy; Qiagen) and an amplicon spanning the targeted genomic region was generated on 50 ng DNA by touch-down PCR using the primers 5'-tgctggtagaaatgtcagcacaatccccc-3' and 5'-aaagtctatttactctaaatccatccccccc-3', 5'-tccctgtatcgccgggg and 5'-aggccgaaccaggc, respectively. Amplicons

were then subjected to denaturation, re-annealing and T7 endonuclease (NEB) digestion.

Indirect immunofluorescence. For visualization of NCOA7 localization by confocal microscopy, U87MG CD4⁺ CXCR4⁺ cultures were transduced with lentiviral vectors containing Flag-tagged NCOA7, as described above, and subsequently plated on coverslips treated with poly-L-lysine. Fixation, staining with anti-Flag antibody (Sigma-Aldrich F3165 or F7425, or Miltenyi 130-101-576), anti-EEA1 (BD Biosciences 610457), anti-CD63 (Santa-Cruz sc5275) and anti-Lamp1 (Sigma-Aldrich L1418), and Alexa Fluor 488- and Alex Fluor 546-conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary, and image acquisition were performed as in previous sections with a Zeiss LSM880 confocal microscope.

Influenza A virus uptake assay. Stably expressing E2-crimson- or NCOA7-A549 cells were seeded at 10⁵ cells per well in 12-well plates. The following day, medium was removed and cells were incubated in serum-free DMEM with 3 × 10⁵ and 1.5 × 10⁶ plaque-forming units of A/Victoria/3/75 for 20 min at 37 °C. A heat-inactivated virus was used at the highest viral input as a negative control. Cells were then trypsinized, washed and fixed in 2% PFA. BD Perm/Wash (BD Biosciences) was used to permeabilize the cells, and they were stained with anti-nucleoprotein antibody (Hb65) and Alexa Fluor 488 secondary antibody according to the manufacturer's instructions. Cells were analysed using a NovoCyte (Ozyme) cytometer.

Haemagglutinin acidification assay. A549 cells, parental or stably expressing CD8 or NCOA7, were seeded in six-well plates. Unmodified cells were treated with 50 nM baflomycin A1 for 1 h before infection (inhibition control). Medium was removed and cells were infected in serum-free DMEM with A/Victoria/3/75 at an MOI of 30 and incubated for 1 h at 37 °C. Cells were then trypsinized, and both fixed and stained using IntraStain (Dako) with monoclonal antibody A1 (ref. ¹⁴), which is specific for haemagglutinin that has undergone low pH-induced conformational change (provided by Y. Yamauchi). Alexa Fluor 647-conjugated anti-mouse total immunoglobulin G (Life Technologies) was used as a secondary antibody, and cells were analysed by imaging flow cytometry (see below) using the 647 nm laser for excitation.

Membrane fusion assay. A/Victoria/3/75 was labelled with the self-quenching dye SP-DiOC18(3) (Molecular Probes). SP-DiOC18(3) was added to 1 ml of virus stock in serum-free DMEM (containing approximately 2.5 × 10⁷ infectious units per ml) at a final concentration of 0.2 μM in a screw-capped Eppendorf tube¹⁵. The tube was protected from light, incubated while rolling for 1 h at room temperature and subsequently stored at –80 °C or used as required. For the heat-inactivation control, virus was kept at 75 °C for 30 min and returned to room temperature before labelling. Labelled virus preparations were passed through a 0.45 μm filter. Labelled virus was diluted in serum-free DMEM for infection of CD8- or NCOA7-expressing A549 monolayers at an MOI of 10. Cells were incubated for 1.5 h after infection, harvested with trypsin, fixed with 4% PFA for 10 min and analysed by imaging flow cytometry using the 488 nm laser for excitation.

BlaM-Vpr assay for lentiviral entry. The BlaM-Vpr assay has previously been described¹⁶. Briefly, 2 × 10⁵ E2-crimson- or NCOA7-expressing U87MG CD4⁺ CXCR4⁺ cells were plated in 24-well plates the day before infection. Cells were mock infected or incubated with increasing amounts of VSV-G-pseudotyped, or wild-type Env-carrying, BlaM-Vpr-containing NL4-3/Nef-IRES-Renilla viruses (31.2, 62.5 or 125 ng p24) for 3 h. Cells were then washed once in CO₂-independent media and loaded with CCF2-AM substrate (Invitrogen) containing development media (CO₂-independent media containing 1.6 mM probenecid) for 2 h at room temperature before 2 washes and incubation at room temperature for 16 h in development media. Finally, cells were harvested, washed and fixed in 2% PFA, before analysis using a FACSCanto II (BD Biosciences).

vRNP import assay. A549 cells were plated and unmodified cells treated with baflomycin A1 as above. Cycloheximide (1 mM) was maintained in the medium throughout the experiment. Cells were infected with A/Eng/195/2009 at an MOI of 10. The medium was changed at 1 h (as above) and again at 3 h to ensure optimal cycloheximide activity. Cells were fixed in 4% PFA at 5 h, then stained with anti-nucleoprotein (Hb65) antibody and secondary antibody, as above, using Perm/Wash (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. DAPI staining was used to demarcate the nucleus (0.1 μg ml^{–1} for 5 min). Cells were analysed by imaging flow cytometry using a 642 nm laser for excitation. For the parallel visualization of nuclear vRNP import by confocal microscopy, cells were plated on coverslips as described above. Infection conditions were identical, and staining and image acquisition were performed as described.

Vesicle acidification and cathepsin activity assays. Transduced A549 cells were plated in 6-well plates and treated with 0.1 μM LysoSensor Green DND-189 (Molecular Probes) for 1 h, or with 10 μM LysoSensor Yellow/Blue DND-160 for 30 min at 37 °C. Cells were subsequently trypsinized, washed and resuspended for immediate analysis by imaging flow cytometry. A 488 nm laser was used for

LysoSensor Green. For LysoSensor Yellow/Blue, a 405 nm laser was used for excitation and the ratio of the mean fluorescence intensity of the cells in channels 420–505 nm and 505–570 nm was measured for the analysis. For analysis by confocal microscopy, A549 cells were plated in glass-bottomed dishes and, the following day, treated with 1 μM LysoSensor Green for 1 h. Living cells were subsequently washed and visualized using a Nikon A1R confocal microscope and 488 nm laser. To analyse cathepsin B, L and K activity, the Magic Red reagents (ImmunoChemistry Technologies) specific for each of these proteases were reconstituted in DMSO and subsequently diluted in distilled H₂O to form a 26× solution as per the manufacturer's instructions. Approximately 5 × 10⁵ transduced A549 cells were trypsinized from a 6-well plate and resuspended in 150 μl medium, to which the reagent was added. Cells were incubated for 1.5 h at 37 °C, washed, fixed in 2% PFA and analysed by imaging flow cytometry using a 561 nm laser for excitation.

Ovalbumin degradation assay. CD8- or NCOA7-expressing cells were plated in 48-well plates. Cells were incubated in serum-free media containing 250 μg ml^{–1} of DQ-Ova, which emits fluorescence on degradation, or Ova-647 for 1 h at 37 °C followed by washing. Ova-647-containing cells were subsequently fixed, whereas DQ-Ova-containing samples were incubated for a further 4 h at 37 °C before washing and fixation. DQ-Ova and Ova-647 fluorescence were enumerated by flow cytometry. DQ-Ova fluorescence at 4 h was normalized by Ova-647 at 1 h to allow for any differences in uptake of the reagent.

Imaging flow cytometry and flow cytometry. Cells were processed using an Amnis ImageStreamX at 60× magnification with the indicated excitation laser, in addition to the brightfield system, according to the manufacturer's instructions. Amnis IDEAS software was used to analyse the data. The IDEAS automated spot-counting wizard, performed on the CD8-expressing population, was used to determine the optimal spot-counting algorithm for individual experiments. For the nuclear vRNP import assay, spot counting was performed on the 'mask' (region of interest) demarcated by DAPI staining using a threshold of 40% of the maximum DAPI staining intensity. Standard flow cytometry was performed using the FACSCanto II (BD Biosciences) or the NovoCyte (Ozyme).

Co-immunoprecipitation and immunoblot analysis. U87MG cells were stably transduced with vectors carrying RRL.sin.cPPT.CMV/Flag-NCOA7.WPRE or RRL.sin.cPPT.CMV/Flag-E2-crimson-WPRE and selected with 1 μg ml^{–1} puromycin. Some 15–22 × 10⁶ cells were washed twice in cold PBS and resuspended in lysis buffer (20 mM Hepes-NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40 and protease inhibitor cocktail). The lysates were clarified by centrifugation at 1,000g, for 10 min at 4 °C and then incubated with Flag-magnetic beads (Life Technologies) for 3 h at 4 °C. The beads were washed 5 times and the immunoprecipitated proteins eluted using 3× Flag peptide (150 μg ml^{–1}; Sigma-Aldrich) for 1.5–2 h. Cell lysates and immunoprecipitation eluates were supplemented with sample buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate, 5% glycerol, 100 mM dithiothreitol and 0.02% bromophenol blue), resolved by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and analysed by immunoblotting using primary antibodies specific for the Flag epitope (Sigma-Aldrich F3165), tubulin (mouse monoclonal DM1A; Sigma-Aldrich T9026), ATP6V1B2 (Proteintech 15097-1-AP), ATP6V1A (Proteintech 17115-1-AP), ATP6V1E1 (Abcam Ab111733) and ATP6V1G2 (Proteintech 25316-1-AP), followed by secondary horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin antibodies and chemiluminescence Clarity or Clarity Max substrate (Bio-Rad). A Bio-Rad ChemiDoc imager was used.

Statistical analysis. Statistical significance was determined by two-tailed Mann-Whitney *U*-test in Fig. 1g and Supplementary Fig. 2d.

Reporting Summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The datasets generated and/or analysed during the current study are available from the corresponding authors on reasonable request.

Received: 27 July 2018; Accepted: 24 September 2018;
Published online: 26 November 2018

References

- Doyle, T., Goujon, C. & Malim, M. H. HIV-1 and interferons: who's interfering with whom? *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 403–413 (2015).
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A. & O'Garra, A. Type I interferons in infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 87–103 (2015).
- Randall, R. E. & Goodbourn, S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* **89**, 1–47 (2008).
- Iwasaki, A. & Pillai, P. S. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 315–328 (2014).

5. Haller, O. & Kochs, G. Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *J. Interferon Cytokine Res.* **31**, 79–87 (2011).
6. Brass, A. L. et al. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* **139**, 1243–1254 (2009).
7. Everitt, A. R. et al. IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. *Nature* **484**, 519–523 (2012).
8. Goujon, C. & Malim, M. H. Characterization of the alpha interferon-induced postentry block to HIV-1 infection in primary human macrophages and T cells. *J. Virol.* **84**, 9254–9266 (2010).
9. Goujon, C. et al. Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* **502**, 559–562 (2013).
10. Yu, L. et al. Induction of a unique isoform of the NCOA7 oxidation resistance gene by interferon β-1b. *J. Interferon Cytokine Res.* **35**, 186–199 (2015).
11. Naldini, L. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263–267 (1996).
12. Herold, N. et al. HIV-1 entry in SupT1-R5, CEM-ss, and primary CD4+ T cells occurs at the plasma membrane and does not require endocytosis. *J. Virol.* **88**, 13956–13970 (2014).
13. Mercer, J., Schelhaas, M. & Helenius, A. Virus entry by endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 803–833 (2010).
14. Banerjee, I., Yamauchi, Y., Helenius, A. & Horvath, P. High-content analysis of sequential events during the early phase of influenza A virus infection. *PLoS ONE* **8**, e68450 (2013).
15. Banerjee, I. et al. Influenza A virus uses the aggresome processing machinery for host cell entry. *Science* **346**, 473–477 (2014).
16. Webster, R. G., Brown, L. E. & Jackson, D. C. Changes in the antigenicity of the hemagglutinin molecule of H3 influenza virus at acidic pH. *Virology* **126**, 587–599 (1983).
17. Shelton, H., Roberts, K. L., Molesti, E., Temperton, N. & Barclay, W. S. Mutations in haemagglutinin that affect receptor binding and pH stability increase replication of a PR8 influenza virus with H5 HA in the upper respiratory tract of ferrets and may contribute to transmissibility. *J. Gen. Virol.* **94**, 1220–1229 (2013).
18. Russier, M. et al. Molecular requirements for a pandemic influenza virus: an acid-stable hemagglutinin protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **113**, 1636–1641 (2016).
19. Shao, W., Halachmi, S. & Brown, M. ERAP140, a conserved tissue-specific nuclear receptor coactivator. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3358–3372 (2002).
20. Durand, M. et al. The OXR domain defines a conserved family of eukaryotic oxidation resistance proteins. *BMC Cell. Biol.* **8**, 13 (2007).
21. Merkulova, M. et al. Mapping the H⁺ (V)-ATPase interactome: identification of proteins involved in trafficking, folding, assembly and phosphorylation. *Sci. Rep.* **5**, 14827 (2015).
22. Huttlin, E. L. et al. The BioPlex network: a systematic exploration of the human interactome. *Cell* **162**, 425–440 (2015).
23. Merkulova, M. et al. Targeted deletion of the *Ncoa7* gene results in incomplete distal renal tubular acidosis in mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **315**, F173–F185 (2018).
24. Trombetta, E. S., Ebersold, M., Garrett, W., Pypaert, M. & Mellman, I. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* **299**, 1400–1403 (2003).
25. Cotter, K., Stransky, L., McGuire, C. & Forgac, M. Recent insights into the structure, regulation, and function of the V-ATPases. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 611–622 (2015).
26. Bright, N. A., Davis, L. J. & Luzio, J. P. Endolysosomes are the principal intracellular sites of acid hydrolase activity. *Curr. Biol.* **26**, 2233–2245 (2016).
27. Wang, Z., Berkey, C. D. & Watnick, P. I. The *Drosophila* protein mustard tailors the innate immune response activated by the immune deficiency pathway. *J. Immunol.* **188**, 3993–4000 (2012).
28. Colacurcio, D. J. & Nixon, R. A. Disorders of lysosomal acidification—the emerging role of v-ATPase in aging and neurodegenerative disease. *Ageing Res. Rev.* **32**, 75–88 (2016).
29. Sennoune, S. R. & Martinez-Zaguilan, R. Vacuolar H⁺-ATPase signaling pathway in cancer. *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**, 152–163 (2012).
30. Cavrois, M., De Noronha, C. & Greene, W. C. A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. *Nat. Biotechnol.* **20**, 1151–1154 (2002).
31. Mangeot, P. E. et al. High levels of transduction of human dendritic cells with optimized SIV vectors. *Mol. Ther.* **5**, 283–290 (2002).
32. Saenz, D. T., Teo, W., Olsen, J. C. & Poeschla, E. M. Restriction of feline immunodeficiency virus by Ref1, Lv1, and primate TRIM5α proteins. *J. Virol.* **79**, 15175–15188 (2005).
33. O'Rourke, J. P., Newbound, G. C., Kohn, D. B., Olsen, J. C. & Bunnell, B. A. Comparison of gene transfer efficiencies and gene expression levels achieved with equine infectious anemia virus- and human immunodeficiency virus type 1-derived lentivirus vectors. *J. Virol.* **76**, 1510–1515 (2002).
34. Jarrosson-Wuilleme, L. et al. Transduction of nondividing human macrophages with gammaretrovirus-derived vectors. *J. Virol.* **80**, 1152–1159 (2006).
35. Sandrin, V. et al. Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34⁺ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* **100**, 823–832 (2002).
36. Wickersham, I. R., Finke, S., Conzelmann, K. K. & Callaway, E. M. Retrograde neuronal tracing with a deletion-mutant rabies virus. *Nat. Methods* **4**, 47–49 (2007).
37. Tran, V., Moser, L. A., Poole, D. S. & Mehle, A. Highly sensitive real-time in vivo imaging of an influenza reporter virus reveals dynamics of replication and spread. *J. Virol.* **87**, 13321–13329 (2013).
38. Walters, K. A. et al. Genomic analysis reveals a potential role for cell cycle perturbation in HCV-mediated apoptosis of cultured hepatocytes. *PLoS Pathog.* **5**, e1000269 (2009).
39. Sanjana, N. E., Shalem, O. & Zhang, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* **11**, 783–784 (2014).
40. Blight, K. J., McKeating, J. A. & Rice, C. M. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* **76**, 13001–13014 (2002).
41. Mangeot, P. E. et al. Protein transfer into human cells by VSV-G-induced nanovesicles. *Mol. Ther.* **19**, 1656–1666 (2011).
42. Schindelin, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
43. Lindenbach, B. D. et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**, 623–626 (2005).
44. Catanese, M. T. et al. Different requirements for scavenger receptor class B type I in hepatitis C virus cell-free versus cell-to-cell transmission. *J. Virol.* **87**, 8282–8293 (2013).
45. Sakai, T. et al. Dual wavelength imaging allows analysis of membrane fusion of influenza virus inside cells. *J. Virol.* **80**, 2013–2018 (2006).

Acknowledgements

We thank W. Barclay, F. Blanchet, M. Bonazzi, L. Espert, M. Huttunen, J. Long, E. Martinez, J. Mercer, D. Muriaux, P. Rocha, R. Schulz and Y. Yamauchi for generous provision of reagents and helpful discussions. We are grateful to A. Vaughan for instruction in IAV amplification, P. J. Chana (Biomedical Research Centre (BRC) Flow Core) for training and advice on imaging flow cytometry, I. Ali (King's College London Nikon Imaging Centre) for advice with confocal microscopy and image acquisition, I. Parham for help with the time-lapse microscopy, and M. Boyer and B. Monterroso ('MRI' imaging and flow cytometry facility) for cell sorting and advice with flow cytometry and confocal microscopy, respectively. This work was supported by the UK Medical Research Council (G1000196 to M.H.M.), the Wellcome Trust (106223/Z/14/Z to M.H.M.), the NIH (DA033773), a Wellcome Trust Research Training Fellowship and National Institute for Health Research BRC King's Prize Fellowship (to T.D.), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (to C.G.), the European Research Council under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (grant agreement number 759226 to C.G.), the ATIP-Avenir Program (to C.G.), institutional funds from the Centre National de la Recherche Scientifique and Montpellier University (to C.G.), France Recherche Nord & Sud Sida/HIV et Hépatites (to O.M.), a PhD studentship from the Ministry of Higher Education and Research (to B.B.), King's College London departmental start-up funds (to M.-T.C.), and the Department of Health via a National Institute for Health Research BRC award to Guy's and St. Thomas' NHS Foundation Trust in partnership with King's College London and King's College Hospital NHS Foundation Trust. We acknowledge the imaging facility MRI, a member of the national infrastructure France-BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04).

Author contributions

T.D., O.M., M.-T.C., C.G. and M.H.M. conceived and designed the experiments. T.D., O.M., B.B., D.P., M.L., M.T., L.A. and C.G. performed the experiments. All authors analysed the data. T.D., C.G. and M.H.M. wrote the manuscript with input from all authors.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0273-9>.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.G. or M.H.M.

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

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2018

Annexe 2 : Arnaud-Arnould *et al.*, *Acta-crystallographica section F*,
2021



Received 12 May 2021

Accepted 2 July 2021

Edited by M. W. Bowler, European Molecular Biology Laboratory, France

Keywords: viral restriction factors; oxidation resistance; TLDc; human NCOA7-AS.**PDB reference:** human TLDc domain, 7obp**Supporting information:** this article has supporting information at journals.iucr.org/f

Crystal structure of the TLDc domain of human NCOA7-AS

Mary Arnaud-Arnould, Marine Tauziet, Olivier Moncorgé, Caroline Goujon and Mickaël Blaise*

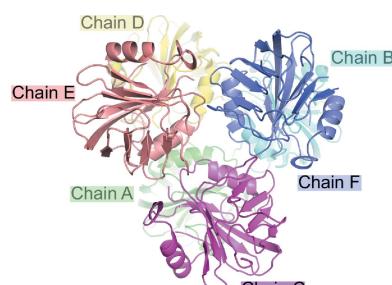
IRIM, CNRS, 34293 Montpellier, France. *Correspondence e-mail: mickael.blaise@irim.cnrs.fr

The TLDc [Tre2/Bub2/Cdc16 (TBC), lysin motif (LysM), domain catalytic] domain is associated with oxidation-resistance related functions and is well conserved among eukaryotes. Seven proteins possess a TLDc domain in humans, notably proteins belonging to the oxidation resistance protein (OXR), nuclear receptor coactivator 7 (NCOA7) and TBC1 domain family member 24 (TBC1D24) families. Although the mechanism is unknown, a protective role of TLDc proteins against oxidative stress, notably in the brain, has been demonstrated. Neurobiological disorders caused by mutations in the TLDc domain have also been reported. The human *NCOA7* gene encodes several mRNA isoforms; among these, isoform 4, named *NCOA7-AS*, is up-regulated by type 1 interferon in response to viral infection. NCOA7 and NCOA7-AS both interact with several subunits of the vacuolar proton pump V-ATPase, which leads to increased acidification of the endolysosomal system and consequently impairs infection by viruses that enter their host cells through the endosomal pathway, such as influenza A virus and hepatitis C virus. Similarly to full-length NCOA7, NCOA7-AS possesses a TLDc domain in its C-terminus. Structures of TLDc domains have been reported from zebrafish and fly but not from humans. Here, the expression, purification and crystallization of the TLDc domain from NCOA7 and NCOA7-AS is reported. The crystal structure solved at 1.8 Å resolution is compared with previously solved three-dimensional structures of TLDc domains.

1. Introduction

Nuclear receptor coactivator 7 (NCOA7) belongs to the TLDc [Tre2/Bub2/Cdc16 (TBC), lysin motif (LysM), domain catalytic] domain-containing family of proteins. In human and mouse, seven TLDc domain-containing proteins have been reported, among which are oxidation resistance (OXR) proteins 1 and 2 and NCOA7 short and long [alternative start (AS) and full-length (FL), respectively] isoforms (Volkert *et al.*, 2000; Durand *et al.*, 2007; Finelli & Oliver, 2017). NCOA7-FL associates with the estrogen receptor and has been reported to translocate to the nucleus upon estradiol treatment, where it was suggested to act as a transcriptional coregulator (Shao *et al.*, 2002). In addition, TLDc domain-containing proteins have been shown to play a protective role against oxidative stress, notably in the brain, through an unknown mechanism (Finelli *et al.*, 2016; Finelli & Oliver, 2017). The short isoform of NCOA7, NCOA7-AS, does not seem to share this property and is uniquely regulated by type 1 interferon (IFN) via an internal promoter (Yu *et al.*, 2015).

Additional functions have recently been attributed to NCOA7-AS, which plays a significant role in the IFN-induced control of influenza A virus (IAV). NCOA7-AS notably impairs IAV replication in pulmonary cells through the



OPEN ACCESS

regulation of V-ATPase activity (Doyle *et al.*, 2018). As previously shown for NCOA7-FL (Merkulova *et al.*, 2015), NCOA7-AS interacts with several subunits of the vacuolar V-ATPase, the proton pump responsible for endosomal acidification (Doyle *et al.*, 2018). NCOA7-AS and NCOA7-FL mostly share the TLDc domain, pinpointing a probable role for this domain in interaction with the V-ATPase. Through an as yet unelucidated mechanism, this interaction leads to greater acidification of the endolysosomal system, which increases antigen degradation and is detrimental to IAV, possibly by irreversibly affecting the ability of haemagglutinin to allow fusion with the host cells (Doyle *et al.*, 2018). In line with this finding, the *NCOA7* locus has been shown to be important for regulation of V-ATPase function. Interestingly, NCOA7-FL has been shown to interact with the vacuolar V-ATPase in the brain, which enables the correct assembly and transport activity of the proton pump (Castroflorio *et al.*, 2021). Similar to the NCOA7 isoforms, the OXR1 TLDc protein has also been identified as a V-ATPase partner, suggesting that regulation of the V-ATPase could be a common feature of TLDc family members (Merkulova *et al.*, 2015). Despite these findings, the function of the TLDc domain is not yet clearly established and it is not known whether this domain is solely responsible for direct interaction with the V-ATPase.

Mutations in genes encoding TLDc domain-containing proteins have been reported in several human diseases (Finelli & Oliver, 2017). Missense mutations in the TLDc domain found at the C-terminus of the TBC1D24 protein trigger multiple phenotypes, but seem to be particularly linked to epilepsy (Falace *et al.*, 2010; Lüthy *et al.*, 2019). Via its TBC domain in the N-terminus, TBC1D24 regulates synaptic vesicle trafficking, which is exerted through the capacity of this domain to interact with small Rab GTPases (Frasa *et al.*, 2012). However, the function of the TLDc domain of TBC1D24 remains elusive. Little structural information has been gathered on proteins harboring a TLDc domain. The crystal structure of the Skywalker/TBC domain of TBC1D24 has been solved (Fischer *et al.*, 2016) and two studies have reported crystal structures of the OXR2 and TBC1D24 TLDc domains from *Danio rerio* (Blaise *et al.*, 2012) and *Drosophila melanogaster* (Lüthy *et al.*, 2019). The determination of the three-dimensional structure of the TLDc domain from a fly orthologue of human TBC1D24 enabled the pathological mutations linked to human epilepsy to be mapped, and it was proposed that some of these mutations could impair the stability of the protein (Lüthy *et al.*, 2019), illustrating that structural data on the TLDc domain could be of help in deciphering the impact of genetic mutations. However, to date, no structural information is available for any human TLDc domain.

In this context, and because of the important roles and functions of TLDc domain-containing proteins in various cellular processes and because pathological mutations are found in this domain in human diseases, we engaged in structural studies of the human TLDc domain. Here, we report the crystal structure of the TLDc domain of the human NCOA7-AS protein at high resolution.

2. Materials and methods

2.1. Gene cloning

The TLDc coding sequence of *NCOA7* (encoding amino acids 54–219) was amplified from pRRL.sin.cPPT.SFFV/IRES-puro.WPRE.*NCOA7* variant 6 (Doyle *et al.*, 2018) using the primers 5'-CGGGGTACCGAGAAATCTGTACTTCCA GGGAAATGCGGCCACAGCGCGC-3' and 5'-AATTAAATTACTCGAGTCATCAAATGCCACACCTCCAG-3'. The PCR fragment was digested and cloned into KpnI/XhoI-digested pET-30 Ek/LIC expression vector (Novagen). The insert is in frame with an S-tag and a His-tag, and a sequence encoding the Tobacco etch virus (TEV) protease cleavage site was inserted upstream of the TLDc coding region to enable tag removal during the purification process.

2.2. Protein expression and purification

The recombinant plasmid pET-30 Ek/LIC:*TLDc* was transformed into the *Escherichia coli* BL21 (DE3) strain resistant to phage T1 (New England Biolabs, Evry, France) carrying pRARE2. One colony was used to inoculate an overnight culture of 500 ml LB medium supplemented with kanamycin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) and chloramphenicol ($34 \mu\text{g ml}^{-1}$). This culture was diluted in 10 l LB medium supplemented with the two antibiotics. The cells were grown at 289 K to an optical density at 600 nm of 0.8, and protein expression was then induced with 1 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). The culture was grown overnight at 289 K. The cells were harvested by centrifugation at 8200*g* for 20 min and were resuspended in 100 ml buffer A (50 mM Tris-HCl pH 8, 400 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol, 40 mM imidazole, 1 mM benzamidine). The cells were disrupted by sonication and cell debris was removed by centrifugation at 28 000*g* for 60 min. The supernatant was loaded at 277 K onto Ni-NTA agarose beads previously equilibrated with buffer A. The beads were washed twice with buffer B (50 mM Tris-HCl pH 8, 1 M NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol, 40 mM imidazole, 1 mM benzamidine) and elution was performed with buffer E (50 mM Tris-HCl pH 8, 400 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol, 500 mM imidazole). The eluted protein was incubated with His-tagged TEV protease purified in our laboratory in a 1:100(*w:w*) ratio; the cleavage reaction was performed during dialysis (dialysis-bag cutoff 12–15 kDa) against 1 l dialysis buffer D (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) overnight at 277 K. After dialysis, the proteins were centrifuged for 20 min at 28 000*g* and the supernatant was again loaded at 277 K onto Ni-NTA agarose beads equilibrated with buffer D. The TLDc domain without the tag was collected in the flowthrough, concentrated to 5 mg ml^{-1} using a Vivapin column (10 kDa cutoff), loaded onto a size-exclusion chromatography column (Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare) and eluted with buffer D. Following this protocol, 1 mg highly pure protein as judged by a Coomassie Blue-stained denaturing gel was obtained from 1 l culture. Macromolecule-production information is summarized in Table 1.

Table 1
Macromolecule-production information.

Source organism	<i>H. sapiens</i>
DNA source	pRRL.sin.cPPT.SFFV/IRES-puro. WPRE.NCOA7 variant 6†
Forward primer‡	5'-CGG GTC ACC GAGAAATCTGTACTTCCAG GGAATGCGCCCCACAGCGC-3'
Reverse primer§	5'-AATTAATTTC TCTCGAG TCAATCAAATG CCCACACCTCCAG-3'
Cloning vector	pET-30 Ek/LIC
Expression vector	pET-30 Ek/LIC
Expression host	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformed with the pRARE2 plasmid
Complete amino-acid sequence of the construct produced	MHHHHHHSSGLVPRGSGMKGTEAAKFERQH MDSPDLGTENLYFQGMRPHSALLENMHI EQARRLIPARVQGYFWRLAYSTLEHGTS LKTLYRKSAASLDSPVLLVIKDMNDNQIFG AYATHPFKFSDHYYGTGETFLYTFSPHF KVFKWSENGSFINGDISSLELGGGGGR FGLWLDAADLYHGRSNSCSTFNNDILSKK EDFIVQDLEVWAFD
Complete amino-acid sequence of the construct after TEV cleavage	GMRPHSALLENMHIEQLARRLIPARVQGYFW RLAYSTLEHGTSLKTLYRKSAASLDSPVLL VIKDMNDNQIFGAYATHPFKFSDHYYGT GETFLYTFSPHFVKWFWSSENGSFINGDI ISSLELGGGGGRFGLWLDAADLYHGRSNCS CSTFNNDILSKKEDFIVQDLEVWAFD

† Doyle *et al.* (2018). ‡ Letters in bold indicate the KpnI restriction site and those in italics indicate the sequence encoding the Tobacco etch virus protease cleavage site. § Letters in bold indicate the XhoI restriction site.

2.3. Crystallization

Initial crystallization screening was performed at two protein concentrations: 4.2 and 10.9 mg ml⁻¹. The vapor-diffusion method was performed in sitting drops by mixing 0.6 µl protein solution with 0.6 µl reservoir solution using 96-well Swissci MRC plates (Molecular Dimensions, Suffolk, UK) at 291 K. The commercial Structure 1 + 2 (Molecular Dimensions), Index, SaltRx and PEGRx screens (Hampton Research) were assessed. Several hits were obtained and crystal optimization was performed in Swissci 48-Well MRC Maxi Optimization Plates. The best diffraction crystals derived from these optimizations were obtained by mixing 1.5 µl protein solution at 10.9 mg ml⁻¹ with 1.5 µl reservoir solution consisting of 0.1 M sodium acetate pH 4.5, 32% PEG 300 (Table 2). The crystals were cryocooled in liquid nitrogen without any cryoprotection prior to data collection.

2.4. Data collection and processing

X-ray data were collected on the ID30A-1/MASSIF-1 beamline at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble, France. The data set was recorded on a PILATUS3 2M detector (Dectris) at a wavelength of 0.965 Å (12.842 keV) and a crystal-to-detector distance of 190.5 mm. A total of 934 images were collected with an exposure time of 0.097 s, a rotation range of 0.15° and full beam transmission. Data were processed, scaled and merged with *XDS* (Kabsch, 2010) and the data-collection statistics are given in Table 3.

2.5. Structure solution and refinement

The structure was solved by molecular replacement performed with *Phaser* (McCoy *et al.*, 2007) from the *Phenix*

Table 2
Crystallization.

Method	Vapor diffusion in sitting drops
Plate type	Swissci 48-Well MRC Maxi Optimization Plates
Temperature (K)	291
Protein concentration (mg ml ⁻¹)	10.9
Buffer composition of protein solution	50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoethanol
Composition of reservoir solution	0.1 M sodium acetate pH 4.5, 32% PEG 300
Volume and ratio of drop	1.5 µl protein solution + 1.5 µl reservoir solution
Volume of reservoir (µl)	250

Table 3
Data collection and processing.

Values in parentheses are for the outer shell.

Diffraction source	ID30A-1, ESRF
Wavelength (Å)	0.965
Temperature (K)	100
Detector	PILATUS3 2M
Crystal-to-detector distance (mm)	190.5
Rotation range per image (°)	0.15
Total rotation range (°)	140
Exposure time per image (s)	0.097
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	68.41, 107.06, 146.44
α, β, γ (°)	90, 90, 90
Mosaicity (°)	0.048
Resolution range (Å)	44.4–1.8 (1.86–1.80)
Total No. of reflections	518696 (47788)
No. of unique reflections	100055 (9863)
Completeness (%)	99.79 (99.78)
Multiplicity	5.2 (4.8)
<i>I</i> / <i>σ</i> (<i>I</i>)	10.10 (1.44)
Wilson <i>B</i> factor (Å ²)	19.8
<i>R</i> _{meas}	0.147 (1.14)
CC _{1/2}	0.997 (0.58)

package (Liebschner *et al.*, 2019) using the TLDc structure from zebrafish (PDB entry 4acj; Blaise *et al.*, 2012) as a search model. *Coot* (Emsley *et al.*, 2010) was used for manual rebuilding, while structure refinement and validation were performed with the *Phenix* package. Because of the high resolution of the data, NCS restraints were not applied during refinement. The statistics for structure refinement are displayed in Table 4. Figures were prepared with *PyMOL* (<http://www.pymol.org>).

3. Results and discussion

As NCOA7-AS plays an important function, notably as an interferon-induced antiviral inhibitor, we aimed to solve its crystal structure. The 219-amino-acid-long NCOA7-AS can be divided into two parts: an N-terminal domain (residues 1–53) followed by the TLDc domain (residues 54–219). We have performed bioinformatic analyses that predicted the first 53 amino acids to be mainly unfolded, with only the presence of two β-strands formed by residues 10–15 and 24–28. Despite numerous efforts, we have so far been unable to purify full-length NCOA7-AS expressed in *E. coli* to homogeneity. NCOA7-AS has a tendency to aggregate and to form large

Table 4

Structure refinement.

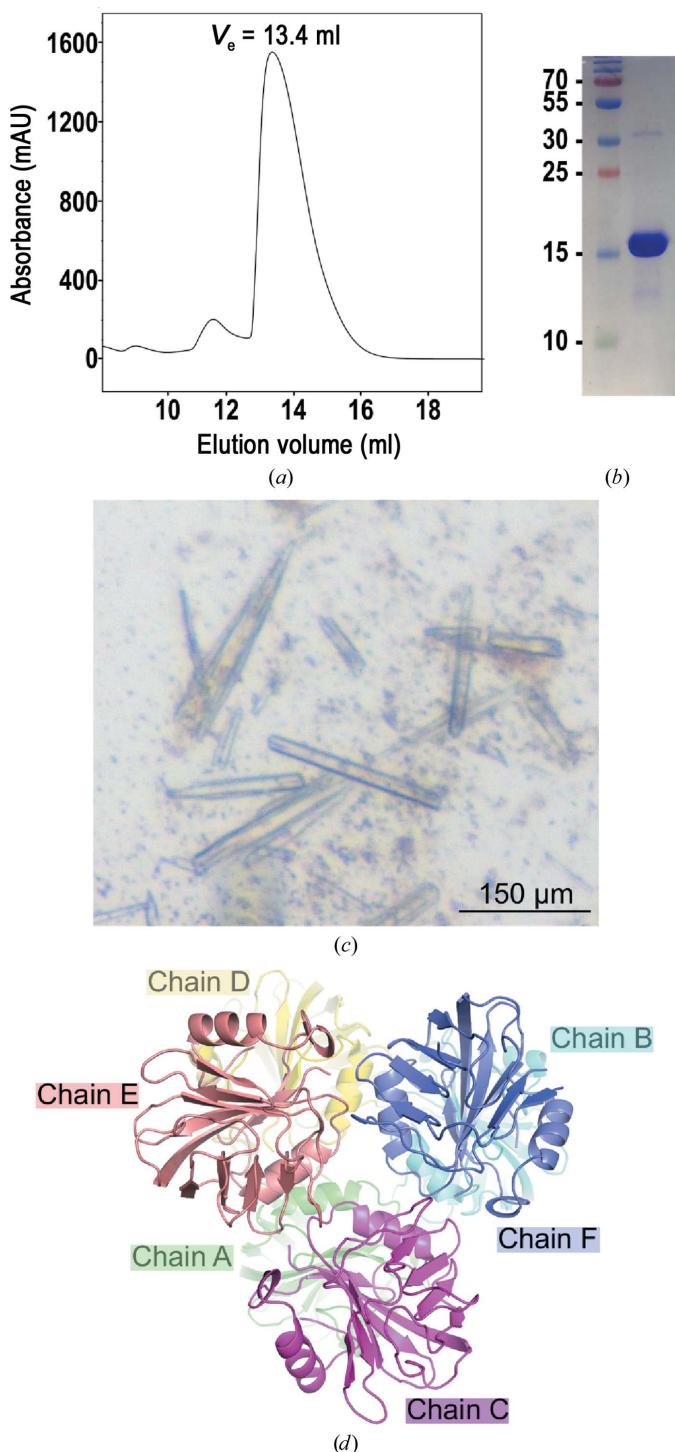
Values in parentheses are for the outer shell.

Resolution range (Å)	44.4–1.8 (1.86–1.80)
Reflections used in refinement	100033 (9861)
Reflections used for R_{free}	2000 (197)
R_{work}	0.176 (0.273)
R_{free}	0.221 (0.334)
No. of non-H atoms	
Total	9256
Macromolecules	8157
Solvent	1099
Protein residues	984
R.m.s.d., bond lengths (Å)	0.005
R.m.s.d., angles (°)	0.80
Ramachandran favored (%)	97.20
Ramachandran allowed (%)	2.80
Ramachandran outliers (%)	0
Rotamer outliers (%)	0.46
Clashscore	2.44
Average B factor (Å ²)	
Overall	27.88
Macromolecule	26.83
Solvent	35.64
PDB code	7obp

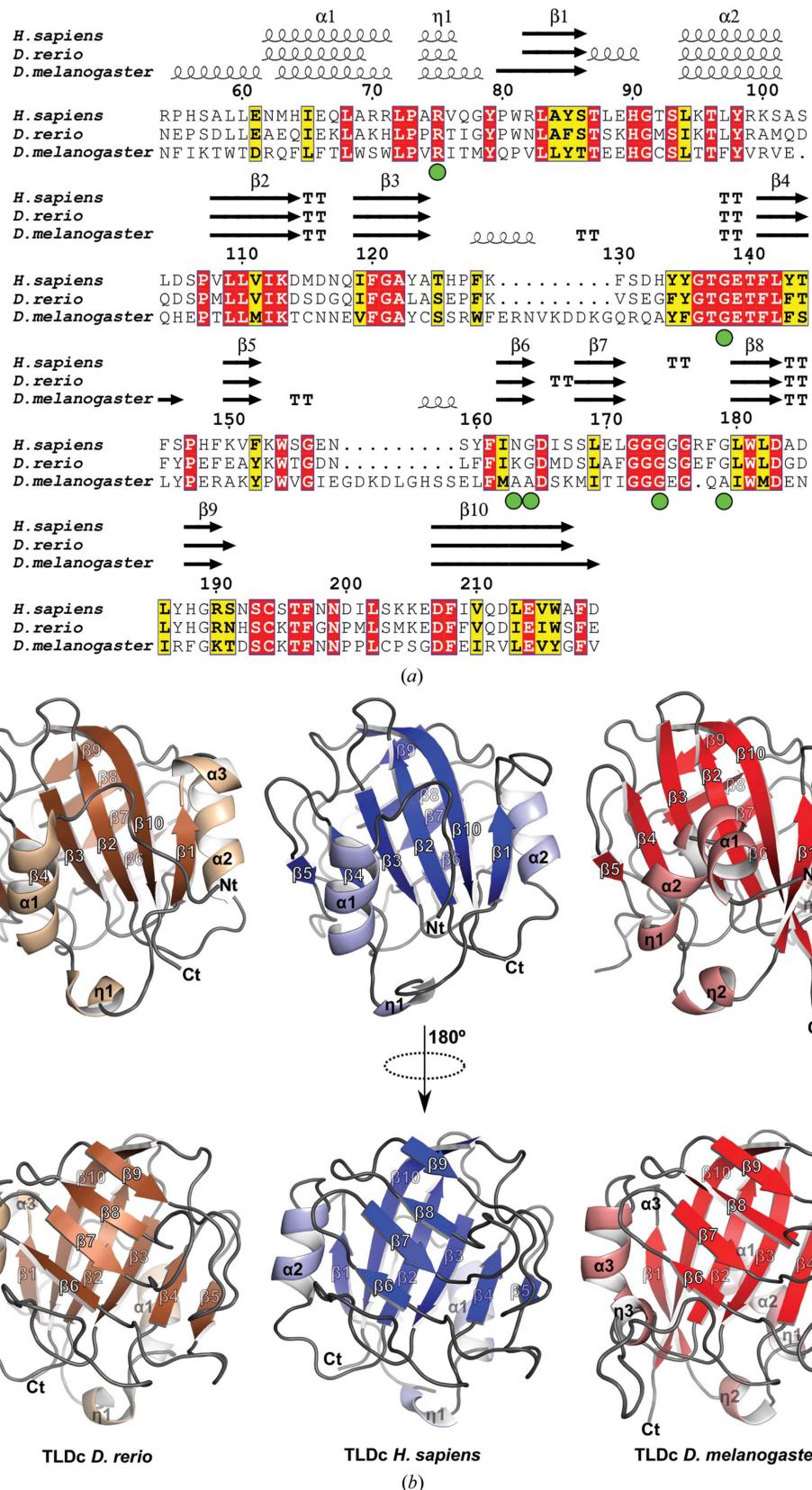
oligomers as judged by size-exclusion chromatography (SEC). We therefore alternatively expressed and purified a truncated form of NCOA7-AS corresponding to the TLDc domain, hereafter referred to as TLDc_{HS}, using *E. coli* as an expression host (Table 2). TLDc_{HS} could be purified using a three-step chromatography procedure as a very pure and homogeneous material as attested by SEC (Figs. 1a and 1b).

We could crystallize the domain under several conditions using commercial screens. Crystallization-condition optimization led to rod-shaped crystals with a length of about 100–150 µm (Fig. 1c), which were obtained in 0.1 M sodium acetate pH 4.5, 32% PEG 300 (Table 2). A full X-ray data set could be collected and processed to a resolution of 1.8 Å. The crystals belonged to the orthorhombic space group $P2_12_12_1$, with unit-cell parameters as indicated in Table 3. The Matthews coefficient (V_M) of $2.2 \text{ Å}^3 \text{ Da}^{-1}$ assumes the presence of 44.5% solvent and six molecules of TLDc in the asymmetric unit (Fig. 1d).

The TLDc_{HS} structure was solved by molecular replacement using the TLDc domain (PDB entry 4acj) from *D. rerio* (TLDc_{DR}) as a search model, which shares 62% sequence identity with its human homologue. Six molecules of TLDc_{HS} were found in the asymmetric unit, as expected from the V_M . The structure was manually rebuilt and refined to R_{work} and R_{free} values of 0.176 and 0.221, respectively, with rather good geometry, as indicated in Table 4. Most residues could be rebuilt for the six monomers, except for the first two amino acids of chain A and the first three residues at the N-terminus for chains B, C, D, F and E. Gly175 was not modeled in chain A as well as the glycine stretch ranging from 174 to 176 in chain F. Residues 146–148 were also disordered in chain F but were well ordered in the other chains. Analysis of the crystal packing with the PISA server (Krissinel & Henrick, 2007) revealed the potential existence of a stable complex made of three TLDc_{HS} monomers within the asymmetric unit (Fig. 1d). Nonetheless, our SEC analysis demonstrated that the protein

**Figure 1**

Purification and crystallization of the human TLDc domain. (a) Elution profile of the purified TLDc domain on a Superdex 75 10/300 GL Increase column. The elution volume of 13.4 ml attests to the presence of a monomer in solution. (b) Coomassie Blue-stained SDS polyacrylamide gel electrophoresis of TLDc performed after the last step of purification by size-exclusion chromatography (10 µg protein; right lane). The left lane contains molecular-mass markers (labelled in kDa). (c) Crystals of the TLDc domain obtained in a sitting drop using PEG 300 as a precipitant. Crystals reached their final size (about 100–200 µm) within two days. (d) Asymmetric unit composition. Six monomers are present in the asymmetric unit, forming two superposed stable trimers as predicted by the PISA server (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>). Chains A, B and D and chains C, E and F form the two assemblies.

**Figure 2**

Protein sequences and structural comparisons of the TLDc domains. (a) The multiple sequence alignment was performed with ENDscript (Robert & Gouet, 2014) and adjusted manually. The secondary structures (α , α -helix; β , β -strand, η , β_1 -helix; TT, turn) of the three TLDc structures extracted from the crystal structures are indicated above the alignment. The green spheres below the alignment indicate the position of missense mutations that are found in the TLDc domain of TBC1D24 and are associated with human diseases. (b) Structural comparison of the three TLDc domains from *D. rerio* (PDB entry 4acj; left; brown), *H. sapiens* (PDB entry 7obp; middle; blue) and *D. melanogaster* (PDB entry 6r82; right; red).

Table 5

Comparison of the pathological mutations and associated syndromes found in the TLDc domain from human TBC1D24 with the TLDc domain from *D. melanogaster* TBC1D24 (red) and the TLDc domain from human NCOA7-AS (blue).

The residues that differ between the TLDc domains are highlighted in bold.

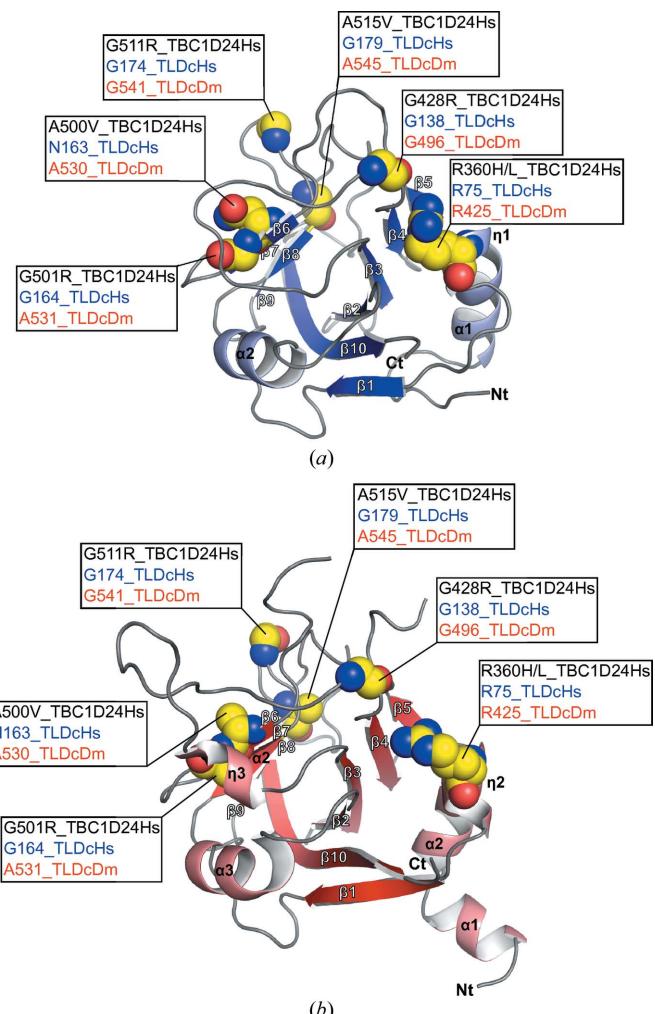
Pathological mutations in the TLDc domain of human TBC1D24 and associated diseases	Residue in TBC1D24	Residue in TLDc _{Dm} in NCOA7-AS	Corresponding residue in TLDc _{Hs}	References
Arg360His/Leu RE-EID (Rolandic epilepsy–writer's cramp-exercise induced dystonia), progressive myoclonus epilepsy	Arg425	Arg75	Lüthy <i>et al.</i> (2019), Muona <i>et al.</i> (2015)	
Gly428Arg RE-EID, DOORS (deafness, onychodystrophy, osteodystrophy and mental retardation syndrome)	Gly496	Gly138	Lüthy <i>et al.</i> (2019), Atli <i>et al.</i> (2018)	
Ala500Val RE-EID, focal motor seizures involving the face (with F229S or S473Rfs*43)	Ala530	Asn163	Lüthy <i>et al.</i> (2019), Balestrini <i>et al.</i> (2016), Uzunhan & Uyanik (2020)	
Gly501Arg RE-EID	Gly531	Gly164	Lüthy <i>et al.</i> (2019)	
Gly511Arg RE-EID	Gly541	Gly174	Lüthy <i>et al.</i> (2019)	
Ala515Val RE-EID, familial infantile myoclonic epilepsy, impaired neurite growth and length (with Asp147His)	Ala545	Gly179	Lüthy <i>et al.</i> (2019), Falace <i>et al.</i> (2010)	

behaves only as a monomer in solution (Fig. 1*a*), as also described for the TLDc domain from zebrafish (Blaise *et al.*, 2012).

The overall structure of TLDc_{Hs} is globular and consists of two α -helices in the N-terminus and ten β -strands forming two antiparallel β -sheets. The two sheets, organized as a central pseudo-orthogonal β -sandwich, are made by strands β 1, β 2, β 3, β 4, β 5 and β 10 and strands β 6, β 7, β 8 and β 9, respectively. The N-terminal part of β 10 interacts with β 9 and to this extent contributes to forming the second β -sandwich. The fold is similar to those of the two previously solved TLDc structures from *D. rerio* OXR2 (TLDc_{Dr}) and *D. melanogaster* TBC1D24 (TLDc_{Dm}). TLDc_{Hs} shares 62% sequence identity with TLDc_{Dr} (Fig. 2*a*) and the two structures display an r.m.s.d. of 0.7 Å when superposed over 164 C α atoms. Few structural differences could be observed. TLDc_{Hs} does not possess an α -helix after strand β 1 as seen in TLDc_{Dr} (Fig. 2*b*). TLDc_{Hs} and TLDc_{Dm} are more distant as they present only 38% sequence identity (Fig. 2*a*), and superimposition of the two structures leads to an r.m.s.d. of 1.1 Å over 144 residues. The N-terminal sequences are not well conserved in the three proteins compared with the rest of the sequence, which is reflected by a few differences at the three-dimensional level. TLDc_{Dm} possesses one extra helix (α 2) in the N-terminus that is not seen in TLDc_{Hs} or TLDc_{Dr}. Finally, noticeable differences are found as two extended loops between β 3 and β 4 and β 5 and β 6 in TLDc_{Dm}.

Several missense mutations have been reported in the TLDc domain from TBC1D24 (Table 5) that are linked to human diseases (Falace *et al.*, 2010; Balestrini *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019; Lüthy *et al.*, 2019; Muona *et al.*, 2015; Uzunhan & Uyanik, 2020; Atli *et al.*, 2018). The three-dimensional structure of TLDc_{Hs} therefore offers the possibility to map these mutations onto the domain. We performed mapping of these mutations onto TLDc_{Hs} (Figs. 2*a* and 3) and assessed the conservation of the residues with missense mutations mapped onto TLDc_{Dm} from fly TBC1D24 as described previously by Lüthy *et al.* (2019). The pathological Arg360His or Arg360Leu mutation found in the human TBC1D24 protein is situated in 3₁₀-helix η 1; the equivalent residue in TLDc_{Hs} from NCOA7-AS is Arg75. Arg75 is involved in a salt-bridge interaction with the side chain of the

highly conserved Glu139 (not shown), and mutation(s) breaking this interaction might therefore destabilize the long loop spanning between strands β 4 and β 5 (Figs. 2*a* and 3). The

**Figure 3**

Structural mapping of the pathological mutations found in the human TLDc domain from TBC1D24. The mutations are reported in the crystal structures of TLDc_{Hs} from NCOA7-AS (a) and TLDc_{Dm} from fly TBC1D24 (b). The human pathological missense mutations reported in TBC1D24 are indicated in black, while the corresponding residues are in blue for the TLDc_{Hs} structure and in red for the TLDc_{Dm} structure. Residues corresponding to the mutations are shown as yellow spheres.

reported Gly428Arg mutation corresponds to Gly138 in human TLDc and is situated just before strand β 4. The Ala500 residue mutated to Val in human TBC1D24 is not conserved in TLDc_{Hs} from NCOA7-AS, where Asn163 is instead found. Despite this lack of residue conservation, both amino acids are part of strand β 6. Gly501 in TBC1D24 and the equivalent Gly164 in TLDc_{Hs} are also part of strand β 6. Mutation(s) in a structured region such as strand β 6 will probably affect the folding of this strand. The Gly511 residue mutated to Arg matches Gly174 in TLDc_{Hs} and is situated in a loop formed by a five-glycine stretch between strands β 7 and β 8. Finally, Ala515, which has been reported to be mutated to Val in several studies, is not conserved in TLDc_{Hs} as Gly179 is instead found. Nonetheless, both residues are at the beginning of strand β 8, and these mutations could destabilize the integrity of this strand. The missense mutations found in the TLDc domain of human TBC1D24 which are linked to neurological disorders are all found at structurally conserved positions. It is indeed clear that the Gly511Arg and Gly501Arg mutations as well as the Arg360His/Leu, Ala500Val and Ala515Val mutations could disturb the folding of the TLDc domain and potentially destabilize the protein because of the nature of the amino-acid substitution and/or its position in the structurally conserved regions. This analysis is therefore in strong agreement with the previously proposed effect on protein stability of the TLDc domain induced by pathological mutations found in TBC1D24 (Lüthy *et al.*, 2019).

To conclude, this structural work strongly attests to the high protein similarity between TLDc domains from vertebrates as well as, albeit slightly more distantly, that from an arthropod. Although this was expected from the high sequence identity that is shared between these proteins, reporting the first crystal structure of a human TLDc domain is notably of interest because of the versatile roles of TLDc proteins and also because pathological mutations affect this domain.

Acknowledgements

We thank the staff at the MASSIF-1 beamline at ESRF for support during data collection as well as the staff at the PXIII beamline at the Swiss Light Source and J. McKellar for critical reading of the manuscript.

Funding information

This work was funded by the National Research Agency (ANR-20-CE15-0010-02-CAIPIRINAS to CG and MB) and by the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (ERC Starting Grant, grant agreement No. 759226 to CG), the ATIP-Avenir programme (to CG) and institutional funds from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Montpellier University (to CG and MB).

References

- Atli, E., Gurkan, H., Ulusal, S., Karal, Y., Atli, E. I. & Tozkir, H. (2018). *Clin. Dysmorphol.* **27**, 1–3.
- Balestrini, S., Milh, M., Castiglioni, C., Lüthy, K., Finelli, M. J., Verstreken, P., Cardon, A., Stražišar, B. G., Holder, J. L., Lesca, G., Mancardi, M. M., Poulat, A. L., Repetto, G. M., Banka, S., Bilo, L., Birkeland, L. E., Bosch, F., Brockmann, K., Cross, J. H., Douummar, D., Félix, T. M., Giuliano, F., Hori, M., Hüning, I., Kayserili, H., Kini, U., Lees, M. M., Meenakshi, G., Mewasingh, L., Pagnamenta, A. T., Peluso, S., Mey, A., Rice, G. M., Rosenfeld, J. A., Taylor, J. C., Troester, M. M., Stanley, C. M., Ville, D., Walkiewicz, M., Falace, A., Fassio, A., Lemke, J. R., Biskup, S., Tardif, J., Ajeawung, N. F., Tolun, A., Corbett, M., Gecz, J., Afawi, Z., Howell, K. B., Oliver, K. L., Berkovic, S. F., Scheffer, I. E., de Falco, F. A., Oliver, P. L., Striano, P., Zara, F., Campeau, P. M. & Sisodiya, S. M. (2016). *Neurology*, **87**, 77–85.
- Blaise, M., Alsarraf, H. M. A. B., Wong, J. E. M. M., Midtgård, S. R., Laroche, F., Schack, L., Spaink, H., Stougaard, J. & Thirup, S. (2012). *Proteins*, **80**, 1694–1698.
- Castroflorio, E., den Hoed, J., Svistunova, D., Finelli, M. J., Cebrian-Serrano, A., Corrochano, S., Bassett, A. R., Davies, B. & Oliver, P. L. (2021). *Cell. Mol. Life Sci.* **78**, 3503–3524.
- Doyle, T., Moncorgé, O., Bonaventure, B., Pollpeter, D., Lussignol, M., Tauziet, M., Apolonia, L., Catanese, M.-T., Goujon, C. & Malim, M. H. (2018). *Nat. Microbiol.* **3**, 1369–1376.
- Durand, M., Kolpak, A., Farrell, T., Elliott, N. A., Shao, W., Brown, M. & Volkert, M. R. (2007). *BMC Cell Biol.* **8**, 13.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. (2010). *Acta Cryst. D* **66**, 486–501.
- Falace, A., Filipello, F., La Padula, V., Vanni, N., Madia, F., De Pietri Tonelli, D., de Falco, F. A., Striano, P., Dagna Bricarelli, F., Minetti, C., Benfenati, F., Fassio, A. & Zara, F. (2010). *Am. J. Hum. Genet.* **87**, 365–370.
- Finelli, M. J. & Oliver, P. L. (2017). *Mamm. Genome*, **28**, 395–406.
- Finelli, M. J., Sanchez-Pulido, L., Liu, K. X., Davies, K. E. & Oliver, P. L. (2016). *J. Biol. Chem.* **291**, 2751–2763.
- Fischer, B., Lüthy, K., Paesmans, J., De Koninck, C., Maes, I., Swerts, J., Kuenen, S., Uytterhoeven, V., Verstreken, P. & Versionées, W. (2016). *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 965–973.
- Frasa, M. A. M., Koessmeier, K. T., Ahmadian, M. R. & Braga, V. M. M. (2012). *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 67–73.
- Kabsch, W. (2010). *Acta Cryst. D* **66**, 133–144.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2007). *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797.
- Liebschner, D., Afonine, P. V., Baker, M. L., Bunkóczki, G., Chen, V. B., Croll, T. I., Hintze, B., Hung, L.-W., Jain, S., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R. D., Poon, B. K., Prisant, M. G., Read, R. J., Richardson, J. S., Richardson, D. C., Sammito, M. D., Sobolev, O. V., Stockwell, D. H., Terwilliger, T. C., Urzhumtsev, A. G., Videau, L. L., Williams, C. J. & Adams, P. D. (2019). *Acta Cryst. D* **75**, 861–877.
- Lüthy, K., Mei, D., Fischer, B., De Fusco, M., Swerts, J., Paesmans, J., Parrini, E., Lubarr, N., Meijer, I. A., Mackenzie, K. M., Lee, W.-T., Cittaro, D., Aridon, P., Schoovaerts, N., Versées, W., Verstreken, P., Casari, G. & Guerrini, R. (2019). *Brain*, **142**, 2319–2335.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2007). *J. Appl. Cryst.* **40**, 658–674.
- Merkulova, M., Păunescu, T. G., Azroyan, A., Marshansky, V., Breton, S. & Brown, D. (2015). *Sci. Rep.* **5**, 14827.
- Muona, M., Berkovic, S. F., Dibbens, L. M., Oliver, K. L., Maljevic, S., Bayly, M. A., Joensuu, T., Canafoglia, L., Franceschetti, S., Michelucci, R., Markkinen, S., Heron, S. E., Hildebrand, M. S., Andermann, E., Andermann, F., Gambardella, A., Tinuper, P., Licchetta, L., Scheffer, I. E., Criscuolo, C., Filla, A., Ferlazzo, E., Ahmad, J., Ahmad, A., Baykan, B., Said, E., Topcu, M., Riguzzi, P., King, M. D., Ozkara, C., Andrade, D. M., Engelsen, B. A., Crespel, A., Lindenau, M., Lohmann, E., Saletti, V., Massano, J., Privitera, M., Espay, A. J., Kauffmann, B., Duchowny, M., Møller, R. S., Straussberg, R., Afawi, Z., Ben-Ze'ev, B., Samocha, K. E., Daly, M. J., Petrou, S., Lerche, H., Palotie, A. & Lehesjoki, A.-E. (2015). *Nat. Genet.* **47**, 39–46.

- Robert, X. & Gouet, P. (2014). *Nucleic Acids Res.* **42**, W320–W324.
- Shao, W., Halachmi, S. & Brown, M. (2002). *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3358–3372.
- Uzunhan, T. A. & Uyanik, B. (2020). *Clin. Neurol. Neurosurg.* **196**, 106080.
- Volkert, M. R., Elliott, N. A. & Housman, D. E. (2000). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 14530–14535.
- Wang, J., Rousseau, J., Kim, E., Ehresmann, S., Cheng, Y.-T., Duraine, L., Zuo, Z., Park, Y.-J., Li-Kroeger, D., Bi, W., Wong, L.-J., Rosenfeld, J., Gleeson, J., Faqeih, E., Alkuraya, F. S., Wierenga, K. J., Chen, J., Afenjar, A., Nava, C., Doummar, D., Keren, B., Juusola, J., Grompe, M., Bellen, H. J. & Campeau, P. M. (2019). *Am. J. Hum. Genet.* **105**, 1237–1253.
- Yu, L., Croze, E., Yamaguchi, K. D., Tran, T., Reder, A. T., Litvak, V. & Volkert, M. R. (2015). *J. Interferon Cytokine Res.* **35**, 186–199.

Annexe 3 : Rebendenne*, Valadao*, Tauziet* *et al.*, *Journal of Virology*, 2021



SARS-CoV-2 Triggers an MDA-5-Dependent Interferon Response Which Is Unable To Control Replication in Lung Epithelial Cells

Antoine Rebendenne,^a Ana Luiza Chaves Valadão,^a Marine Tauziet,^a Ghizlane Maarifi,^a Boris Bonaventure,^a Joe McKellar,^a Rémi Planès,^{a*} Sébastien Nisole,^a Mary Arnaud-Arnould,^a Olivier Moncorgé,^a  Caroline Goujon^a

^aIRIM, CNRS, Montpellier University, Montpellier, France

Antoine Rebendenne, Ana Luiza Chaves Valadão, and Marine Tauziet contributed equally to this work. First author order was determined according to involvement in the writing process.

Olivier Moncorgé and Caroline Goujon contributed equally to this work.

ABSTRACT Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the etiologic agent of coronavirus disease 19 (COVID-19), which ranges from mild respiratory symptoms to acute respiratory distress syndrome, and death in the most severe cases. Immune dysregulation with altered innate cytokine responses is thought to contribute to disease severity. Here, we characterized in depth host cell responses against SARS-CoV-2 in primary human airway epithelia (HAE) and immortalized cell lines. Our results demonstrate that primary HAE and model cells elicit a robust induction of type I and III interferons (IFNs). Importantly, we show for the first time that melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA-5) is the main sensor of SARS-CoV-2 in lung cells. IFN exposure strongly inhibited viral replication and *de novo* production of infectious virions. However, despite high levels of IFNs produced in response to SARS-CoV-2 infection, the IFN response was unable to control viral replication in lung cells, contrary to what was previously reported in intestinal epithelial cells. Altogether, these results highlight the complex and ambiguous interplay between viral replication and the timing of IFN responses.

IMPORTANCE Mammalian cells express sensors able to detect specific features of pathogens and induce the interferon response, which is one of the first lines of defense against viruses and helps in controlling viral replication. The mechanisms and impact of SARS-CoV-2 sensing in lung epithelial cells remain to be deciphered. In this study, we report that despite a high production of type I and III interferons specifically induced by MDA-5-mediated sensing of SARS-CoV-2, primary and immortalized lung epithelial cells are unable to control viral replication. However, exogenous interferons potently inhibited replication if provided early upon viral exposure. A better understanding of the ambiguous interplay between the interferon response and SARS-CoV-2 replication is essential to guide future therapeutic interventions.

KEYWORDS MDA-5, SARS-CoV-2, interferon, lung epithelial cells, primary human airway epithelia, sensing

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is responsible for the current coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. This virus emerged in China in 2019 (1, 2) and has since dramatically spread across the world. SARS-CoV-2 has caused more than 1,658,000 deaths worldwide, an undeniable pressure on health systems, general lockdowns in many countries, and a global economic crisis. SARS-CoV-2 is related to the highly pathogenic SARS-CoV-1, which caused an outbreak in 2002 to 2003 in Asia (3–5), and Middle East Respiratory Syndrome coronavirus (MERS-

Citation Rebendenne A, Chaves Valadão AL, Tauziet M, Maarifi G, Bonaventure B, McKellar J, Planès R, Nisole S, Arnaud-Arnould M, Moncorgé O, Goujon C. 2021. SARS-CoV-2 triggers an MDA-5-dependent interferon response which is unable to control replication in lung epithelial cells. *J Virol* 95:e02415-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.02415-20>.

Editor Tom Gallagher, Loyola University Chicago

Copyright © 2021 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Olivier Moncorgé, olivier.moncorgé@irim.cnrs.fr, or Caroline Goujon, caroline.goujon@irim.cnrs.fr.

* Present address: Rémi Planès, IPBS, CNRS, Toulouse University, Toulouse, France.

Received 17 December 2020

Accepted 24 January 2021

Accepted manuscript posted online

29 January 2021

Published 25 March 2021

CoV), discovered in 2012 (6). COVID-19 has many of the hallmarks of SARS-CoV disease, including fever, breathing difficulty, acute respiratory distress syndrome (ARDS), and death in the most severe cases (7). Four other coronaviruses infect humans and cause common colds every winter; these are the human coronaviruses (HCoV)-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1.

SARS-CoV-2 is an enveloped virus with a positive-stranded RNA genome belonging to the genus *Betacoronavirus*. SARS-CoV-2 mainly replicates in the respiratory tract, but can also replicate in the gastrointestinal tract (8). Similarly to SARS-CoV-1 and HCoV-NL63, SARS-CoV-2 entry into target cells is mediated by angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) (1, 9–11). Cellular transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2) is employed for spike (S) protein priming at the plasma membrane (10, 12). Cathepsins are also involved in S cleavage and fusion peptide exposure upon entry via an endocytic route (13–15).

Viral infections are detected through recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by pattern recognition receptors (PRRs). PRRs include membrane-associated Toll-like receptors (TLR) and cytosolic retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (i.e., RIG-I and melanoma differentiation associated gene [MDA]-5). The murine coronavirus mouse hepatitis virus (MHV) is sensed both by RIG-I and MDA-5 in epithelial cells, with a critical role for the latter *in vivo* (16–19). However, the role of known PRRs in SARS-CoV-2 sensing in epithelial cells has yet to be elucidated.

PRR activation leads to the production of type I and III interferons (IFNs), proinflammatory cytokines, and chemokines, which act in a paracrine and autocrine manner. IFNs constitute one of the first lines of defense against viral infections through the regulation of hundreds of interferon-stimulated genes (ISGs), which induce an antiviral state in infected and neighboring cells (20). Type I and III IFN treatments efficiently inhibit the replication of SARS-CoVs and MERS-CoV *in vitro* and *in vivo* (21–33). However, SARS-CoV-2 has been shown to dampen type I and III IFN induction and subsequent expression of ISGs (26, 29, 30). *In vivo*, the recruitment of proinflammatory cells was dependent on type I IFN signaling upon SARS-CoV-2 infection in mice, but viral clearance was not (29). Robust replication of SARS-CoV-1 in mice was associated with a delayed type I IFN signaling, which was linked to inflammatory responses and lung immunopathology (34). Type I IFN administration at early stages upon infection protected mice from the disease, but impairment of type I IFN signaling at later stages had the same effect, suggesting that IFNs might be more deleterious than beneficial in mice infected with SARS-CoV. In contrast, in COVID-19 patients, a highly impaired type I IFN response seemed to characterize the most severe cases, in parallel with an exacerbated production of proinflammatory cytokines (35, 36). Moreover, neutralizing auto-antibodies against type I IFNs were found in at least 10% of patients with life-threatening COVID-19 cases, as opposed to 0.33% in healthy individuals (37). Furthermore, 3.5% of the critically ill COVID-19 patients carried inborn errors in genes involved in the type I IFN pathway, such as *TLR3*, *IRF7*, or *IFNAR1* (38). Another recent study also linked genetic variants with severe illness, in particular in *TYK2* and *IFNAR1* (39). Taken together, this highlights a critical role for IFNs in COVID-19 disease severity and the importance of better understanding the interplay between SARS-CoV-2 and the IFN system.

Here, we aimed to characterize host cell responses to SARS-CoV-2 infection and the role of IFNs in the control of viral replication, using primary human air-liquid airway epithelia (HAE) cultures and immortalized model cell lines. First, we showed that primary HAE cells, which supported high levels of SARS-CoV-2 replication, were capable of sensing this virus, with a potent induction of type I and III IFN genes and production of these cytokines in their basal medium. However, this response arrived late upon viral exposure. The naturally permissive Calu-3 lung cell line recapitulated IFN induction upon SARS-CoV-2 exposure, which validated the use of this model cell line to study viral replication and induction of innate immunity. ACE2-transduced, lung A549 and intestinal Caco-2 cell lines were also able to detect SARS-CoV-2 virus, albeit with different efficiencies. Interestingly, all these cell types could inhibit SARS-CoV-2 replication to

different levels upon type I IFN pre-exposure. Using Calu-3 cells, we further showed that MDA-5 was the main innate immune sensor of SARS-CoV-2 in these epithelial cells. Finally, we demonstrated that type I and III IFN production elicited by SARS-CoV-2 infection was unable to inhibit replication, supporting the idea that the timing of IFN exposure is key to controlling replication.

RESULTS

SARS-CoV-2 replicates efficiently in primary HAE cells while triggering type I and type III IFN responses. In order to analyze host cell responses to SARS-CoV-2 infection in physiological targets, primary HAE cells were incubated or not with SARS-CoV-2 on the apical side. Viral replication was analyzed at the indicated time points, by monitoring the copy number of RNA polymerase RNA-dependent (RdRp) RNAs in cells by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) (Fig. 1A and G). As shown previously (40), these primary cells were highly permissive to SARS-CoV-2 replication. Immunofluorescence analyses confirmed detection of double-stranded RNA in SARS-CoV-2-infected HAE cells, but not in noninfected cells (Fig. 1B). Cytokine production was measured in the basal medium at 72 h postinfection using the human antivirus response panel LEGENDplex (Fig. 1C and D). A strong IFN response was observed, with a substantial production of type I (IFN- β) and type III (IFN- λ 1 and 2/3) IFNs. An important induction of CXCL10 (IP-10) production was also observed, along with a more modest induction of interleukin 6 (IL-6), IL-8, and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) proinflammatory cytokines. Next, an RT² profiler analysis using the antiviral response panel was performed at 72 h postinfection (Fig. 1E and F). As expected, *IFNB* and other genes belonging to the IFN system (e.g., *STAT1*, *TICAM1*, *TLR3*, *TLR7*, *TLR8*, *DDX58*, *IRF7*, as well as antiviral effector ISGs, such as *OAS2* and *MX1*) were confirmed to be upregulated. Interestingly, a potent induction of the inflammasome genes *NLRP3* and *MEFV* (encoding Pyrin/TRIM20) was also observed, as well as *CXCL10*, *CXCL11*, *CCL3*, and *CCL5* chemokine induction. Of note, HAE cells from nasal, tracheal, and bronchial origins behaved in a globally similar manner with respect to their responses to infection (Fig. 1D and F). Finally, an RT-qPCR experiment confirmed an important induction of *IFNB1*, *IFNL1*, and *L2* and parallel induction of prototype ISGs at 48 h and 72 h postinfection, but this was not observed at 24 h (Fig. 1G).

Calu-3 cells recapitulate the global responses to SARS-CoV-2 observed in HAE cells. Next, a number of immortalized, epithelial human cell lines were tested for their ability to support viral replication compared to simian Vero E6 cells (Fig. 2). Calu-3 (lung adenocarcinoma), Caco-2 (colorectal adenocarcinoma) (both known to express ACE2 and TMPRSS2 and be permissive to SARS-CoV-2) (41) were used in parallel to A549 (epithelial, lung carcinoma) genetically modified to express ACE2, together with TMPRSS2 or not. Caco-2 cells were also modified to express higher levels of ACE2, or ACE2 and TMPRSS2 in combination. The cells were infected with SARS-CoV-2 and lysed 48 h later to measure viral replication using RdRp RT-qPCR. Calu-3, Caco-2-ACE2, and A549-ACE2 cells supported SARS-CoV-2 replication to a similar extent (Fig. 2) and were therefore selected for further studies.

Responses to infection were then evaluated in Calu-3 cells. The cells were infected at the indicated multiplicities of infection (MOIs) and replication efficiency was assessed by RdRp RT-qPCR (Fig. 3A). Whereas replication efficiency increased concomitantly with the viral input at 24 h, a plateau was reached at 48 h. Type I and III IFN production in supernatants from infected Calu-3 cells was assessed using HEK-Blue IFN- α/β and IFN- λ reporter cell lines, respectively (Fig. 3B and C). This showed an important induction of both types of IFNs by SARS-CoV-2 infection, reminiscent of what was observed with primary HAE cells (Fig. 3B and C, Fig. 1C). Cytokine production in Calu-3 supernatants was next measured using the human antivirus response panel LEGENDplex (Fig. 3D). A very similar response to that seen in HAE cells was observed, with a high induction of IFN- β , IFN- λ 1, IFN- λ 2/3, CXCL10, and a slight induction of IL-6 and TNF- α (Fig. 3D and 1C). RT² profiler and RT-qPCR analyses confirmed a globally similar response of Calu-3 cells to SARS-CoV-2 infection compared to HAE cells (Fig. 3E and F, compared to Fig. 1E to G), with a high induction of *IFNB1* and *IFNL2* and a

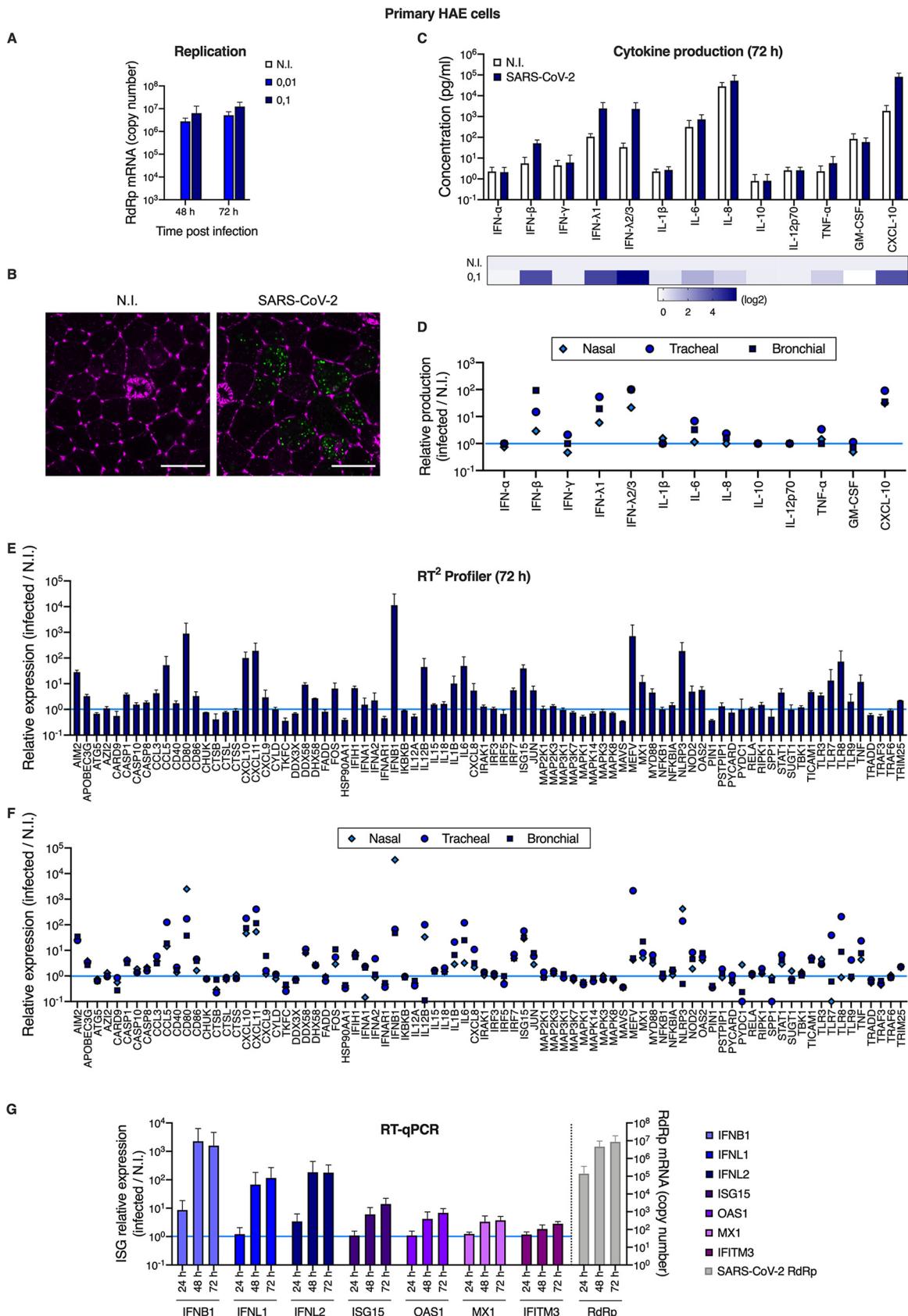


FIG 1 Primary human airway epithelial host cell responses to SARS-CoV-2 infection. (A) Human HAE cells (MucilAir, Epithelix) were noninfected (N.I.) or incubated with SARS-CoV-2 on the apical side at MOIs of 0.01 and 0.1 for 2 h. Cells were harvested and lysed for

(Continued on next page)

moderate induction of ISGs. High and moderate induction levels of *IFNB1*, *IFNL2*, and prototype ISGs *ISG15* and *MX1* were observed upon SARS-CoV-2 replication in A549-ACE2 and Caco2-ACE2 cells, respectively, despite high levels of replication in both cases (Fig. 4A and B).

Having established that SARS-CoV-2-infected cells produced large amounts of IFN, we sought to identify the PRR(s) responsible for sensing the virus. Typically, coronaviruses are sensed via RIG-I and/or MDA-5 PRRs (16, 19), which then signal through mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS). We therefore used CRISPR/Cas9 to generate *RIG-I*, *MDA-5*, or *MAVS* knockout (KO) cell populations in parallel to control KO populations (CTRL, i.e., expressing nontargeting single guide RNAs [sgRNAs]). Immunoblot analyses showed a very good KO efficiency in the different populations (Fig. 5A). The KO cells were then challenged with SARS-CoV-2 and their ability to produce type I and III IFNs in their supernatants upon infection was evaluated using HEK-Blue IFN- α/β and IFN- λ reporter cells, respectively (Fig. 5B and C). We observed that MDA-5 and MAVS depletion, but not RIG-I depletion, drastically impacted the amounts of type I and type III IFNs produced, demonstrating that in Calu-3 lung epithelial cells, SARS-CoV-2 sensing mainly occurred through MDA-5.

In agreement with previous studies (31, 42, 43), we then observed that a 16-h pretreatment with increasing doses of type I IFN proportionally limited SARS-CoV-2 replication in Vero E6 cells, with the best dose being 1,000 U/ml (Fig. 6A and B). Interestingly, preexposure of HAE and Calu-3 cells with 1,000 U/ml IFN potently decreased SARS-CoV-2 RNA amounts in infected cells (by 1.5 to 2 logs) and the production of infectious viruses (by several orders of magnitude; Fig. 7A, B, E, and F). Immunofluorescence staining failed to detect double-stranded RNA (dsRNA) in SARS-CoV-2-infected cells following IFN pretreatment in HAE cells, contrary to what was observed in nontreated cells (Fig. 7C). Immunoblot analysis showed a potent inhibition of nucleocapsid (N) and spike expression, concomitant with ISG induction, in Calu-3 cells (Fig. 7D). Intracellular spike staining in infected Calu-3 cells confirmed a 10-fold decrease in the percentage of infected cells following IFN preexposure (Fig. 7G). Of note, type I IFN pretreatment had also a very strong impact on SARS-CoV-2 infection in A549-ACE2 cells, but a milder effect in Caco-2-ACE2 cells (Fig. 8), as seen with viral RNA quantification by RT-qPCR (Fig. 8A and B), intracellular spike staining (Fig. 8C and D), and immunoblot analyses (Fig. 8E and F).

A striking observation here was that the concentration of type I IFN used for pretreatment, which was highly inhibitory in HAE and Calu-3 cells, was actually similar to what was naturally produced by these cells upon infection (Fig. 1C, Fig. 3B and D). However, high levels of replication were observed in these cell types in the absence of exogenous IFN treatment. We therefore hypothesized that the IFN produced during the course of infection did not have an impact on replication. Indeed, we observed that *MDA-5* and *MAVS* KO in Calu-3 cells did not positively impact viral production, despite abolishing IFN production (Fig. 9A, Fig. 5B and C). In order to confirm this, we

FIG 1 Legend (Continued)

RNA extraction and RT-qPCR analysis using RdRp primers and probe at 48 h and 72 h postinfection. (B) Human HAE cells were N.I. or incubated with SARS-CoV-2 on the apical side at MOI 0.1 for 2 h. After 48 h, cells were stained for actin with phalloidin (magenta) and an anti-double-stranded RNA antibody (green). Representative images, acquired with an LSM880 Airyscan microscope, are shown; scale bar 10 μ m. (C) Human HAE cells were N.I. or incubated with SARS-CoV-2 (MOI 0.1), as in (A). Cytokine concentrations in the basal medium were measured using the human antivirus response panel LEGENDplex at 72 h after infection (top), and the heat map (bottom) represents the fold difference in cytokine concentrations (\log_2 scale) in basal media from infected compared to N.I. cells. (D) Data from human antivirus response panel LEGENDplex as performed in (C), with supernatants from cells of nasal, tracheal, and bronchial origins. (E) An antiviral response RT² profiler PCR array analysis was performed using the RNAs from (A) extracted at 72 h (N.I. and MOI 0.1). Relative expression is shown for the indicated genes. (F) Data from antiviral response RT² profiler PCR array analysis as in (D) obtained with RNAs from HAE cells of nasal, tracheal, and bronchial origins. (G) Human HAE cells were mock infected (N.I.) or incubated with SARS-CoV-2 on the apical side at MOI 0.01 for 2 h, harvested at the indicated time points, and lysed for RNA extraction and RT-qPCR. Differential ISG expression was measured using the indicated taqmans, and data were normalized to both ActinB and GAPDH (left y axis), while viral replication was analyzed using RdRp primers and probe (right y axis). The light blue line (sets at 1) indicates no change in cytokine production or in gene expression (D, E, F, and G). The means of four (A), three (C to F), or six (G; apart from the 24-h time point, for which $n=3$) independent experiments are shown, with error bars representing the standard deviation (SD).

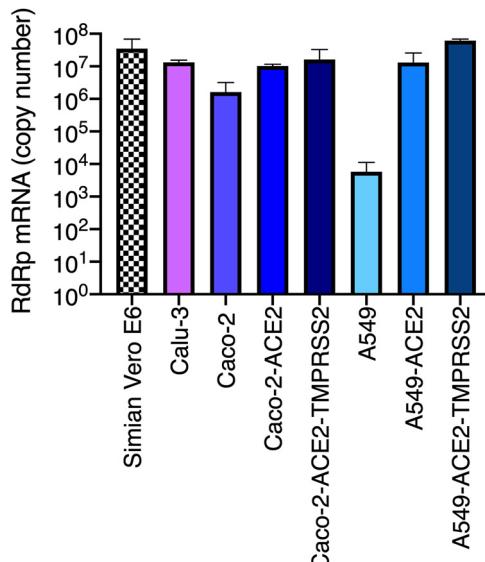


FIG 2 Replication of SARS-CoV-2 in genetically modified human cell lines. Caco-2 and A549 cells were transduced or not with lentiviral vectors to stably overexpress either ACE2 or ACE2 together with TMPRSS2. The indicated (unmodified and modified) cell lines were infected with SARS-CoV-2 at MOI 0.05 and lysed 48 h later for RNA extraction and RdRp RT-qPCR analysis. A representative experiment (with technical triplicates) is shown.

used CRISPR/Cas9 to disrupt genes belonging to the common signaling pathway for type I and III IFNs, rather than the distinct type I and III IFN receptors. Hence, we generated *IRF9* and control (CTRL) KO Calu-3 cell populations and observed that *IRF9* KO did not substantially improve SARS-CoV-2 replication (Fig. 9B), whereas the KO cells were no longer able to induce prototype ISG expression following IFN treatment (Fig. 9C). Similar data were obtained in *JAK1* knockout A549-ACE2 cells that were similarly unable to respond to IFN (Fig. 9D and E). In line with these results, we observed that, contrary to preexposure, exogenous IFN exposure 24 h postinfection in Calu-3 cells did not have an impact on SARS-CoV-2 replication efficiency (Fig. 9F). Moreover, when added as early as 8 h postinfection, IFN treatment had an impact only at the lowest MOIs used (Fig. 9F). In conclusion, these data showed that the IFN naturally produced upon SARS-CoV-2 replication could only have a minimal impact, if any, on SARS-CoV-2 replication.

DISCUSSION

Here, we confirmed the potent induction of innate responses following infection of primary, air-liquid HAE cultures with SARS-CoV-2 (40), with an important but somewhat late induction of type I and III IFNs. In contrast to our results, a lack of IFN response in HAE cells exposed to SARS-CoV-2 was recently reported (44). Of note, viral production in the HAE model we used was several magnitudes of order higher than what was reported in the other study (up to 10^7 PFU/ml, Fig. 7B, in comparison to ~ 2 to 3×10^2 PFU/ml) (44), which could easily explain the observed difference in sensing. A lack of IFN induction was also reported upon SARS-CoV-2 infection of normal human bronchial epithelial (NHBE) cells (26). However, in this study, only 0.1% of total deep sequencing reads were from the virus in NHBE, which was a percentage highly similar to what was observed in wild-type A549 cells (26), known to be refractory to replication because of the lack of ACE2 expression. This strongly suggested poor replication efficiency in this particular model, again explaining the lack of sensing. In support of our data, and in addition to the aforementioned previous report in HAE cells (40), an IFN induction has also been reported in human intestinal organoids (32, 45).

Using model cell lines, we notably showed that naturally permissive, lung epithelial

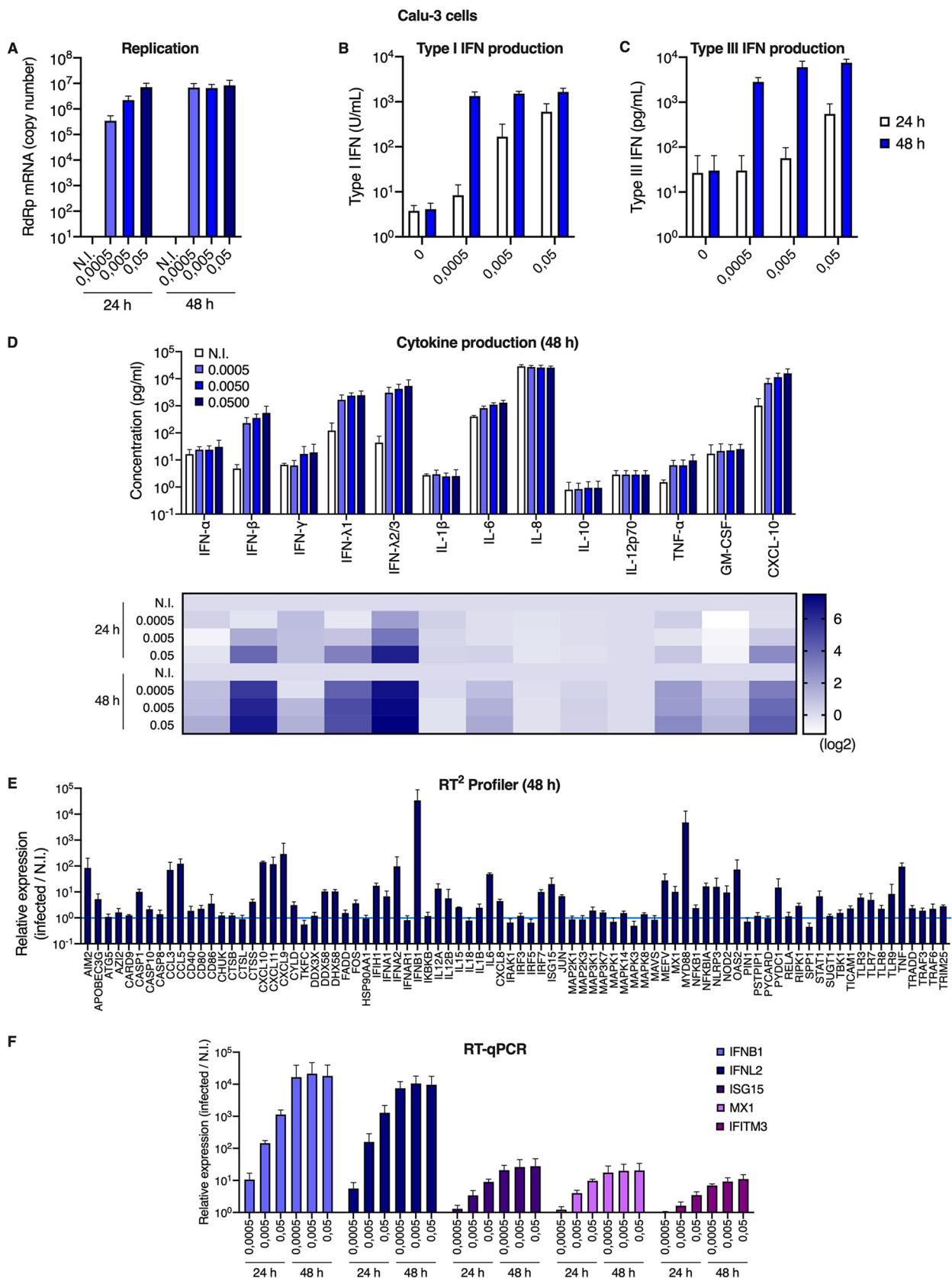


FIG 3 Calu-3 model cell line responses to SARS-CoV-2 infection. (A) Human Calu-3 cells were N.I. or incubated with SARS-CoV-2 at the indicated MOIs. Cells were harvested and lysed for RNA extraction and RdRp RT-qPCR analysis. (B and C) Cell supernatants from (A) were

(Continued on next page)

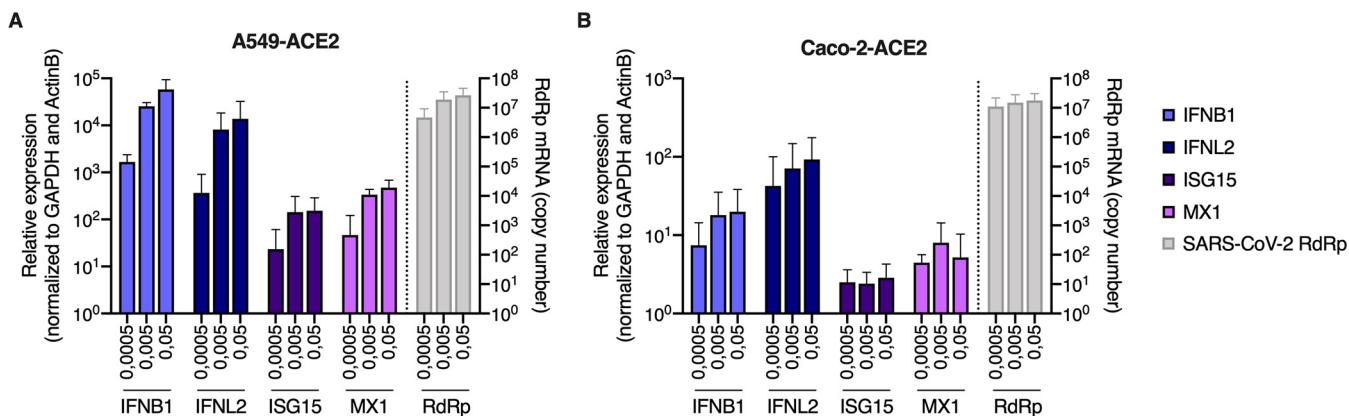


FIG 4 A549-ACE2 and Caco-2-ACE2 model cell line responses to SARS-CoV-2 infection. (A and B) Human A549-ACE2 (A) and Caco-2-ACE2 (B) cells were noninfected or incubated with SARS-CoV-2 at the indicated MOIs. Cells were harvested and then lysed for RNA extraction. Relative expression levels of the indicated IFN genes and ISGs were analyzed by RT-qPCR using both ActinB and GAPDH for normalization (left y axis), while viral replication was analyzed using RdRp primers and probe (right y axis). The means of three independent experiments are shown, with error bars representing the SD from the mean.

Calu-3 cells were a good model for innate immune responses to SARS-CoV-2 infection, with a similar pattern of innate immunity gene induction and proinflammatory cytokine production to what we observed in HAE cells. In addition to IFNs, SARS-CoV-2 infection induced the production of the CXCL10 chemokine and the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in both cell types (and, in HAE only and to a lower extent, IL-8), but no production of IL-1 β , consistent with observations in COVID-19 patient samples (46). Interestingly, at the RNA level, a potent induction of inflammasome-related genes (i.e., NLRP3 and MEFV) was observed. It will be of high interest to further explore the potential regulation of the inflammasome by SARS-CoV-2 and determine whether it is activated and, if that were the case, why there is no IL-1 β production by the infected cells.

In agreement with an important role of MDA-5 in host responses to MHV infection in mice (19), CRISPR/Cas9 KO approaches showed that MDA-5 was the main sensor for SARS-CoV-2 in Calu-3 lung epithelial cells, with no impact of RIG-I in this particular model. While the manuscript was being reviewed, MDA-5 was also reported by the Chanda lab to be the main sensor of SARS-CoV-2 in Calu-3 cells, confirming our data (47). Whether MDA-5 is also the main sensor in HAE cells remains to be determined, but it has so far proven difficult to genetically modify these primary cells.

As reported previously in cell lines and in models of primary bronchial epithelial, air-liquid cell cultures (26, 30, 31, 48, 49), we confirmed that type I IFN pretreatment potently inhibited SARS-CoV-2 replication in primary HAE cells and lung cell lines. However, in the absence of IFN pretreatment and despite an important amount of endogenous IFNs produced upon infection in HAE cells, SARS-CoV-2 replication was highly efficient in these cells. Similar data were obtained in Calu-3 cells, despite an earlier IFN response than in HAE cells. This suggested that IFNs were produced too late to efficiently prevent replication, as proposed in another study (30), and/or did not efficiently induce ISG expression. In agreement with this, we observed that knocking out genes essential for type I and III responses (e.g., IRF9 or JAK1) had no

FIG 3 Legend (Continued)

harvested at the indicated time points and type I (B) or type III (C) IFN concentrations were measured using HEK-Blue IFN- α/β and IFN- λ reporter cells, respectively. (D) Cell supernatants from (A) were harvested and cytokine concentrations were measured using the human antivirus response panel LEGENDplex at 24 h and 48 h. Concentrations are shown (top), and the fold difference in cytokine concentration in supernatants from infected compared to N.I. cells is represented as a heat map (bottom; log₂ scale). (E) An antiviral response RT² profiler PCR array analysis was performed using the RNAs from (A) extracted at 48 h (MOI 0.005). (F) Relative expression levels of the indicated IFN genes and ISGs were analyzed by RT-qPCR analysis at the indicated time points using both ActinB and GAPDH for normalization. The means of four (A and F) or three (B to E) independent experiments are shown, with error bars representing the SD from the mean.

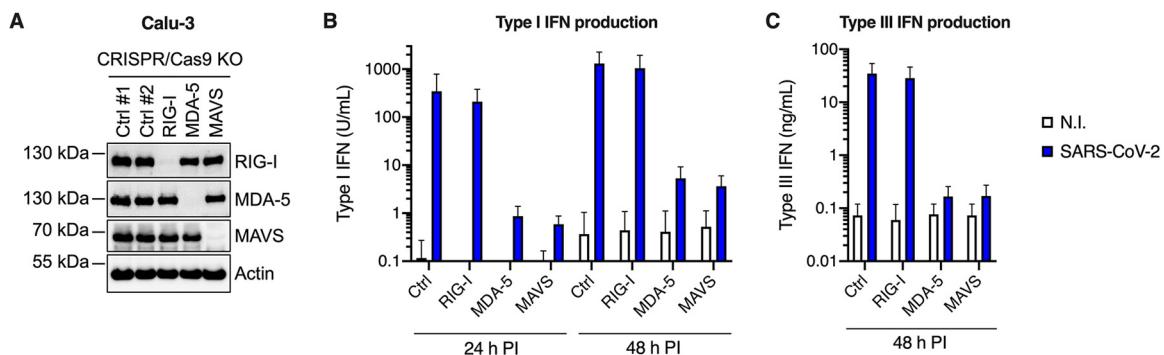


FIG 5 MDA-5 is the main sensor of SARS-CoV-2 in Calu-3 model cells. Calu-3-Cas9 cells were transduced with lentiviral vectors expressing CRISPR nontargeting single-guide RNAs (sgRNAs) (Ctrl #1 and Ctrl #2) or sgRNAs targeting *RIG-I*, *MDA-5*, or *MAVS*, and selected for 2 weeks. (A) Expression levels of *RIG-I*, *MDA-5*, and *MAVS* were assessed in the different populations by immunoblotting, where actin served as a loading control (a representative immunoblot is shown). (B and C) Cells were challenged with SARS-CoV-2 at MOI 0.05 and their supernatants harvested at 24 h and 48 h postinfection. Concentrations of type I (B) and type III (C) IFNs produced in the supernatants were analyzed using HEK-Blue IFN- α/β and IFN- λ reporter cells, respectively. The means of three independent experiments are shown, with error bars representing the SD from the mean.

beneficial impact on replication in model lung cell lines, contrary to what was reported in intestinal epithelial cells (32). Indeed, in the latter, a critical role for type III IFNs in replication control was observed and this dramatically highlights differences in the importance of IFN between different target cell types, which we propose are most likely due to different kinetics of IFN production. Moreover, in lung cells, postinfection addition of large amounts of exogenous type I IFN had no real impact on replication (even as early as 8 h postinfection, when a high MOI was used), supporting the idea that the timing of IFN exposure is key to controlling replication. In line with this, SARS-CoV-2 efficiently dampens IFN responses and ISG induction through several mechanisms (18, 30, 50–52). Indeed, nsp1, nsp6, nsp13, ORF3a, M, ORF7a, and ORF7b inhibit STAT1/2 phosphorylation and STAT1 nuclear translocation is inhibited by ORF6. Nonetheless, numerous clinical trials are currently evaluating the impact of IFN therapy on COVID-19 patients and should shed light on whether exogenous IFN could be useful in this context. Of note, a substantial proportion of patients with severe diseases may well be unresponsive to such treatments, due to the presence of anti-IFN autoantibodies or inborn mutations in genes belonging to the IFN pathway, such as *IFNAR1* (37, 38). This highlights the importance of identifying the IFN-induced antiviral effectors, which are so potently active

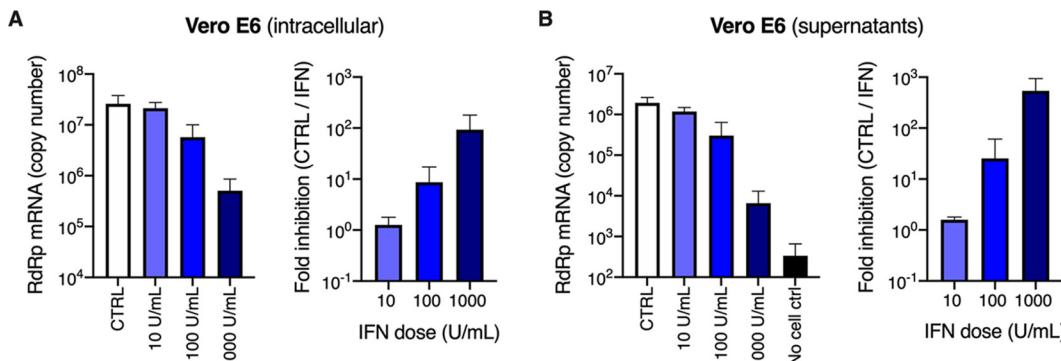


FIG 6 Inhibition of SARS-CoV-2 replication by type I IFN in Vero E6 cells. (A and B) Vero E6 cells were pretreated or not with increasing concentrations of type I IFN, as indicated, for 16 h prior to SARS-CoV-2 infection at MOI 0.0005. After 72 h, the cells were lysed and the supernatants collected, then the RNAs were extracted and viral replication was monitored in cells (A, left panel) and viral production in the supernatants (B, left panel) by RdRp RT-qPCR. The fold inhibition by IFN is shown (A and B, right panels). The means of three independent experiments are shown, with error bars representing the SD from the mean.

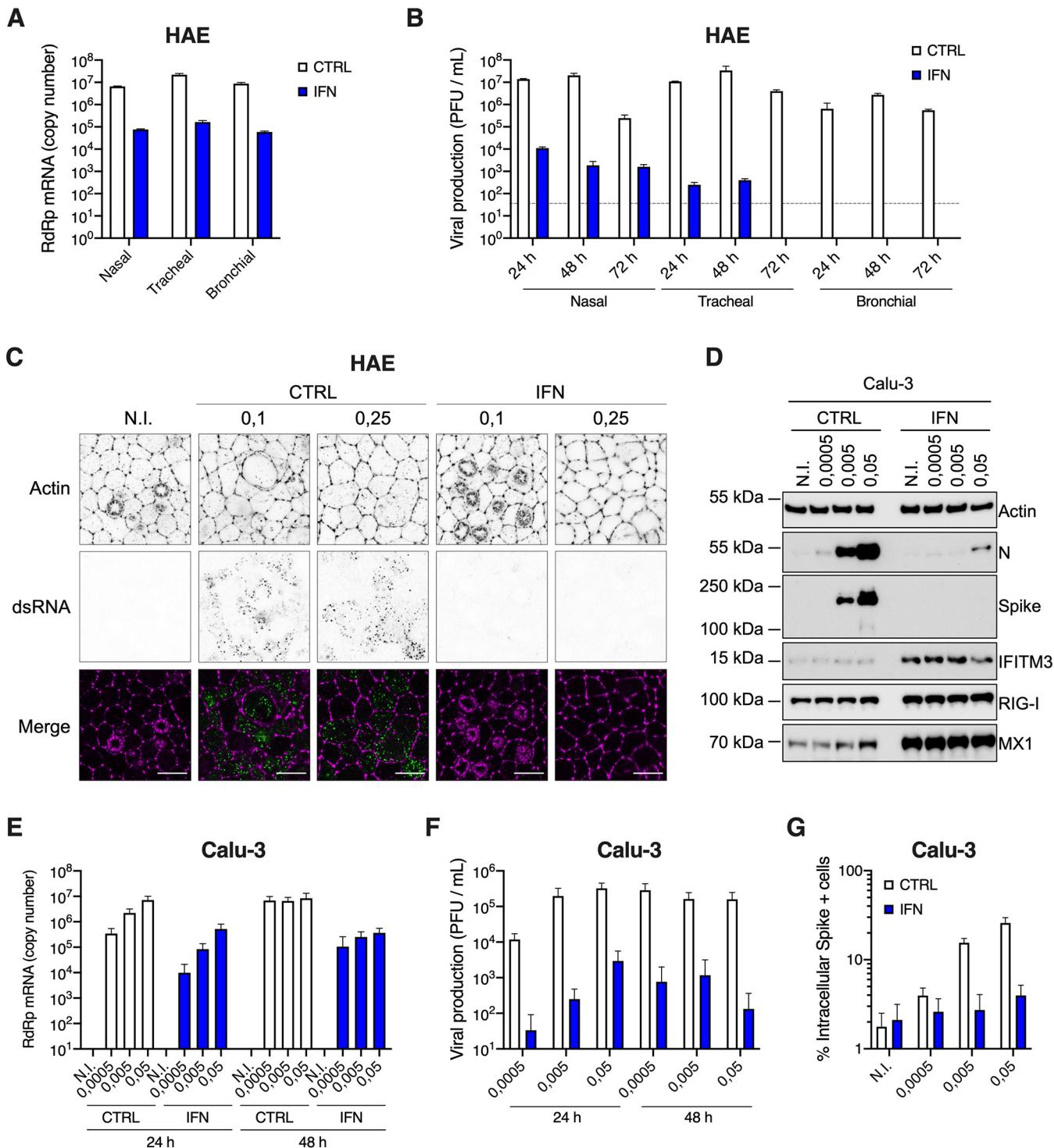


FIG 7 Inhibition of SARS-CoV-2 replication by type I IFN pretreatment in primary HAE cells and immortalized Calu-3 cells. (A) Human HAE cells (nasal, tracheal, or bronchial, as indicated) were pretreated or not with type I IFN for 20 h, and N.I. or incubated with SARS-CoV-2 on the apical side at MOI 0.1 for 1 to 2 h. Cells were harvested at 72 h postinfection, then lysed for RNA extraction and RdRp RT-qPCR analysis. (B) Plaque assays were performed on washes of the apical side of the HAE cells from (A) at 24 h, 48 h, and 72 h to determine the number of PFU per ml of supernatant (gray dotted line = detection threshold). (C) Human HAE cells were pretreated or not with IFN for 20 h, and N.I. or incubated with SARS-CoV-2 on the apical side at MOI 0.1 and 0.25 for 2 h. After 48 h, cells were stained for actin with phalloidin (magenta) and an anti-double-stranded RNA antibody (green). Representative images, acquired with an LSM880 Airyscan microscope, are shown; scale bar 10 μ m. D. Calu-3 cells were pretreated or not with IFN for 16 to 20 h, the cells were N.I. or incubated with SARS-CoV-2 at the indicated MOIs, and lysed 24 h postinfection for immunoblot analysis of SARS-CoV-2 nucleoprotein (N) and spike, and IFITM3, RIG-I, MX1, and actin expression levels. A representative immunoblot is shown. (E) Human Calu-3 cells were pretreated or not with IFN, and infected as in (D). Cells were harvested and lysed for RNA extraction and RdRp RT-qPCR analysis. (F) Production of infectious viruses in supernatants from (E) was determined by plaque assays. (G) Calu-3 cells were pretreated or not with IFN and infected as in (D), and cells were stained with an anti-spike antibody. The percentage of spike positive (+) cells was scored by flow cytometry. The means of three (A and B) or four (E to G) independent experiments are shown, with error bars representing the SD from the mean.

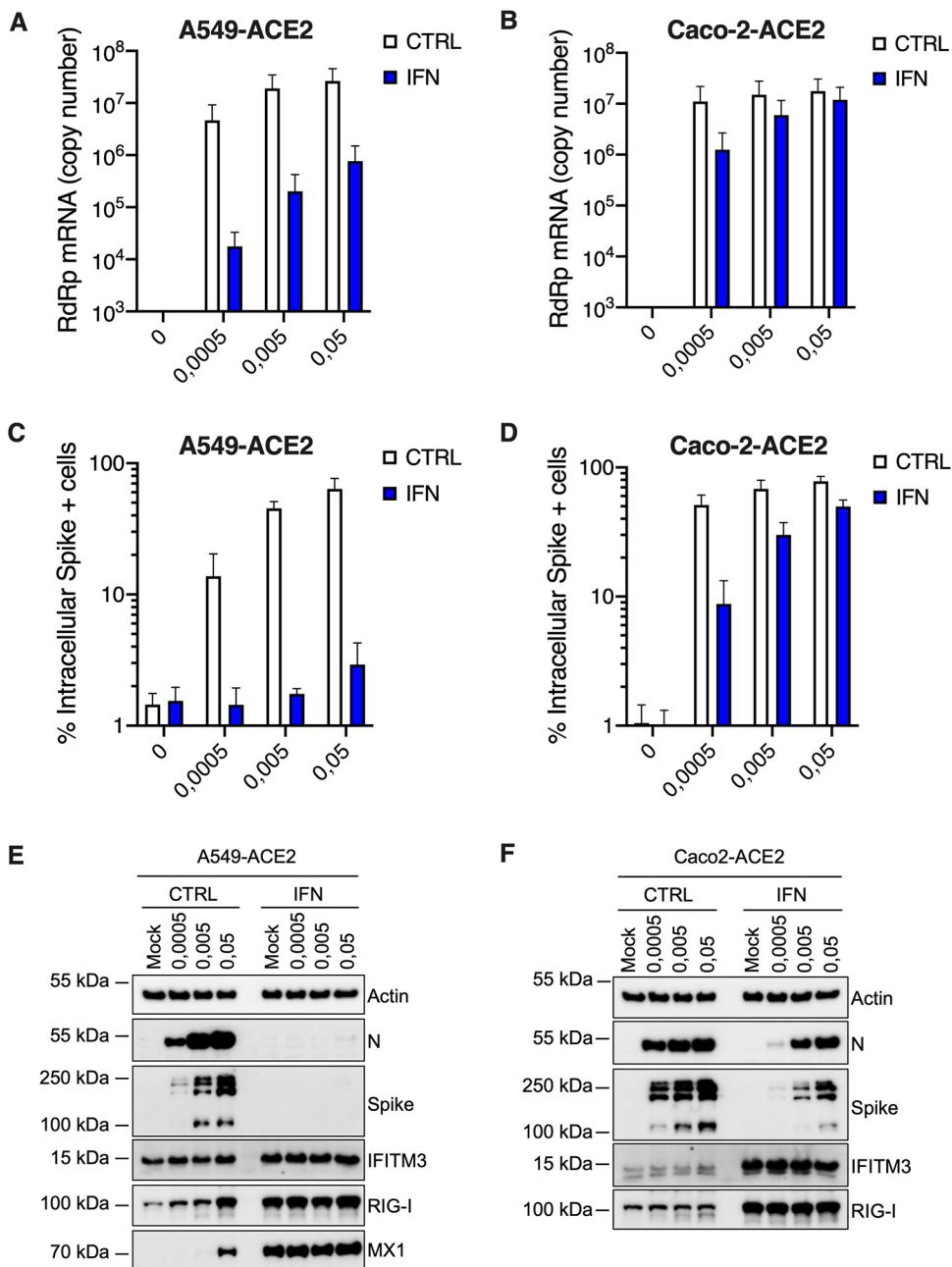


FIG 8 Inhibition of SARS-CoV-2 replication by type I IFN in A549-ACE2 and Caco-2-ACE2 cells. Human A549-ACE2 (A, C, and E) and Caco-2-ACE2 (B, D, and F) cells, as indicated, were pretreated or not with IFN for 16 to 20 h, then the medium was replaced and cells were mock infected (N.I.) or incubated with SARS-CoV-2 at the indicated MOIs. (A and B) Cells were harvested and lysed for RNA extraction and RT-qPCR analysis using RdRp primers and probe. (C and D) Cells were fixed with PFA, permeabilized, and stained with an anti-spike antibody conjugated to an Alexa fluorochrome. The percentage of spike(+) cells was scored by flow cytometry. (E and F) Cells were lysed for immunoblot analysis of SARS-CoV-2 nucleoprotein (N) and spike, IFITM3, RIG-I, and MX1 ISG expression levels. Actin serves as a loading control. Representative immunoblots are shown. Of note, MX1 was not detected in Caco-2-ACE2 cell lysates. The means of three independent experiments are shown (A to D), with error bars representing one standard deviation (SD) from the mean.

against SARS-CoV-2, in order to potentially guide future, targeted therapeutic interventions.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids and constructs. The pRRRL.sin.cPPT.SFFV/IRES-puro.WPRE lentiviral vector has been described (53). Human ACE2 ([NM_021804](#)) and TMPRSS2 variant 1 (herein called TMPRSS2v1; [NM_001135099](#)) were

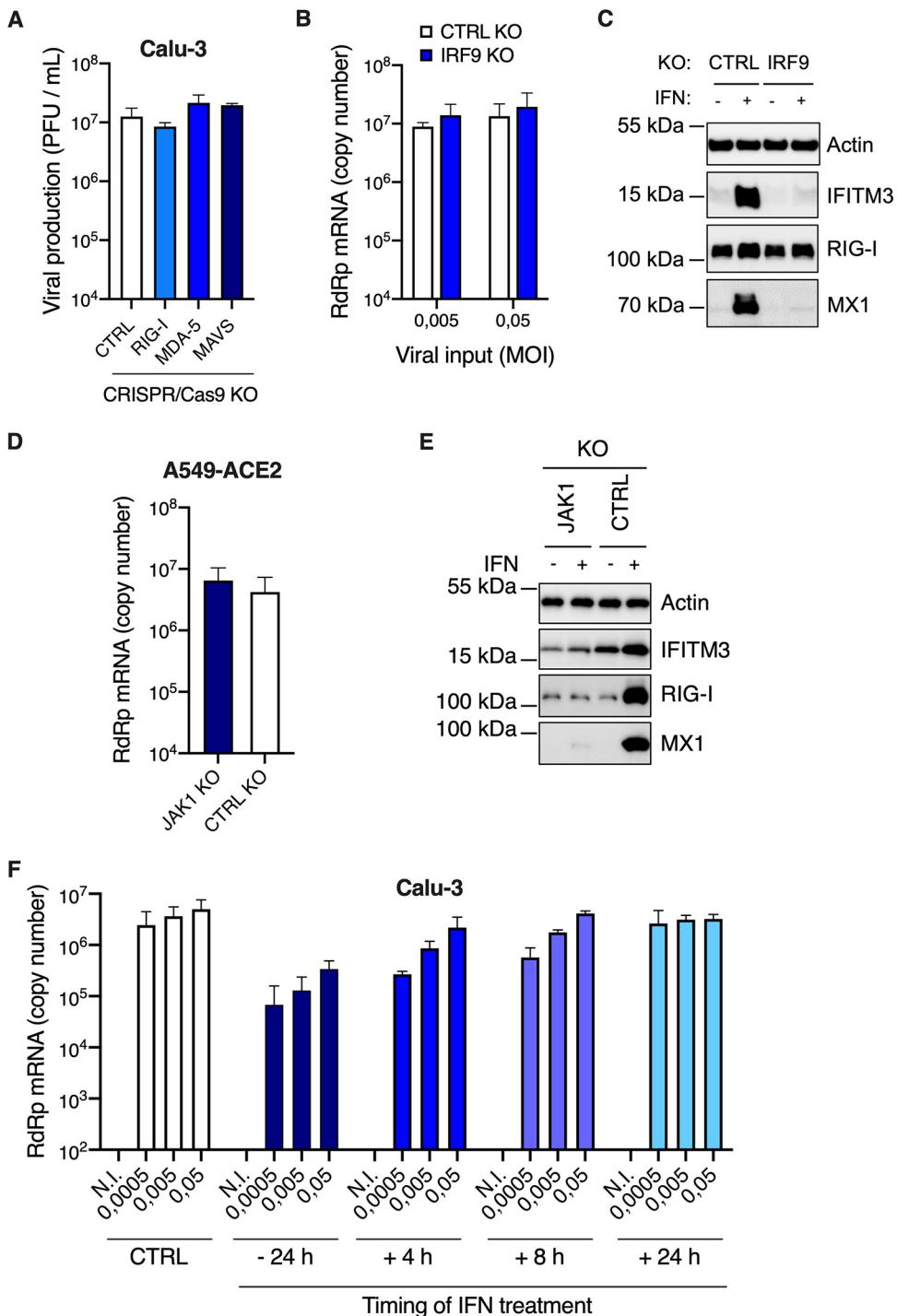


FIG 9 IFN production upon SARS-CoV-2 replication does not protect Calu-3 and A549-ACE2 cells against infection. (A) CTRL, RIG-I, MDA-5, and MAVS Calu-3 knockout (KO) cells were infected with SARS-CoV-2 at MOI 0.05 (as in Fig. 5B and C) and viral production was measured 48 h later by plaque assays on Vero E6 cells. (B) CTRL and *IRF9* Calu-3 KO cells were generated and selected. Cells were infected with SARS-CoV-2 at the indicated MOIs and viral replication was evaluated 48 h later by RdRp RT-qPCR. (C) CTRL and *IRF9* KO cells were pretreated or not with IFN for 48 h, lysed, and the expression levels of IFITM3, RIG-I, MX1, and actin were analyzed by immunoblotting. (D) CTRL and *JAK1* A549-ACE2 knockout cells were generated and selected. Cells were infected with SARS-CoV-2 at MOI 0.0005 and viral replication was measured 48 h later using RdRp RT-qPCR. (E) CTRL and *JAK1* A549-ACE2 knockout cells were pretreated or not with IFN for 48 h, lysed, and the expression levels of IFITM3, RIG-I, and MX1 were analyzed by immunoblotting, with actin serving as a loading control. (F) Calu-3 cells were infected with SARS-CoV-2 at the indicated MOIs after a 24-h pretreatment with

(Continued on next page)

amplified using the SuperScript III one-step RT-PCR system with Platinum *Taq* (Invitrogen) from 500 ng RNA obtained from 293T cells and Caco-2 cells, using primers 5'-AATTAATTAGCGGCCGATGTCAAGCTTCCTGGCTCC-3' and 5'-AATTAATTACTCGAGCTAAAAGGAGGCTGAACATCATCAGTG-3'; and 5'-AATTAATTAGCGGCCATGCCCTGCCGCC-3' and 5'-AATTAATTACTCGAGTTAGCCGTCTGCCTCATTGTC-3', respectively, and digested by NotI and Xhol. Human ACE2 was inserted into NotI-Xhol-digested pRRL.sin.cPPT.SFFV/IRES-puro.WPRE to generate pRRL.sin.cPPT.SFFV/ACE2.IRES-puro.WPRE (Addgene 145839). The IRES-puromycinR cassette was removed by Xhol-Sall digestion and either replaced by nothing, to generate pRRL.sin.cPPT.SFFV/ACE2.WPRE (Addgene 145842), or by an IRES-neomycinR cassette, to generate pRRL.sin.cPPT.SFFV/ACE2.IRES-neo.WPRE (Addgene 145840), or by an IRES-hygromycin R cassette, to generate pRRL.sin.cPPT.SFFV/ACE2.IRES-hgro.WPRE (Addgene 145841), respectively. These cassettes were obtained by overlapping PCR using primers 5'-AATTAATTCTCGAGGTTAACGAATTCGCC-3' and 5'-GTTCAATCATGGTTG GCCATATTATCATCGTGTTC-3'; and 5'-ATATGCCAACCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGC-3' and 5'-TATATACTAGTCGACTCAGAAGGCGATAG-3' on the ECMV IRES sequence and the neomycin resistance gene (amplified using pRRL.sin.cPPT.SFFV/IRES-puro.WPRE and pcDNA3.1+, respectively), and using primers 5'-AATTAATTCTCGAGGTTAACGAATTCGCC-3' and AGGCTTTTCATGGTTGTGGCCATATTATCATCGTGTTC-3'; and 5'-ATATGCCAACCATGAAAAGCCTGAACTCACCGC-3' and 5'-TTAAATTGTCGACCTATCCCTTGCCCTGACGAGTG-3' on the ECMV IRES sequence and the hygromycin resistance gene (amplified using pAHM) (54), respectively. Human TMPRSS2 was cloned into NotI-Xhol-digested pRRL.sin.cPPT.SFFV/IRES-neo.WPRE to generate pRRL.sin.cPPT.SFFV/TMPRSS2v1.IRES-neo.WPRE (Addgene 145843). Of note, a mutation (G8V) is present on the cloned CDS of TMPRSS2v1 but this does not seem to impact functionality (not shown).

The pLX_311-Cas9 and LentiGuide-Puro vectors were gifts from John Doench and Feng Zhang, respectively (55, 56) (Addgene 96924 and 52963) and we have described before the LentiGuide-Neo, LentiGuide-Neo-CTRLg1 and g2 (53) (Addgene 139449, 139450, and 139451). Guide RNA-coding oligonucleotides were annealed and ligated into BsmBI-digested LentiGuide-Neo vector, as described (Addgene). The gRNA coding sequences used were as follow: gRIG-I 5'-GGGTCTCCGGATATAATCC; gMDA-5 5'-TGTTGGACTCGGGAAATCG; gMAVS 5'-AGGTGGCCCGAGTCGATCC; gIRF9 5'-CAGCAA CTGATACACCTGT; and gJAK1 5'-TCTCGTCATACAGGGCAAAG.

Cell lines. Human 293T, A549, Caco-2 and Calu-3, HEK-Blue IFN- α/β and IFN- λ cells, and simian Vero E6 cells were maintained in complete Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin. HEK-Blue IFN- α/β and IFN- λ cells were cultured with 100 μ g/ml zeocin and 30 μ g/ml blasticidin, or 100 μ g/ml zeocin, 30 μ g/ml blasticidin, and 1 μ g/ml puromycin, respectively. Caco-2 and Calu-3 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC); HEK-Blue IFN- α/β and IFN- λ cells were obtained from InvivoGen; 293T, A549, and Vero E6 cells were gifts from Michael Malim's lab, Wendy Barclay's lab, and from the CEMPAI facility, respectively. All cell lines were regularly screened for the absence of mycoplasma contamination.

A549 and Caco-2 cells stably expressing ACE2 and TMPRSS2 were generated by transduction with either RRL.sin.cPPT.SFFV/IRES-puro.WPRE, RRL.sin.cPPT.SFFV/IRES-neo.WPRE, RRL.sin.cPPT.SFFV/IRES-hgro.WPRE, or RRL.sin.cPPT.SFFV.WPRE containing vectors (cDNA as indicated) and were maintained under 1 μ g/ml puromycin, and/or 1 mg/ml G418, 50 μ g/ml hygromycinB selection.

For CRISPR-Cas9-mediated gene disruption, A549-ACE2 and Calu-3 cells stably expressing Cas9 were first generated by transduction with LX_311-Cas9 followed by blasticidin selection at 10 μ g/ml. Cas9 activity was checked using the XPR_047 assay (a gift from David Root, Addgene 107145) and was 79.5% and >83.4%, respectively, for Cas9-expressing A549-ACE2 and Calu-3 cells. The cells were then transduced with guide RNA expressing LentiGuide-Puro and Lentiguide-Neo vectors (as indicated) and selected with antibiotics for at least 10 days.

Air-liquid cultures of primary human airway epithelial (HAE) cells of nasal, tracheal and bronchial origins from healthy donors were obtained from Epithélix (MucilAir) and cultured with MucilAir medium (Epithélix). The apical side of the HAE cells was washed when necessary and 1 day prior to IFN exposure, following the manufacturer's instructions.

When indicated, universal type I IFN (PBL Interferon source) was added at the indicated concentration (e.g., 1,000 U/ml) for 16 to 24 h prior to virus infection. For HAE cells, IFN was added both in the basal medium and on the apical side of the cells (diluted in 20 μ l of MucilAir medium, and 20 μ l of medium without IFN was added to the control cells in parallel).

Lentiviral production and infection. Lentiviral vector stocks were obtained by polyethylenimine (PEI; for LentiGuides) or Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific; for ACE2 and TMPRSS2 lentiviral vectors)-mediated multiple transfection of 293T cells in 6-well plates with vectors expressing Gag-Pol, the miniviral genome, and the Env glycoprotein at a ratio of 1:1:0.5. The culture medium was changed at 6 h posttransfection, and vector-containing supernatants were harvested 36 h later, filtered, and used directly or stored at -80°C.

SARS-CoV-2 production and infection. The BetaCoV/France/IDF0372/2020 isolate was supplied by Sylvie van der Werf and the National Reference Centre for Respiratory Viruses hosted by Institut Pasteur

FIG 9 Legend (Continued)

IFN or not, or were subsequently treated with IFN at 4 h, 8 h, or 24 h postinfection. Viral replication was measured at 48 h postinfection using RdRp RT-qPCR. The means of two (A and D) or three (B and F) independent experiments are shown, with error bars representing the SD. Representative immunoblots (C and E) are shown.

(Paris, France). The patient sample from which strain BetaCoV/France/IDF0372/2020 was isolated was provided by X. Lescure and PY. Yazdanpanah from the Bichat Hospital, Paris, France. The BetaCoV/France/IDF0372/2020 isolate was amplified in Vero E6 cells (MOI 0.005) in serum-free medium supplemented with 0.1 µg/ml L-1-p-tosylamino-2-phenylethyl chloromethyl ketone (TPCK)-treated trypsin (Sigma-Aldrich). The supernatant was harvested at 72 h postinfection when cytopathic effects were observed (with around 50% cell death), cell debris were removed by centrifugation, and aliquots were frozen at -80°C. Viral supernatants were titrated by plaque assays in Vero E6 cells. Typical titers were 3 to 5×10^6 PFU/ml.

Simian Vero E6 and human cell infections were performed at the indicated multiplicity of infection (MOI; as calculated from titers in Vero E6 cells) in serum-free DMEM and 5% serum-containing DMEM, respectively. The viral input was left for the duration of the experiment (unless specified otherwise). The viral supernatants were frozen at -80°C prior to RNA extraction and quantification and/or titration by plaque assays.

HAE cells were incubated for 2 h with SARS-CoV-2 diluted in 50 µl of PBS 1× added to the apical side. The viral input was then removed and the cells washed with 100 µl PBS 1×. To collect the progeny viruses at 24 h, 48 h, and 72 h postinfection, 50 µl of PBS 1× was added to the apical side of the cells and collected after a 20-min incubation at 37°C. The viral supernatants were frozen at -80°C prior to titration by plaque assays on Vero E6 cells. The cells were lysed in RLT buffer (Qiagen) followed by RNA extraction at 72 h postinfection.

Quantification of mRNA expression. Cells (3 to 5×10^5) with or without treatment with IFN- α and SARS-CoV-2 infection were harvested and total RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen) employing on-column DNase treatment, according to the manufacturer's instructions. Supernatants (140 µl) from infected cells were subjected to RNA extraction using the QIAamp Viral RNA minikit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Cellular RNA (125 ng) or 1.2 µl viral RNA were used to generate cDNAs. The cDNAs were analyzed by qPCR using published RdRp primers and probe (57), as follows: RdRp_for 5'-GTGARATGGTCATGTGGCGG-3', RdRp_rev 5'-CAAATGTTAAAACACTAT TAGCATA-3'; RdRp_probe 5'-FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-TAMRA-3', and/or TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) for ACTB (Hs99999903_m1), GAPDH (Hs99999905_m1), ISG15 (Hs01921425_s1), OAS1 (Hs00973637_m1), IFITM3 (Hs03057129_s1), MX1 (Hs00182073_m1), IFNB1 (Hs01077958_s1), IFNL1 (Hs00601677_g1), and IFNL2 (Hs00820125_g1). qPCRs were performed in triplicate, in universal PCR master mix using 900 nM of each primer and 250 nM probe or the indicated TaqMan assay. After 10 min at 95°C, reactions were cycled through 15 s at 95°C followed by 1 min at 60°C for 40 repeats. Triplicate reactions were run according to the manufacturer's instructions using a ViiA7 real time PCR system (Thermo Fisher Scientific). For ISG expression, GAPDH and/or ACTB mRNA expression was used to normalize samples. pRdRp (which contains an RdRp fragment amplified from SARS-CoV-2-infected cellular RNAs using primers RdRp_for and RdRp_rev and cloned into pPCR-Blunt II-TOPO) was diluted in 20 ng/ml salmon sperm DNA to generate a standard curve to calculate relative cDNA copy numbers and confirm the assay linearity (detection limit: 10 molecules of RdRp per reaction).

RT² profiler. The RT² first strand kit (Qiagen) was used for the synthesis of the cDNA strand using 400 µg of total RNA from samples extracted using the RNeasy kit (Qiagen) employing on-column DNase treatment. RT² Profiler PCR array human antiviral response (PAHS-122Z) was used in the present study, according to the manufacturer's instructions. The ViiA7 real time PCR system (Thermo Fisher Scientific) was used to amplify the DNA with a thermal cycling of 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C. Five housekeeping genes (β -actin [ACTB], β -2-microglobulin [B2M], glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [GAPDH], hypoxanthine phosphoribosyltransferase1 [HPRT1], and ribosomal protein, large, P0 [HPLP0]) were used as internal controls. The average of the threshold cycle (C_t) values from these 5 controls was used to normalize gene expression. Changes in mRNA expression between the noninfected and the infected conditions were analyzed using the $\Delta\Delta C_t$ method.

Quantification of secreted cytokines. The concentration of 13 secreted cytokines was measured in the supernatants and basal medium of infected Calu-3 and HAE cells, respectively, at the indicated conditions, using LEGENDplex bead-based immunoassays (BioLegend, human antivirus response panel), according to the manufacturer's recommendations. Samples were analyzed on a BD Canto II flow cytometer using the Diva software (BD Biosciences, San Jose, CA). BioLegend's LEGENDplex data analysis software was used to analyze data.

Immunofluorescence and microscopy. HAE cells were pretreated or not with IFN for 20 h and infected with SARS-CoV-2, as described above, for 48 h. Cells were fixed with PBS 1× containing 4% paraformaldehyde (EM Sciences) for 15 min, permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 15 min, and blocked/quenched in buffer NGB (50 mM NH₄Cl, 1% goat serum, 1% bovine serum albumin) for 1 h. An overnight incubation at 4°C with mab J2 (Scicons) followed by incubation in a secondary anti-mouse antibody conjugated to Alexa Fluor 546 and in Alexa Fluor 488 Phalloidin (Thermo Fisher Scientific) for 2 h at room temperature (RT) were used to visualize dsRNA and F-actin, respectively. The transwell membranes were removed from the inserts and mounted between slides and coverslips using ProLong Gold antifade mountant (Thermo Fisher Scientific). Images were acquired with a LSM880 confocal microscope paired with an Airyscan module (ZEISS) with a 63× lens. Postprocessing of RAW Airyscan images was performed using the Zen Black software.

HEK-Blue IFN- α/β and IFN- λ assays. HEK-Blue IFN- α/β and HEK-Blue IFN- λ cells (InvivoGen) were plated at 30,000 cells per well in a 96-well plate. The following day, medium from infected cells (or control cells) was added and a standard curve was generated in parallel by serial dilutions of type I or type III IFNs in complete DMEM. After 20 to 24 h of incubation, 30 µl of HEK-Blue IFN- α/β supernatants was added to 120 µl of Quanti-blue substrate (InvivoGen) and incubated at 37°C for 15 min. Absorbance was measured at 620 nm using an Envision plate reader (Perkin-Elmer). The standard curves were used to provide semiquantitative analyses of the IFN concentrations produced by the infected cells.

Spike intracellular staining and flow cytometry analysis. Infected cells were harvested at the indicated time points postinfection and fixed for 30 min in PBS 1× with 4% paraformaldehyde (PFA). Cells were washed once in PBS 1× and twice in BD Perm-Wash buffer and permeabilized for 15 min at RT in BD Perm-Wash buffer. Cells were incubated on ice for 30 to 45 min in fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (PBS 1×, 5% fetal calf serum [FCS]) containing a 1/250 dilution of Alexa 488-conjugated anti-spike antibody (GTX632604 conjugated using the Zenon Alexa Fluor 488 mouse IgG labeling kit, Thermo Fisher) and washed 4 times in FACS buffer. Flow cytometry was performed using the NovoCyte flow cytometer (ACEA Biosciences Inc.).

Immunoblot analysis. Cells were lysed in lysis buffer (10 mM Tris [pH 7.6], NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, EDTA 1 mM, deoxycholate 0.1%) supplemented with sample buffer (50 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% SDS, 5% glycerol, 100 mM dithiothreitol [DTT], 0.02% bromophenol blue), resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting using primary antibodies against SARS-CoV nucleocapsid (Bio-Techne NB100-56683), SARS-CoV spike (GeneTex GTX632604), actin (Sigma-Aldrich A1978), IFITM3 (Proteintech 11714-1-AP), MX1 (Thermo Fisher Scientific PA5-22101), RIG-I (Covalab mab10110), MDA-5 (Ozyme D74E4), and MAVS (ProteinTech 14341-1-AP), followed by secondary horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin antibodies and chemiluminescence Clarity or Clarity max substrate (Bio-Rad). A Bio-Rad ChemiDoc imager was used.

Requests for materials. Requests for material should be addressed to Caroline Goujon or Olivier Moncorgé at the corresponding addresses above, or to Addgene for the plasmids with an Addgene number.

Data availability. The data sets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding authors upon reasonable request.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Raphaël Gaudin, Sylvie Van der Werf, Eric Bernard, Laurence Briant, Emma Partiot, Aurélie Fort, Hélène Bauby, and Mélanie Wencker for the generous provision of reagents, protocols and/or for helpful discussions. We are immensely grateful to Christine Chable-Bessia for setting up excellent working conditions for SARS-CoV-2 handling at the CEMIPAI BSL-3 facility.

This work was supported by the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (grant agreements 759226 and 899835) (to C.G.), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) (to C.G.), the ATIP-Avenir program (to C.G.) and institutional funds from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Institut des Sciences Biologiques du CNRS (INSB) (to C.G. and O.M.), the French National Research Agency ANR under the Investissements d'avenir program with the reference ANR-16-IDEX-0006 through Montpellier University MUSE program (to C.G.), the Labex EpiGenMed (to S.N.), an Investissements d'avenir program (reference ANR-10-LABX-12-01) (to S.N.), the Région Occitanie and the Agence Nationale de la Recherche (ANR Flash COVID-19, reference ANR-20-COVI-0099) (to S.N.), 3-year PhD studentships from the Ministry of Higher Education and Research (to A.R., to B.B., and to J.M.), a 4th year PhD funding from the Fondation pour la Recherche Médicale (to B.B.), a 2-year Sidaction postdoctoral fellowship (to R.P.), and a 2-year postdoctoral grant from the Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA et les Hépatites virales, ANRS (to G.M.).

We acknowledge the imaging facility MRI, member of the national infrastructure France-Biolimaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04) and the CEMIPAI BSL-3 facility.

The authors have no conflicts of interest to declare in relation to the paper.

A.R., O.M., and C.G. conceived and designed the experiments; A.R., A.L.C.V., M.T., O.M., and C.G. performed the main experiments; G.M. and S.N. performed the LegendPlex experiments and analyses; B.B. designed the molecular cloning strategies; J.M. did the immunofluorescence and microscopy analyses; R.P. and M.A.-A. provided technical help; A.R., O.M., and C.G. wrote the manuscript with input from all authors.

REFERENCES

- Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si H-R, Zhu Y, Li B, Huang C-L, Chen H-D, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang R-D, Liu M-Q, Chen Y, Shen X-R, Wang X, Zheng X-S, Zhao K, Chen Q-J, Deng F, Liu L-L, Yan B, Zhan F-X, Wang Y-Y, Xiao G-F, Shi Z-L. 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579:270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.
- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W, China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. 2020. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 382:727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.
- Zhong N, Zheng B, Li Y, Poon L, Xie Z, Chan K, Li P, Tan S, Chang Q, Xie J, Liu X, Xu J, Li D, Yuen K, Peiris J, Guan Y. 2003. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet* 362:1353–1358. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14630-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14630-2).
- Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt H-R, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RAM, Berger A, Burguière

- A-M, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra J-C, Müller S, Rickerts V, Stürmer M, Vieth S, Klenk H-D, Osterhaus ADME, Schmitz H, Doerr HW. 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348:1967–1976. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030747>.
5. Peiris J, Lai S, Poon L, Guan Y, Yam L, Lim W, Nicholls J, Yee W, Yan W, Cheung M, Cheng V, Chan K, Tsang D, Yung R, Ng T, Yuen K. 2003. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361:1319–1325. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13077-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13077-2).
 6. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. 2012. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 367:1814–1820. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211721>.
 7. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395:497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).
 8. Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H. 2020. Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology* 158:1831–1833.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.055>.
 9. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M. 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426:450–454. <https://doi.org/10.1038/nature02145>.
 10. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu N-H, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. 2020. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 181:271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>.
 11. Hofmann H, Pyrc K, van der Hoek L, Geier M, Berkhouit B, Pöhlmann S. 2005. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7988–7993. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409465102>.
 12. Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M, Taguchi F. 2010. Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *J Virol* 84:12658–12664. <https://doi.org/10.1128/JVI.01542-10>.
 13. Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL, Bates P. 2005. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11876–11881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505577102>.
 14. Huang I-C, Bosch BJ, Li F, Li W, Lee KH, Ghiran S, Vasilieva N, Dermody TS, Harrison SC, Dormitzer PR, Farzan M, Rottier PJM, Choe H. 2006. SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells. *J Biol Chem* 281:3198–3203. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508381200>.
 15. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, Guo L, Guo R, Chen T, Hu J, Xiang Z, Mu Z, Chen X, Chen J, Hu K, Jin Q, Wang J, Qian Z. 2020. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun* 11:1620. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>.
 16. Li J, Liu Y, Zhang X. 2010. Murine coronavirus induces type I interferon in oligodendrocytes through recognition by RIG-I and MDA5. *J Virol* 84:6472–6482. <https://doi.org/10.1128/JVI.00016-10>.
 17. Park A, Iwasaki A. 2020. Type I and type III interferons—induction, signaling, evasion, and application to combat COVID-19. *Cell Host Microbe* 27:870–878. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.008>.
 18. Sa Ribero M, Jouvenet N, Dreux M, Nisole S. 2020. Interplay between SARS-CoV-2 and the type I interferon response. *PLoS Pathog* 16:e1008737. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008737>.
 19. Zalinger ZB, Elliott R, Rose KM, Weiss SR. 2015. MDA5 is critical to host defense during infection with murine coronavirus. *J Virol* 89:12330–12340. <https://doi.org/10.1128/JVI.01470-15>.
 20. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. 2019. Shared and distinct functions of type I and type III interferons. *Immunity* 50:907–923. <https://doi.org/10.1016/j.jimmuni.2019.03.025>.
 21. Haagmans BL, Kuiken T, Martina BE, Fouchier RAM, Rimmelzwaan GF, van Amerongen G, van Riel D, de Jong T, Itamura S, Chan K-H, Tashiro M, Osterhaus ADME. 2004. Pegylated interferon- α protects type I pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques. *Nat Med* 10:290–293. <https://doi.org/10.1038/nm1001>.
 22. Zheng B, He M-L, Wong K-L, Lum CT, Poon LLM, Peng Y, Guan Y, Lin MCM, Kung H-F. 2004. Potent inhibition of SARS-associated coronavirus (SCoV) infection and replication by type I interferons (IFN- α/β) but not by type II interferon (IFN- γ). *J Interferon Cytokine Res* 24:388–390. <https://doi.org/10.1089/1079990041535610>.
 23. Chan JF-W, Yao Y, Yeung M-L, Deng W, Bao L, Jia L, Li F, Xiao C, Gao H, Yu P, Cai J-P, Chu H, Zhou J, Chen H, Qin C, Yuen K-Y. 2015. Treatment with lopinavir/ritonavir or interferon- β 1b improves outcome of MERS-CoV infection in a nonhuman primate model of common marmoset. *J Infect Dis* 212:1904–1913. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv392>.
 24. Hart BJ, Dyall J, Postnikova E, Zhou H, Kindrachuk J, Johnson RF, Olinger GG, Frieman MB, Holbrook MR, Jahrling PB, Hensley L. 2014. Interferon- β and mycophenolic acid are potent inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus in cell-based assays. *J Gen Virol* 95:571–577. <https://doi.org/10.1099/vir.0.061911-0>.
 25. de Wilde AH, Raj VS, Oudshoorn D, Bestebroer TM, van Nieuwkoop S, Limpens RWAL, Posthuma CC, van der Meer Y, Bárcena M, Haagmans BL, Snijders EJ, van den Hoogen BG. 2013. MERS-coronavirus replication induces severe *in vitro* cytopathology and is strongly inhibited by cyclosporin A or interferon- α treatment. *J Gen Virol* 94:1749–1760. <https://doi.org/10.1099/vir.0.052910-0>.
 26. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu W-C, Uhl S, Hoagland D, Möller R, Jordan TX, Oishi K, Panis M, Sachs D, Wang TT, Schwartz RE, Lim JK, Albrecht RA, tenOever BR. 2020. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell* 181:1036–1045.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>.
 27. Dinnon KH, Leist SR, Schäfer A, Edwards CE, Martinez DR, Montgomery SA, West A, Yount BL, Hou YJ, Adams LE, Gully KL, Brown AJ, Huang E, Bryant MD, Choong IC, Glenn JS, Gralinski LE, Sheahan TP, Baric RS. 2020. A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. *Nature* 586:560–566. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2708-8>.
 28. Hassan AO, Case JB, Winkler ES, Thackray LB, Kafai NM, Bailey AL, McCune BT, Fox JM, Chem RE, Alsousi WB, Turner JS, Schmitz AJ, Lei T, Shrihari S, Keeler SP, Fremont DH, Greco S, McCray PB, Perlman S, Holtzman MJ, Ellebedy AH, Diamond MS. 2020. A SARS-CoV-2 infection model in mice demonstrates protection by neutralizing antibodies. *Cell* 182:744–753.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.011>.
 29. Israelow B, Song E, Mao T, Lu P, Meir A, Liu F, Alfajaro MM, Wei J, Dong H, Homer RJ, Ring A, Wilen CB, Iwasaki A. 2020. Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling. *J Experimental Medicine* 217:e20201241. <https://doi.org/10.1084/jem.20201241>.
 30. Lei X, Dong X, Ma R, Wang W, Xiao X, Tian Z, Wang C, Wang Y, Li L, Ren L, Guo F, Zhao Z, Zhou Z, Xiang Z, Wang J. 2020. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. 1. *Nat Commun* 11:3810. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17665-9>.
 31. Lokugamage KG, Hage A, de Vries M, Valero-Jimenez AM, Schindewolf C, Dittmann M, Raabsbaum R, Menachery VD. 2020. Type I interferon susceptibility distinguishes SARS-CoV-2 from SARS-CoV. *J Virol* 94:e01410-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.01410-20>.
 32. Stanifer ML, Kee C, Cortese M, Zumaran CM, Triana S, Mukenhirn M, Krausslich H-G, Alexandrov T, Bartenschlager R, Boulant S. 2020. Critical role of type III interferon in controlling SARS-CoV-2 infection in human intestinal epithelial cells. *Cell Rep* 32:107863. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107863>.
 33. Paragas J, Blatt L, Härtmann C, Huggins J, Endy T. 2005. Interferon alfacon-1 is an inhibitor of SARS-corona virus in cell-based models. *Antiviral Res* 66:99–102. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.01.002>.
 34. Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, Mack M, Zhao J, Meyerholz DK, Perlman S. 2016. Dysregulated type I interferon and inflammatory monocyte-macrophage responses cause lethal pneumonia in SARS-CoV-infected mice. *Cell Host Microbe* 19:181–193. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.007>.
 35. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, Pérez H, Charbit B, Bondet V, Chenevier-Gobeaux C, Breillat P, Carlier N, Gauzit R, Morbier C, Pène F, Marin N, Roche N, Szwebel T-A, Merkling SH, Treliyer J-M, Veyer D, Mouthon L, Blanc C, Tharaux P-L, Rozenberg F, Fischer A, Duffy D, Rieux-Laucat F, Kernéis S, Terrier B. 2020. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* 369:718–724. <https://doi.org/10.1126/science.abc6027>.
 36. Arunachalam PS, Wimmers F, Mok CKP, Perera RAPM, Scott M, Hagan T, Sigal N, Feng Y, Bristow L, Tak-Yin Tsang O, Wagh D, Coller J, Pellegrini KL, Kazmin D, Alaeddine G, Leung WS, Chan JMC, Chik TSH, Choi CYC, Huerta C, Paine McCullough M, Lv H, Anderson E, Edupuganti S, Upadhyay AA, Bosingier SE, Maecker HT, Khatri P, Roushpal N, Peiris M, Pulendran B. 2020. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science* 369:1210–1220. <https://doi.org/10.1126/science.abc6261>.

37. Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, Michailidis E, Hoffmann H-H, Zhang Y, Dorgham K, Philippot Q, Rosain J, Bézat V, Manry J, Shaw E, Haljasmägi L, Peterson P, Lorenzo L, Bizien L, Trouillet-Assant S, Dobbs K, de Jesus AA, Belot A, Kallaste A, Catherinot E, Tandjaoui-Lambotte Y, Le Pen J, Kerner G, Bigio B, Seeleuthner Y, Yang R, Bolze A, Spaan AN, Delmonte OM, Abers MS, Auti A, Casari G, Lampasona V, Piemonti L, Ciceri F, Bilguvar K, Lifton RP, Vasse M, Smadja DM, Migaud M, Hadjadj J, Terrier B, Duffy D, Quintana-Murci L, van de Beek D, Roussel L, Vinh DC, Tangye SG, Haerlynck F, Dalmau D, Martinez-Picado J, Brodin P, Nussenzwieg MC, HGID Lab, NIAID-USUHS Immune Response to COVID Group, COVID Clinicians, COVID-STORM Clinicians, Imagine COVID Group, French COVID Cohort Study Group, Milieu Intérieur Consortium, CoV-Contact Cohort, Amsterdam UMC Covid-19 Biobank, COVID Human Genetic Effort, et al. 2020. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 370:eabd4585. <https://doi.org/10.1126/science.abd4585>.
38. Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, Chen J, Ogishi M, Sabli IKD, Hodeib S, Korol C, Rosain J, Bilguvar K, Ye J, Bolze A, Bigio B, Yang R, Arias AA, Zhou Q, Zhang Y, Onodi F, Korniotis S, Karpf L, Philippot Q, Chbihi M, Bonnet-Madin L, Dorgham K, Smith N, Schneider WM, Razooky BS, Hoffmann H-H, Michailidis E, Moens L, Han JE, Lorenzo L, Bizien L, Meade P, Neehus A-L, Ugurbil AC, Corneau A, Kerner G, Zhang P, Rapaport F, Seeleuthner Y, Manry J, Masson C, Schmitt Y, Schlüter A, Le Voyer T, Khan T, Li J, COVID-STORM Clinicians, COVID Clinicians, Imagine COVID Group, French COVID Cohort Study Group, CoV-Contact Cohort, Amsterdam UMC Covid-19, Biobank, COVID Human Genetic Effort, NIAID-USUHS/TAGC COVID Immunity Group, et al. 2020. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 370: eabd4570. <https://doi.org/10.1126/science.abd4570>.
39. Pairo-Castineira E, Clohisey S, Klaric L, Bretherick AD, Rawlik K, Pasko D, Walker S, Parkinson N, Fourman MH, Russell CD, Furniss J, Richmond A, Gountouna E, Wrobel N, Harrison D, Wang B, Wu Y, Meynert A, Griffiths F, Oosthuizen W, Kousathanas A, Moutsianas L, Yang Z, Zhai R, Zheng C, Grimes G, Beale R, Millar J, Shih B, Keating S, Zechner M, Haley C, Porteous DJ, Hayward C, Yang J, Knight J, Summers C, Shankar-Hari M, Klenerman P, Turtle L, Ho A, Moore SC, Hinds C, Horby P, Nichol A, Maslove D, Ling L, McAuley D, Montgomery H, Walsh T, Pereira A, Renieri A, Shen X, et al. 2020. Genetic mechanisms of critical illness in Covid-19. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03065-y>.
40. Pizzorno A, Paday B, Julien T, Trouillet-Assant S, Traversier A, Errazuriz-Cerdeira E, Fouret J, Dubois J, Gaymard A, Lescure F-X, Dulière V, Brun P, Constant S, Poissy J, Lina B, Yazdanpanah Y, Terrier O, Rosa-Calatrava M. 2020. Characterization and treatment of SARS-CoV-2 in nasal and bronchial human airway epithelia. *Cell Rep Med* 1:100059. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100059>.
41. Chu H, Chan JF-W, Yuen TT-T, Shuai H, Yuan S, Wang Y, Hu B, Yip CC-Y, Tsang JO-L, Huang X, Chai Y, Yang D, Hou Y, Chik KK-H, Zhang X, Fung AY-F, Tsoi H-W, Cai J-P, Chan W-M, Ip JD, Chu AW-H, Zhou J, Lung DC, Kok K-H, To KK-W, Tsang OT-Y, Chan K-H, Yuen K-Y. 2020. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *Lancet Microbe* 1: e14–e23. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30004-5](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30004-5).
42. Felgenhauer U, Schoen A, Gad HH, Hartmann R, Schaubmar AR, Failing K, Drosten C, Weber F. 2020. Inhibition of SARS-CoV-2 by type I and type III interferons. *J Biol Chem* 295:13958–13964. <https://doi.org/10.1074/jbc.AC120.013788>.
43. Mantlo E, Bukreyeva N, Maruyama J, Paessler S, Huang C. 2020. Antiviral activities of type I interferons to SARS-CoV-2 infection. *Antiviral Res* 179:104811. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104811>.
44. Vanderheiden A, Rafts P, Chirkova T, Upadhyay AA, Zimmerman MG, Bedoya S, Aoued H, Tharp GM, Pellegrini KL, Manfredi C, Sorscher E, Mainou B, Lobby JL, Kohlmeier JE, Lowen AC, Shi P-Y, Menachery VD, Anderson LJ, Grakoui A, Bosinger SE, Suthar MS. 2020. Type I and type III interferons restrict SARS-CoV-2 infection of human airway epithelial cultures. *J Virol* 94:e00985-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00985-20>.
45. Lamers MM, Beumer J, van der Vaart J, Knoops K, Puschhof J, Breugem TI, Ravelli RBG, van Schayck JP, Mykytyn AZ, Duimel HQ, van Donselaar E, Riesebosch S, Kuijpers HJH, Schipper D, van de Wetering WJ, de Graaf M, Koopmans M, Cuppen E, Peters PJ, Haagmans BL, Clevers H. 2020. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science* 369:50–54. <https://doi.org/10.1126/science.abc1669>.
46. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang H-H, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, Lavin Y, Swartz TH, Madduri D, Stock A, Marron TU, Xie H, Patel M, Tuballes K, Van Oekelen O, Rahman A, Kovatch P, Aberg JA, Schadt E, Jagannath S, Mazumdar M, Charney AW, Firpo-Betancourt A, Mendu DR, Jhang J, Reich D, Sigel K, Cordon-Cardo C, Feldmann M, Parekh S, Merad M, Gnijatic S. 2020. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med* 26:1636–1643. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1051-9>.
47. Yin X, Riva L, Pu Y, Martin-Sancho L, Kanamune J, Yamamoto Y, Sakai K, Gotoh S, Miorin L, Jesus PDD, Yang C-C, Herbert KM, Yoh S, Hultquist JF, García-Sastre A, Chanda SK. 2021. MDA5 governs the innate immune response to SARS-CoV-2 in lung epithelial cells. *Cell Rep* 34:108628. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108628>.
48. Busnadio I, Fernbach S, Pohl MO, Karakus U, Huber M, Trkola A, Stertz S, Hale BG. 2020. Antiviral activity of type I, II, and III interferons counterbalances ACE2 inducibility and restricts SARS-CoV-2. *mBio* 11:e01928-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01928-20>.
49. Nchioua R, Kmiec D, Müller JA, Conzelmann C, Groß R, Swanson CM, Neil SJD, Stenger S, Sauter D, Münch J, Sparrer KMF, Kirchhoff F. 2020. SARS-CoV-2 is restricted by zinc finger antiviral protein despite preadaptation to the low-CpG environment in humans. *mBio* 11:e01930-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01930-20>.
50. Konno Y, Kimura I, Iriu K, Fukushi M, Irie T, Koyanagi Y, Sauter D, Gifford RJ, Nakagawa S, Sato K. 2020. SARS-CoV-2 ORF3b is a potent interferon antagonist whose activity is increased by a naturally occurring elongation variant. *Cell Rep* 32:108185. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108185>.
51. Miorin L, Kehrer T, Sanchez-Aparicio MT, Zhang K, Cohen P, Patel RS, Cupic A, Makio T, Mei M, Moreno E, Danziger O, White KM, Rathnasinghe R, Uccellini M, Gao S, Aydillo T, Mena I, Yin X, Martin-Sancho L, Krogan NJ, Chanda SK, Schotsaert M, Wozniak RW, Ren Y, Rosenberg BR, Fontoura BMA, García-Sastre A. 2020. SARS-CoV-2 Orf6 hijacks Nup98 to block STAT nuclear import and antagonize interferon signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:28344–28354. <https://doi.org/10.1073/pnas.2016650117>.
52. Xia H, Cao Z, Xie X, Zhang X, Chen JY-C, Wang H, Menachery VD, Rajsbaum R, Shi P-Y. 2020. Evasion of type I interferon by SARS-CoV-2. *Cell Rep* 33:108234. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108234>.
53. Doyle T, Moncorgé O, Bonaventure B, Pollpeter D, Lussignol M, Tauziet M, Apolonia L, Catanese M-T, Goujon C, Malim MH. 2018. The interferon-inducible isoform of NCOA7 inhibits endosome-mediated viral entry. *Nat Microbiol* 3:1369–1376. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0273-9>.
54. Goujon C, Moncorgé O, Bauby H, Doyle T, Ward CC, Schaller T, Hue S, Barclay WS, Schulz R, Malim MH. 2013. Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 502:559–562. <https://doi.org/10.1038/nature12542>.
55. Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, Sullender M, Ebert BL, Xavier RJ, Root DE. 2014. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol* 32:1262–1267. <https://doi.org/10.1038/nbt.3026>.
56. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. 2014. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* 11:783–784. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3047>.
57. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders DG, Haagmans BL, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, Goderski G, Romette J-L, Ellis J, Zambon M, Peiris M, Goossens H, Reusken C, Koopmans MP, Drosten C. 2020. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 25:2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.

Étude du mécanisme d'action de la protéine antivirale NCOA7-AS

Marine TAUZIET

10 Novembre 2021

Résumé

Les interférons (IFN) participent à la défense cellulaire contre les agents pathogènes viraux et bactériens en régulant l'expression des gènes stimulés par l'IFN (ISG). Parmi ces ISG, certains sont des effecteurs antiviraux, c'est-à-dire capables d'inhiber l'infection par différents virus. C'est le cas de la protéine NCOA7-AS, qui a précédemment été identifiée comme un inhibiteur de l'infection par le virus influenza A. NCOA7-AS agit au niveau de l'étape d'entrée du virus, en inhibant la fusion entre les membranes virales et endosomales. NCOA7-AS interagit avec la V-ATPase, ce qui favorise l'acidification de la voie endolysosomale et l'activité des protéases lysosomales. Dans ce contexte, nous souhaitons comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet antiviral de NCOA7-AS. Pour cela nous avons recherché les partenaires protéiques de NCOA7-AS par spectrométrie de masse et identifié quatre Sorting Nexins (SNX) SNX1/2/5/6. Ces SNX sont connues pour permettre le transport rétrograde de certains cargos, comme le CI-MPR, des endosomes vers le trans-golgi network. De plus, SNX5 a été montré récemment comme jouant un rôle essentiel dans l'autophagie viro-induite en interagissant avec Beclin1 et le complexe PI3K classe III. Nos premières expériences ont montré que NCOA7-AS semblait perturber la fonction des SNX. En effet, en présence de NCOA7-AS, un de leurs cargos, le CI-MPR, est délocalisé. Une approche de déplétion par ARN interférence a ensuite permis de montrer que les SNX5/6 contribuent à l'activité antivirale de NCOA7-AS. Par ailleurs, l'expression ectopique de NCOA7-AS favorise l'accumulation de LC3-II dans les cellules, et ceci est dépendant de la présence de SNX5/6. La déplétion de Beclin1 et l'inhibition du complexe PI3K classe III ont ensuite permis de confirmer le rôle de ces acteurs de l'autophagie dans l'activité antivirale de NCOA7-AS. En conclusion, ces résultats montrent pour la première fois un rôle des protéines SNX5/6 et de l'autophagie dans l'activité antivirale de NCOA7-AS.

Mots-clés : NCOA7-AS, virus influenza A, restriction, antivirale, interféron, SNX, V-ATPase, autophagie.