



HAL
open science

Étude du rôle de récepteurs autophagiques lors de l'infection par le virus de la rougeole

Denitsa Petkova

► **To cite this version:**

Denitsa Petkova. Étude du rôle de récepteurs autophagiques lors de l'infection par le virus de la rougeole. Virologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10311 . tel-01418980

HAL Id: tel-01418980

<https://theses.hal.science/tel-01418980>

Submitted on 18 Dec 2016

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.

Université Claude Bernard



Lyon 1



N° d'ordre : 311 - 2015

Année 2015

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole doctorale Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Spécialité : Immunologie - Virologie

soutenue publiquement le 17 décembre 2015

par

Denitsa PETKOVA

TITRE :

**Etude du rôle de récepteurs autophagiques lors de l'infection
par le virus de la rougeole**

Directeur de thèse : Pr. Mathias FAURE

JURY

Mme le Docteur Lucile ESPERT
M. le Docteur Pierre-Olivier VIDALAIN
M. le Professeur Germain TRUGNAN
M. le Docteur Pierre LAPAQUETTE
M. le Professeur Mathias FAURE

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOSNE

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier Docteur Lucile Espert et Docteur Pierre-Olivier Vidalain, qui ont accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit. Je vous remercie infiniment pour le temps que vous avez consacré à sa lecture et pour vos remarques et suggestions pertinentes. Je souhaite aussi remercier Professeur Germain Trugnan et Docteur Pierre Lapaquette, d'avoir accepté de participer à mon jury de soutenance de thèse.

Je remercie tout particulièrement Professeur Mathias Faure, mon directeur de thèse pour m'avoir accueillie dans son équipe. Mathias, je te remercie pour l'environnement stimulant que tu as créé et pour toutes ces heures de discussions scientifiques. Je te remercie pour ta confiance et de m'avoir inlassablement montré le côté positif quand je ne voyais/broyais que du noir. Je te remercie aussi de m'avoir laissé la liberté et de m'avoir encouragée à prendre des initiatives mais aussi de m'avoir recadrée quand le besoin était clairement là. Je te remercie pour ta patience, ton écoute et ta disponibilité malgré ton emploi du temps chargé. Je suis consciente de la chance que j'ai eue de travailler dans ton équipe.

Je souhaite remercier tous les membres actuels et passés de l'équipe. Je voudrais remercier Christophe pour les nombreuses discussions scientifiques, culturelles et philosophiques. Merci aussi pour tes conseils avisés concernant les manips et mon manuscrit. Je remercie Joël qui s'est occupé de ma formation à la biomol dès mon arrivée en stage. Merci aussi pour ta patience, ta bonne humeur et les provisions en chocolats pour tout le monde ! « Il n'y a pas de petits plaisirs ! ». Je voudrais ensuite remercier Clem qui m'a appris les secrets de la culture cellulaire et des infections, productions et autres titrations virales. Je remercie aussi Poulpi mon acolyte fidèle dans l'espièglerie mais aussi une épaule solide quand les temps étaient durs. Merci de m'avoir apporté tes lumières (cohérentes ;-) concernant la microscopie et de m'avoir prêté main forte. Un grand merci à toi, Aurore, pour ta bonne humeur, ton optimisme infailible et tous les conseils que tu m'as donnés ! Enfin je remercie Mathieu pour les fous rires et toutes les blagues.

Je voudrais remercier également toutes les personnes de la tour qui ont croisé mon chemin pendant ces trois ans. Je remercie en particulier « Claire-sama » de m'avoir boostée à plusieurs reprises, d'avoir toujours été disponible pour moi à la tour et en dehors. Tu as été une aide précieuse un nombre incalculable de fois ! Merci à Karim, pour les chants, les fous rires, les grimaces et tous les sushis qu'on a mangés ensemble. Merci à Ludo, Fab, Seb, Anne-Laure, François, Roberto, Mélanie et tous ceux avec qui j'ai pu discuter et rigoler pendant les heures passées à la « 5^{ème}-gauche ».

Je remercie aussi tous ceux qui font tourner la machine : le secrétariat et en particulier Véro pour sa réactivité et son aide, Isabel et Nadjat et toutes les autres personnes qui ont assuré à la laverie, ainsi que tous ceux qui se dévouent à l'entretien et le suivi des différents appareils et aux commandes des stocks communs.

Je remercie également Claire et Christophe du PLATIM pour leur aide, explications et conseils, ainsi que Thibault et Sébastien de la Cytométrie pour leur disponibilité lors de mes quelques passages au plateau.

Je voudrais remercier Christophe G. de m'avoir incitée à entreprendre cette aventure, ainsi que Pascal et Cyril qui m'y ont encouragée. Je remercie chaleureusement Inca pour ses « kits de survie du thésard en détresse » !

Un énorme merci à mes amis qui m'ont toujours encouragée et ne m'ont pas laissée baisser les bras : Anaïs, Marie, Mariya, Flore, Marine et tous les autres.

Je voudrais remercier ma famille : mes parents, grands-parents et mon oncle pour leur amour inconditionnel. Malgré les quelques 2000km vous avez toujours été présents quand ça allait et quand ça n'allait pas. Vous êtes un de mes principaux piliers et votre soutien n'a pas de prix, alors merci.

Enfin je remercie Maxime qui a toujours été là pour moi. Ton amour et ta patience ont été un véritable havre de paix. Merci pour tout. La vie est belle et le quotidien est une fête avec toi. Le voyage continue.

RESUME

La macroautophagie assure l'homéostasie cellulaire en recyclant du matériel cytosolique obsolète ou délétère et sa dérégulation est associée à plusieurs pathologies. Elle constitue aussi un mécanisme de défense car elle peut éliminer des pathogènes intracellulaires. L'étape cruciale de l'autophagie est la maturation lors de laquelle la vésicule renfermant des substrats cytosoliques, l'autophagosome, fusionne avec des lysosomes et la dégradation a lieu.

Nous nous intéressons à la régulation de l'autophagie et aux conséquences de sa perturbation lors des infections, notamment par le virus de la rougeole (VR). Les données de l'équipe montrent qu'il induit et utilise toutes les étapes de l'autophagie, afin de se répliquer efficacement. Mes travaux montrent que des protéines du virus peuvent interagir avec au moins deux protéines cellulaires NDP52 et T6BP qui sont des récepteurs autophagiques (protéines cytosoliques ayant un domaine de liaison aux autophagosomes et un domaine de liaison au substrat à dégrader, par exemple des pathogènes). J'ai alors étudié le rôle des récepteurs autophagiques T6BP, NDP52 et Optineurine dans la réplication virale. J'ai aussi participé à une étude décrivant que NDP52 et Optineurine régulent en plus la maturation.

Mes travaux de thèse démontrent un tel double rôle pour T6BP. Cependant, seuls T6BP et NDP52 sont nécessaires à la réplication du VR bien qu'elle requiert la maturation autophagique. Ainsi mes résultats suggèrent d'une part que les trois récepteurs puissent réguler la maturation d'autophagosomes distincts. D'autre part, le VR pourrait exploiter individuellement les autophagosomes dont la maturation dépend de T6BP et NDP52 pour se répliquer.

TITLE

Role of autophagy receptors in measles virus replication

ABSTRACT

Macroautophagy ensures cell homeostasis through the recycling of obsolete or deleterious cytosolic components and its deregulation is associated with several pathologies. It is also a defense mechanism as it allows the elimination of intracellular pathogens. The most important autophagic step is maturation, during which the cytosolic substrate-containing vesicle, the autophagosome, fuses with lysosomes and the degradation occurs.

We study autophagy regulation and the consequences of its disruption during infections and in particular by measles virus (MeV). Our team has shown that MeV induces and exploits all steps of autophagy, to replicate more efficiently. My results indicate that viral proteins can interact with at least two cellular proteins, NDP52 and T6BP, which are autophagy receptors (cytosolic proteins that carry an autophagosome-binding domain and a domain binding substrates that would be degraded, such as intracellular pathogens). I then studied the role of autophagic receptors T6BP, NDP52 and OPTINEURIN in viral replication. I also took part in a study describing NDP52 and OPTINEURIN as autophagosome maturation regulators.

My work depicts the same dual role for T6BP. However, only T6BP and NDP52 are necessary for MeV replication even though it requires autophagosome maturation. Thus, my results suggest that the three autophagy receptors might regulate distinct autophagosome maturation on one hand. On the other, MeV could individually exploit autophagosomes, the maturation of which is regulated by T6BP or NDP2 to replicate efficiently.

MOTS CLES / KEY WORDS

Autophagie, virus de la rougeole, récepteur autophagique, maturation autophagique

Autophagy, Measles virus, autophagy receptor, autophagy maturation

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)

INSERM U1111 – CNRS UMR5308

Université Lyon 1, ENS de Lyon

21 Avenue Tony Garnier - 69365 LYON cedex 07

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	8
Table des illustrations	13
Liste des abréviations	15
Préambule	17
A. Introduction	19
I L'autophagie	21
I.1 Types d'autophagie	21
I.1.1 Macroautophagie	21
I.1.2 Microautophagie	23
I.1.3 Autophagie médiée par les chaperonnes.....	26
I.2 Mécanismes moléculaires de la (macro)autophagie.....	28
I.2.1 L'initiation de l'autophagie.....	28
I.2.1.a Régulation de l'autophagie par le complexe ULK.....	29
I.2.1.b Régulation de l'autophagie par le complexe VPS34/Beclin-1	30
I.2.1.c Origine de la membrane du phagophore	31
I.2.1.c.i Le réticulum endoplasmique.....	32
I.2.1.c.ii Le site de contact RE-mitochondries.....	32
I.2.1.c.iii Le compartiment intermédiaire RE-appareil de Golgi.....	33
I.2.1.c.iv La membrane plasmique	33
I.2.1.c.v Autres sources membranaires.....	33
I.2.2 L'élongation de la membrane du phagophore.....	34
I.2.2.a Le système ATG5/ATG12/ATG16L1	34
I.2.2.b Le système LC3	35
I.2.3 La maturation	36
I.2.3.a Régulateurs de la maturation.....	37
I.2.3.a.i UVRAG et Rubicon.....	37
I.2.3.a.ii Les protéines GABARAP.....	38
I.2.3.a.iii Les protéines Rab	38
I.2.3.a.iv Les protéines SNARE.....	38
I.2.3.a.v Autres régulateurs.....	39
I.2.3.b Rôle du cytosquelette dans la maturation	39

I.2.4	Autophagie non canonique et utilisation non canonique de protéines autophagiques.....	41
I.2.5	Autophagie sélective	42
I.2.5.a	p62/SQSTM1.....	45
I.2.5.b	Optineurine	45
I.2.5.c	NDP52.....	46
I.2.5.d	T6BP.....	46
I.2.5.e	Autres récepteurs autophagiques.....	48
I.3	Autophagie et immunité	49
I.3.1	Xénophagie.....	49
I.3.1.a	Streptocoque de groupe A	49
I.3.1.b	Mycobacterium tuberculosis.....	50
I.3.1.c	Salmonella typhimurium	50
I.3.1.d	Adherent-invasive Escherichia coli.....	51
I.3.1.e	Staphylococcus aureus.....	51
I.3.1.f	Autres bactéries	52
I.3.2	Immunité innée	52
I.3.2.a	Autophagie et les réponses interféron.....	53
I.3.2.a.i	Interféron de type I	53
I.3.2.a.ii	Interféron de type II	56
I.3.2.b	Autophagie et la signalisation NF-κB.....	56
I.3.2.b.i	L'autophagie régule la voie NF-κB	57
I.3.2.b.ii	La voie NF-κB régule l'autophagie	58
I.3.2.c	Autophagie et inflammasome.....	59
I.3.3	Immunité adaptative	60
I.3.3.a	Autophagie et hématopoïèse.....	60
I.3.3.b	Effets sur la présentation d'antigènes.....	61
I.4	Interactions virus – autophagie.....	63
I.4.1	Induction de l'autophagie lors des infections virales.....	63
I.4.1.a	Induction suite à la reconnaissance par les TLRs	63
I.4.1.b	Induction <i>via</i> la PKR et la ribonucléase L.....	64
I.4.1.c	Le récepteur CD46 et l'induction de l'autophagie	64
I.4.1.d	Induction par le stress du RE	64
I.4.1.e	Rôle de protéines virales dans l'induction de l'autophagie	65
I.4.2	Rôle antiviral de l'autophagie.....	66

I.4.2.a	Virophagie : dégradation de composants viraux.....	66
I.4.2.b	Induction des réponses immunitaires.....	67
I.4.3	Inhibition de l'autophagie par les virus.....	68
I.4.3.a	Inhibition de l'initiation.....	68
I.4.3.b	Inhibition de la maturation.....	69
I.4.4	Rôle pro-viral de l'autophagie ou de protéines autophagiques.....	69
I.4.4.a	L'autophagie sert de plateforme de réplication.....	70
I.4.4.b	L'autophagie retarde la mort cellulaire.....	70
I.4.4.c	L'autophagie aide à l'assemblage et à la sortie des virus.....	71
I.4.4.d	L'autophagie module favorablement le métabolisme cellulaire.....	71
I.4.4.e	Autophagie et induction de la mort cellulaire.....	72
I.4.4.f	Autres rôles pro-viraux de l'autophagie.....	72
II	Le virus de la rougeole, un modèle d'étude de l'autophagie.....	74
II.1	Présentation générale du virus de la rougeole.....	74
II.2	Biologie du virus de la rougeole.....	76
II.2.1	Structure du virus de la rougeole.....	77
II.2.1.a	La nucléoprotéine N.....	77
II.2.1.b	La phosphoprotéine P.....	79
II.2.1.c	La polymérase L.....	80
II.2.1.d	La protéine de matrice M.....	80
II.2.1.e	La protéine de fusion F.....	81
II.2.1.f	La protéine hémagglutinine H.....	82
II.2.2	Cycle viral.....	83
II.2.2.a	L'entrée du VR dans la cellule cible.....	84
II.2.2.b	La transcription et la réplication virales.....	85
II.2.2.c	L'assemblage et le bourgeonnement.....	85
II.2.2.d	La formation de syncytia : mécanisme de propagation du VR.....	87
II.3	Interactions cellule hôte-virus de la rougeole.....	87
II.3.1	Les Récepteurs cellulaires du VR.....	87
II.3.1.a	Le récepteur CD46.....	87
II.3.1.a.i	Généralités.....	87
II.3.1.a.ii	Fonctions de CD46 dans la cellule.....	88
II.3.1.b	Le récepteur CD150/SLAM.....	91
II.3.1.b.i	Généralités.....	91

II.3.1.b.ii	Fonctions de CD150/SLAM	92
II.3.1.c	Le récepteur Nectine-4.....	93
II.3.1.c.i	Généralités	93
II.3.1.c.ii	Fonctions de Nectine-4.....	93
II.3.2	Rôle des protéines non-structurales lors de l'infection par le VR.....	94
II.3.2.a	Rôle de la protéine V dans l'infection par le VR.....	95
II.3.2.a.i	Inhibition de la réponse IFN-I	95
II.3.2.a.ii	Autres fonctions de la protéine V.....	96
II.3.2.b	Rôle de la protéine C dans l'infection par le VR	97
II.3.2.b.i	Inhibition de la réponse IFN-I	97
II.3.2.b.ii	La protéine C et la mort cellulaire	98
II.3.2.b.iii	La protéine C induit l'autophagie	99
II.3.3	La formation de syncytia induit l'autophagie.....	99
B.	Résultats	101
I	Contexte scientifique et objectifs de la thèse	103
II	Manuscrit.....	107
III	Résultats complémentaires.....	131
III.1	Rôle d'IRGM dans l'autophagie viro-induite	131
III.2	Rôle de p62 dans l'infection par le virus de la rougeole	137
C.	Discussion et perspectives	141
I	Rôle antiviral de l'autophagie sur le VR.....	144
I.1	Autophagie CD46-dépendante.....	144
I.2	Le récepteur autophagique p62 et le VR.....	144
II	Rôle pro-viral de l'autophagie sur le VR	145
II.1	VR et induction de l'autophagie	145
II.2	VR et maturation autophagique.....	146
II.2.1	T6BP : un nouveau régulateur de la maturation.....	146
II.2.2	Rôle de la maturation dans la réplication du VR.....	147
III	La voie NF- κ B et la réplication du VR	150
IV	Modèles.....	152
IV.1	Des substrats ciblés par les différents récepteurs sont bénéfiques ou non au VR.....	152
IV.2	Le VR pourrait entièrement contrôler l'autophagie à son bénéfice	153
V	Conclusion.....	157

Annexes	159
Annexe I	161
Annexe II.....	187
Références bibliographiques.....	197

Table des illustrations

Figure 1 : Etapes de la macroautophagie.....	22
Figure 2 : Les trois types de microautophagie sélective (chez la levure).....	23
Tableau 1 : Types d'autophagie sélective	24
Figure 3 : Autophagie médiée par les chaperonnes.....	27
.....	29
Figure 4 : Acteurs moléculaires de l'autophagie	29
Figure 5 : Rôle de Beclin-1 dans la régulation de l'autophagie	37
Figure 6 : Rôle de la Myosine VI dans la maturation des autophagosomes.	40
Figure 7 : Domaines de quelques récepteurs autophagiques.....	44
Tableau 2 : Récepteurs autophagiques (hors récepteurs à pathogènes)	48
Figure 8 : Schéma simplifié de l'induction de la réponse IFN-I	54
Figure 9 : Schématisation de la voie classique d'activation de la voie NF-κB	57
Figure 10 : Schématisation de la structure de l'inflammasome.....	59
Figure 11 : Mécanismes de présentation antigénique.....	62
Tableau 3 : Liens entre autophagie et réponses immunitaires.....	68
Figure 12 : Schéma général du virus de la rougeole.	77
Figure 13 : Structure de la nucléocapside constituée du domaine Ncore et l'ARN viral, résolue en cryo-microscopie électronique.....	78
Figure 14 : Architecture de la protéine de fusion F.....	82
Figure 15 : Représentation schématique du cycle viral du virus de la rougeole.....	83
Figure 16 : Schématisation du mécanisme d'entrée du virus de la rougeole dans la cellule hôte	84
Figure 17 Structure schématique des récepteurs cellulaire du VR.	88
Figure 18 : Schéma simplifié de l'Induction de la réponse IFN-I et le rôle antagoniste de protéines du VR	96
Figure 19 : Rôle possible d'IRGM dans la régulation de la réponse IFN-I et l'autophagie lors de l'infection par le VR.	132
Figure 20 : Interactions entre IRGM et ses partenaires.	133
Figure 21 : Recherche d'intermédiaires d'interactions entre IRGM et ses partenaires.....	135
Figure 22 : Colocalisation entre p62 endogène et LC3 ou VR-N.	137
Figure 23 : Rôle de p62 dans la réplication du virus de la rougeole.	138
Figure 24 : Rappels sur les liens autophagie-virus de la rougeole et sur la xénophagie de <i>S. Typhimurium</i>	143

Figure 25 : Modèle : Les différents récepteurs autophagiques ciblent différents substrats. 153

Figure 26 : Modèle : Le virus de la rougeole manipule toutes les étapes de l'autophagie qu'il induit
..... 156

Liste des abréviations

aa : acide aminé
ADP : adénosine diphosphate
ALFY : autophagy-linked FYVE-domain containing protein
ALIS : aggresome-like inducible structure
AMP : adénosine monophosphate
AMPK: AMP-activated protein kinase
ARNdb: ARN double brin
ARNm : ARN messenger
ARNsb: ARN simple brin
ARV : réovirus aviaire
ATP : adénosine triphosphate
BVDV: bovine viral diarrhea virus
Coxiella-containing vacuoles : CCV
ChikV : virus du Chikungunya
CMA : autophagie médiée par les chaperonnes
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
ECMV : virus de l'encéphalomyocardite
eIF : eukaryotic initiation factor
ERES : endoplasmic reticulum exit site
FMDV : virus de la maladie Foot-and-Mouth (Foot-and-Mouth disease virus)
GABARAP : γ -amino-butyric acid receptor-associated protein
GAS : Streptocoque de groupe A
GL : gouttelette lipidique
HBV : virus de l'hépatite B
HCMV : cytomégalovirus humain
HCV : virus de l'hépatite C
HHV6/8 : l'herpesvirus humain 6/8
HR : heptad repeat domain
HSV-1 : virus de l'herpès simplex 1
HTLV : virus T lymphotrope humain (Human T cell Leukemia Virus)
IFN : interféron
IFNAR : interferon- α/β receptor
IRF-3 : IFN-regulatory factor 3
ISG : interferon stimulated genes
ISGF3 : IFN-stimulated gene factor 3
ISRE : INF stimulatory response element
JEV : virus de l'encéphalite japonaise
JNK1 : c-Jun N-terminal Kinase 1
KIR : KEAP1 interacting region
LPS : lipopolysaccharide
3-MA : 3-méthyladenine

MAM : mitochondria-associated ER membrane
MAP1LC3 : microtubule-associated protein 1 light chain 3
MAP1S : microtubule-associated protein 1
MCP membrane cofactor protein
MDA-5 : melanoma differentiation associated factor 5
MDP : muramyl dipeptide
MEF : fibroblastes embryonnaires murins (mouse embryonic fibroblasts)
mTOR : mecanistic target of Rapamycin
NES: signal d'export nucléaire (nuclear export signal)
NK : cellule « natural killer »
NLS: signal de localisation nucléaire (nuclear localization signal)
NSCLC : cancer de poumon non à petite cellules (non-small cell lung cancer)
OMS : Organisation mondiale de santé
PAMP : pathogen-associated molecular pattern
PAS : pre-atophagosomal structure/phagophore assembly site
pDC : cellule dendritique plasmacytoïde
PE : phosphatidylethanolamine
PESS : panencéphalite sclérosante subaiguë
PI : phosphatidylinositol
PI3K phosphoinositide 3-kinase
PI3P phosphatidylinositol triphosphate
PKR : protéine kinase R
PRR : pattern recognition receptor
RE : réticulum endoplasmique
RIG-I : retinoic acid inducible gene I
RLR : RIG-like receptors
ROS : espèces réactives de l'oxygène
SCR : short consensus repeat
SCV : Salmonella-containing vacuole
SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise
SINV : virus Sindbis
SKICH : skeletal muscle and kidney-enriched inositol phosphatase carboxyl homology domain
SLAM : signaling lymphocyte activation molecule
SNARE : soluble NSF attachment protein receptors
STAT1/2 : signal transducers and activators of transcription 1/2
STP : régions riches en Sérine, Thréonine et Proline
TLR : Toll like receptor
TRAF6 : tumor necrosis factor-associated receptor factor 6
Treg1 : lymphocyte T régulateur de type I
TRIM : tripartite motif protein family
UPR : unfolded protein response
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VR : virus de la rougeole
VSV : virus de la stomatite vésiculaire

Préambule

L'autophagie est un processus catabolique dépendant de l'activité lysosomale. Elle participe à l'établissement et au maintien de l'homéostasie cellulaire et promeut la survie des cellules en conditions de stress. L'autophagie est également un processus de défense cellulaire autonome très puissant, capable de contrôler des infections en dégradant des pathogènes intracellulaires ou certains de leurs composants essentiels. Au-delà de leur dégradation, l'autophagie permet aussi de réguler des réponses immunitaires innée et adaptative lors d'infections bactériennes ou virales. Il a longtemps été supposé que l'autophagie est un processus non-spécifique, séquestrant et dégradant « en vrac » des composants cytosoliques. Cependant au cours des dernières années il est devenu clair que l'autophagie peut sélectionner la nature des substrats promis à la dégradation, et que cette autophagie sélective s'opère grâce à des protéines appelées récepteurs autophagiques. Ces récepteurs sont capables de reconnaître un substrat précis et de le cibler vers la machinerie autophagique pour dégradation. Aussi, plusieurs récepteurs autophagiques peuvent reconnaître divers agents pathogènes afin de faciliter leur contrôle par l'autophagie.

Bien que le rôle de l'autophagie lors des infections soit d'assurer la protection des cellules, certains microorganismes et notamment les virus, ont développé des stratégies pour y échapper, voire moduler et tirer profit de ce processus. Tel est le cas du virus de la rougeole qui promeut l'autophagie en induisant un flux complet *via* différentes voies qui lui permettent de se répliquer de façon optimale. Cependant, à ce jour les rôles potentiels des récepteurs autophagiques lors des infections par le virus de la rougeole n'ont pas été décrits. Aussi, mon travail de thèse a notamment consisté en la description du rôle de plusieurs récepteurs autophagiques dans le cadre d'infection par le virus de la rougeole. Grâce à ces travaux, j'ai pu en particulier identifier que la protéine T6BP joue un double rôle dans l'autophagie et proposer une utilisation préférentielle de certains récepteurs autophagiques, dont T6BP, par le virus de la rougeole afin de faciliter sa réplication.

Dans ce manuscrit de thèse, je présenterai dans une première partie une étude bibliographique sur le virus de la rougeole et sur l'autophagie. Dans une seconde partie, je présenterai mes résultats sous forme d'un manuscrit d'une part, et des résultats complémentaires d'autre part, notamment du projet sur lequel j'ai initié mes travaux de thèse et qui concerne une des voies d'induction de l'autophagie par le virus de la rougeole. Enfin, la dernière partie de cette thèse sera consacrée à la discussion ainsi qu'aux perspectives de ce travail.

A.Introduction

I L'autophagie

Le terme autophagie, du grec « auto » : soi et « phago » : manger, désigne le processus cellulaire autonome de dégradation lysosomale. C'est un processus très conservé du point de vue de l'évolution et est commun à toutes les cellules eucaryotes. Il a été observé pour la première fois en 1963 par le scientifique belge Christian de Duve, lauréat de Prix Nobel pour ses travaux sur les lysosomes (De Duve, 1963).

Lors de l'induction de l'autophagie, des portions du cytoplasme, contenant des éléments cellulaires divers, peuvent se retrouver enfermées dans des vésicules, dont le contenu est dégradé après fusion avec des lysosomes. Ce processus évite l'accumulation de composants délétères dans le cytoplasme et assure le recyclage de métabolites libres. L'autophagie opère à l'état basal ou bien en condition de stress. A l'état basal, elle dégrade des protéines de longue durée de vie, secondant ainsi le protéasome dans cette fonction. Elle conserve l'équilibre entre la biogénèse de nouveaux organites ou la synthèse de protéines et leur élimination. L'autophagie peut aussi être induite, afin de faire face à des conditions de stress nutritif ou oxydatif, ou encore afin d'éliminer des organites endommagés, des protéines mal conformées ou des agrégats protéiques. Enfin, l'autophagie protège la cellule des agents pathogènes intracellulaires et participe à l'immunité. L'autophagie est donc un processus qui assure l'homéostasie et la survie cellulaire.

Il existe trois types d'autophagie connus à ce jour : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA : chaperone-mediated autophagy). La CMA a lieu uniquement dans les cellules de mammifère et son mécanisme est assez différent de celui des deux autres types d'autophagie.

I.1 Types d'autophagie

I.1.1 Macroautophagie

La macroautophagie, est la première à avoir été découverte et reste la mieux caractérisée. La macroautophagie se déroule en trois étapes principales. Le processus autophagique démarre par la formation d'une structure membranaire, rappelant par sa forme une coupe et qui s'appelle phagophore. C'est l'étape d'initiation. Les extrémités du phagophore s'allongent lors de l'étape suivante qui est l'étape d'élongation, jusqu'à la fusion de ces derniers et la formation d'une vésicule à double membrane appelée autophagosome. Enfin, l'autophagosome fusionne avec un lysosome lors de l'étape de maturation. Cette fusion donne lieu à une nouvelle vésicule, appelée autolysosome

dont le contenu provenant de l'autophagosome est rapidement dégradé par des enzymes provenant du lysosome. Dans certains cas l'autophagosome fusionne d'abord avec un endosome avant que la vésicule qui en résulte, appelée amphisome, ne fusionne avec un lysosome (Figure 1).

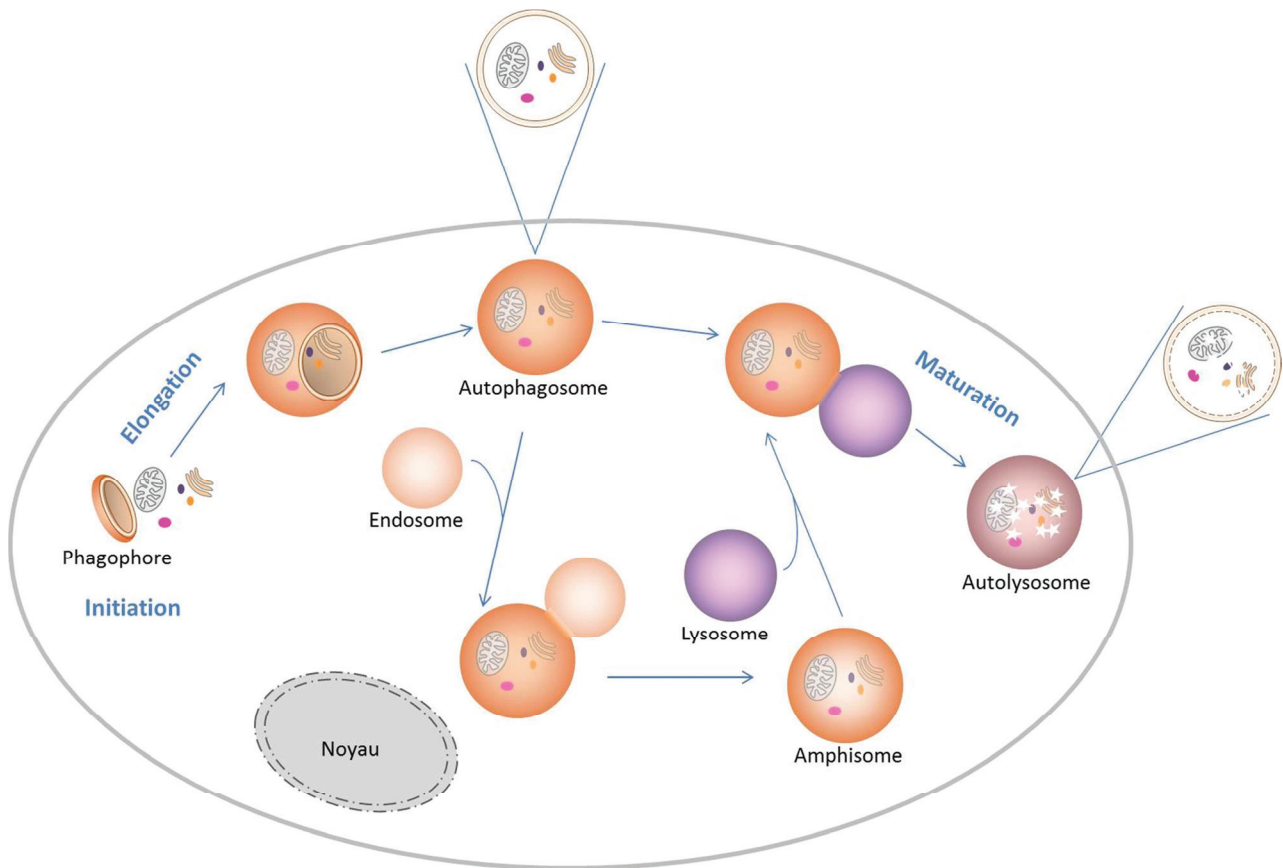


Figure 1 : Etapes de la macroautophagie.

Sont représentées également des coupes transversales de l'autophagosome et de l'autolysosome. Une caractéristique principale des autophagosomes est la présence d'une double membrane ; l'autolysosome quant à lui n'en a qu'une seule.

La macroautophagie a longtemps été considérée comme étant non sélective, c'est-à-dire que des portions du cytoplasme sont séquestrées de manière aléatoire. Ces dernières années, cette notion a été remise en question et il est possible que, quel que soient les modalités d'induction de l'autophagie, les substrats dégradés le soient de manière « choisie ». Par exemple, lors d'une carence nutritive, l'autophagie qui va servir à alimenter les cellules en ressources métaboliques va dégrader de manière séquentielle des composants cellulaires. Il est bien montré maintenant dans certains modèles que la macroautophagie peut être sélective en assurant la dégradation de substrats spécifiques tels que des organites ou des agrégats protéiques. En fonction de la nature des substrats sélectivement dégradés par la macroautophagie, une terminologie appropriée est utilisée, faisant référence à la nature même de ces substrats. Nous allons les décrire dans le Tableau 1.

I.1.2 Microautophagie

La microautophagie est également un processus de dégradation lysosomale mais contrairement à la macroautophagie, il n'y a pas de transport du matériel à dégrader dans des vésicules intermédiaires (Li et al., 2012b). En effet dans le cas de la microautophagie, c'est directement le lysosome (dans les cellules mammifères) ou la vacuole (dans les levures) qui séquestre les portions du cytoplasme. Plusieurs variantes du mode de séquestration sont possibles mais dans tous les cas la finalité est la formation d'une vésicule au sein du lysosome qui s'y déversera suite à une scission de sa membrane. La microautophagie comme la macroautophagie peut être « aléatoire » ou sélective. Il existe trois types de microautophagie sélective : la micropexophagie, la microautophagie « piecemeal » et la micromitophagie. La microautophagie est un processus constitutif mais en revanche la carence en nutriments peut l'induire. De plus l'endommagement des peroxysomes ou des mitochondries peut induire le type de microautophagie sélective correspondant. Cependant la micropexophagie et la microautophagie « piecemeal » ont été observées uniquement dans la levure tandis que la microautophagie non-sélective a été observée plutôt dans les cellules mammifères.

Lors de la micropexophagie, une fois que les peroxysomes se retrouvent à proximité de la vacuole, elle s'invagine et forme des excroissances rappelant des bras qui s'allongent et entourent les peroxysomes. Ensuite ces bras fusionnent entre eux formant ainsi une vésicule qui entraîne les peroxysomes dans la lumière de la vacuole (Li et al., 2012b) (*Figure 2*).

La microautophagie « piecemeal » du noyau se passe en cinq étapes. Tout d'abord la vacuole reçoit des signaux du noyau qui induisent son rapprochement avec ce dernier. Ensuite des points de contact se forment entre la vacuole et le noyau puis la vacuole s'invagine au niveau de la portion du noyau à séquestrer, qui elle-même subit une scission du reste du noyau. Ces processus conduisent à la formation d'une vésicule contenant une portion du noyau dans la lumière de la vacuole qui sera par la suite dégradée (*Figure 2*).

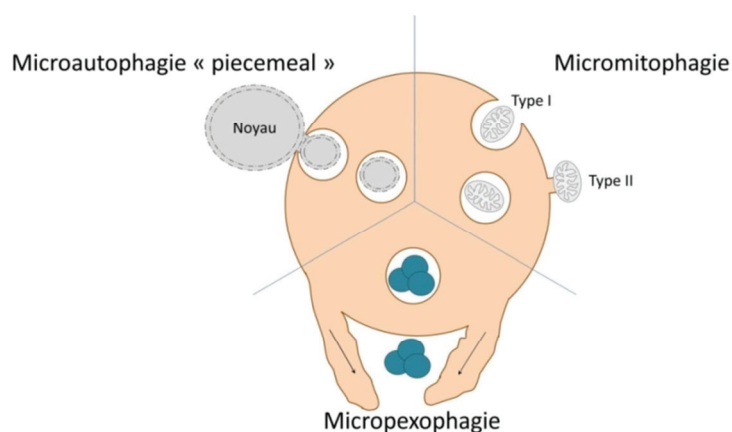


Figure 2 : Les trois types de microautophagie sélective (chez la levure)

La micromitophagie chez la levure se passe de deux manières possibles. Dans la micromitophagie de type I la vacuole séquestre directement la mitochondrie entière, ce qui correspond plutôt à un processus non sélectif. Dans le type II, qui est sélectif, la mitochondrie se rapproche de la vacuole, des zones d’ancrage se forment entre les deux et ensuite la mitochondrie est séquestrée (*Figure 2*). Ce processus est quant à lui sélectif (Kissová et al., 2007).

Nom	Substrat à dégrader et but	Récepteur(s)	Remarques
Ferritinophagie	Ferritine stockant le fer en excès Rendre le fer biodisponible (Asano et al., 2011)	NCOA4 (Dowdle et al., 2014; Mancias et al., 2014)	NCOA4 ne possède pas de domaine LIR (Mancias et al., 2014) La ferritine s’accumule dans les cellules déficientes pour l’autophagie (Kishi-Itakura et al., 2014)
Glycophagie	Glycogène (forme sous laquelle le glucose est stocké dans le foie) Assurer l’homéostasie en glucose	Stbd1 (Jiang et al., 2011)	Prévient l’hypoglycémie chez le nouveau-né (Kondomerkos et al., 2005) Rôle chez l’adulte : débattu (Kaur and Debnath, 2015)
Mitophagie	Mitochondries Elimination de mitochondries : - endommagées ou superflues (Elmore et al., 2001) - des globules rouges lors de l’érythropoïèse (Kundu et al., 2008) - paternels lors de la fécondation chez <i>C. elegans</i> (Al Rawi et al., 2011)	BNIP3, Nix, FUNDC1 mitophagie en condition d’hypoxie (Hanna et al., 2012; Liu et al., 2012; Novak et al., 2010; Zhu et al., 2013b) p62, HDAC6 (Lee et al., 2010b) : mitochondries ubiquitinées (sous l’action de Parkin) AMBRA1 (Strappazzon et al., 2015) : indépendante du recrutement de Parkin ou p62	Lors de la mitophagie Parkin-dépendante, Parkin est un intermédiaire central dans la mitophagie et est recruté au niveau des mitochondries endommagées (Narendra et al., 2008). Il ubiquitine les protéines sur la membrane externe mitochondriale. Des protéines responsables des étapes d’initiation de l’autophagie sont recrutées au niveau des mitochondries qui sont finalement incorporées dans des autophagosomes puis dégradées (Itakura et al., 2012a) La mitophagie partielle (dégradation de parties endommagées qui bourgeonnent des mitochondries) (Soubannier et al., 2012a, 2012b)
Ribophagie	Ribosomes Délivrer des acides aminés lors de privation en nutriments	Ubp3 chez la levure (Kraft et al., 2008)	La ribophagie induit une baisse de la traduction des protéines ce qui permet « d’économiser » de l’énergie et des acides aminés. Chez la souris la ribophagie peut jouer un rôle dans l’immunité car elle produit des peptides anti-microbiens suite à la dégradation de certaines protéines ribosomales (Ponpuak et al., 2010)

Tableau 1 : Types d’autophagie sélective

Nom	Substrat à dégrader et but	Récepteur(s)	Remarques
Pexophagie	Peroxisomes devenus redondants Assurer l'homéostasie des peroxysomes	p62 (Kim et al., 2008), NBR1 (Deosaran et al., 2013)	Les changements des conditions environnementales induisent la pexophagie chez les levures (Manjithaya et al., 2010) et les cellules mammifères (Cho et al., 2008) Chez l'homme les défauts de pexophagie sont observés dans les cellules vieillissantes, augmentant le stress oxydatif. Les défauts de pexophagie et les effets du vieillissement sont par conséquent exacerbés (Legakis et al., 2002).
Lipophagie	Gouttelettes lipidiques (GL) stockant des lipides Répondre aux besoins en lipides des cellules. Prévenir l'accumulation toxique de lipides (Ding et al., 2010).	Pas clairement définis. Cependant : - les protéines SNAREs sont des récepteurs possibles (Liu and Czaja, 2013) car elles sont impliquées dans la fusion des GL (Boström et al., 2007) et dans la biogénèse des autophagosomes (Moreau et al., 2011; Nair et al., 2011) - la GTPase Dynamine 2 (impliquée dans la fission de membranes) promeut la lipophagie en favorisant la maturation des autophagosomes (Schulze et al., 2013)	La carence en lipides augmente la sélectivité pour les gouttelettes lipidiques (Czaja and Cuervo, 2009; Singh et al., 2009) La lipophagie concerne les hépatocytes, les cellules dendritiques, les neurones, les cellules gliales, les fibroblastes, les cellules endothéliales (Kaur and Debnath, 2015) La lipophagie est aussi décrite chez la levure (van Zutphen et al., 2014) Chez la souris les défauts de lipophagie induisent la transition d'un état d'obésité vers un diabète insulino-résistant lors d'un stress métabolique (Lim et al., 2014)
Réticulophagie	Réticulum endoplasmique (RE) Lever le stress du RE	FAM134B (membre de la famille des protéines réticulons FAM134) (Khaminets et al., 2015; Mochida et al., 2015)	Chez la levure le stress du RE peut induire l'autophagie (Yorimitsu et al., 2006) et des fragments du RE (Bernales et al., 2006) se trouvent dans des autophagosomes. La macro-RE-phagie est un cas particulier de réticulophagie chez la levure où des protéines membranaires du RE exprimées de manière excessive sont dirigées vers la vacuole pour dégradation (Lipatova and Segev, 2015; Lipatova et al., 2013). La machinerie autophagique peut être recrutée au niveau de la portion du RE qui sera dégradée (Kario et al., 2011). Dans les cellules mammifères l'accumulation du mutant Z de la protéine α 1-antitrypsine conduit à l'induction de la réticulophagie (Teckman and Perlmutter, 2000).

Tableau 1 (suite)

Nom	Substrat à dégrader et but	Récepteur(s)	Remarques
Agréphagie	Agrégats de protéines mal conformées et ubiquitinées, non dégradés par le protéasome Contrôler la conformation des protéines	p62, NBR1 (Hytinen et al., 2014)	La protéine ALFY joue le rôle de protéine d'échafaudage pour l'agréphagie en liant p62 qui lie l'agrégat et ATG5 (crucial pour l'élongation du phagophore) (Clausen et al., 2010; Filimonenko et al., 2010) HDAC6 transporte les agrégats le long des microtubules vers le centre organisateur des microtubules. HDAC6 recrute et active la cortactine. La cortactine active la polymérisation de l'actine. Par conséquent l'actine est recrutée au niveau de l'autophagosome et la fusion avec les lysosomes facilitée (Lee et al., 2010b).
Xénophagie	Microorganismes intracellulaires Combattre les infections	p62, NDP52, OPTN, T6BP	Cf. chapitre I.3.1

Tableau 1 (suite)

I.1.3 Autophagie médiée par les chaperonnes

Le troisième type d'autophagie est l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA : chaperone mediated autophagy). La découverte de la CMA a été faite en partie grâce à l'observation que des protéines cytosoliques sont dégradées par les lysosomes à des vitesses différentes (Dice et al., 1978). La dégradation spécifique de protéines injectées dans des cellules en état de privation de nutriments a également contribué à la découverte de la CMA (Neff et al., 1981).

La CMA assure la dégradation de protéines qui ne sont pas sous la forme d'amas ou d'agrégats. C'est une forme d'autophagie très sélective car des protéines chaperonnes reconnaissent les protéines à dégrader de manière très spécifique. Ainsi elle rend possible la dégradation contrôlée de protéines ayant des fonctions enzymatiques et impliquées dans le métabolisme cellulaire. De plus, la CMA régule l'activité transcriptionnelle dans la cellule en dégradant un certain nombre de facteurs de transcription. Aussi elle effectue le contrôle qualité des protéines en dégradant des protéines mal-conformées ou non fonctionnelles (Cuervo and Wong, 2014). La CMA est également induite lors de périodes prolongées de privation de nutriments. Enfin, ce type d'autophagie favorise la présentation d'antigènes par les molécules de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité. Des dérégulations dans la CMA sont associées à de nombreuses pathologies comme des maladies neurodégénératives, des cancers, ainsi que le vieillissement (Kaushik and Cuervo, 2012).

La CMA se déroule en quatre étapes : i) : reconnaissance du substrat et transport vers le lysosome, ii) : attachement et linéarisation du substrat à la surface du lysosome, iii) : translocation du substrat dans la lumière du lysosome et enfin iv) : dégradation du substrat (*Figure 3*).

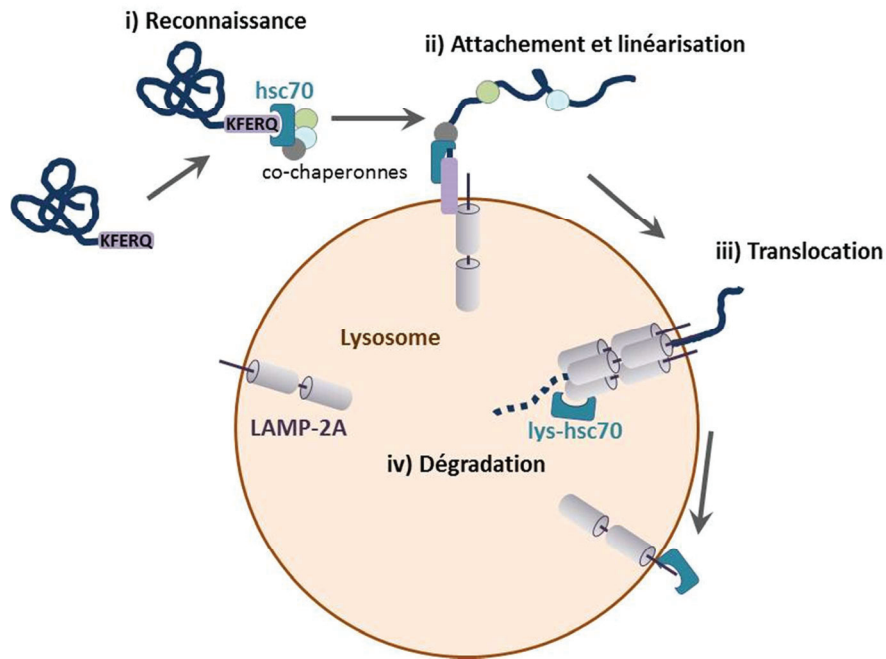


Figure 3 : Autophagie médiée par les chaperonnes

La reconnaissance du substrat se fait dans le cytosol par une protéine chaperonne appelée hsc70 (Chiang et al., 1989). Elle reconnaît un motif consensus, constitué de cinq acides aminés, présent sur tous les substrats de la CMA (Dice, 1990). Il est constitué obligatoirement d'un résidu glutamine (Q) au début ou à la fin du motif, d'une lysine (K) ou d'une arginine (R), qui sont positivement chargées, un des quatre acides aminés hydrophobes : phénylalanine (F), valine (V), leucine (L) ou isoleucine (I) et enfin soit un acide aspartique (D) soit un acide glutamique (E) qui sont négativement chargés. Enfin, le cinquième résidu peut être l'un des résidus positivement chargés ou hydrophobes que l'on vient de présenter. Il est à noter que dans le cas d'un motif incomplet, l'acétylation (de lysine) ou la phosphorylation (de thréonine, sérine ou tyrosine) de résidus directement voisins au motif peuvent ajouter une charge positive ou négative respectivement. Le motif consensus est présent dans la séquence de nombreuses protéines. Par conséquent leur dégradation doit être contrôlée par exemple grâce à une conformation qui maintient le motif « caché » au sein de la protéine. En outre il est possible que le motif soit caché si la protéine cible est en train d'interagir avec un partenaire cellulaire.

Après la reconnaissance du substrat par la chaperonne, il est amené à proximité du lysosome, où le substrat interagit avec la queue cytoplasmique de LAMP-2A. LAMP-2A se trouve à la surface des lysosomes et peut, à l'aide d'autres protéines, former un complexe multimérique qui est nécessaire pour la translocation du substrat (Bandyopadhyay et al., 2008). Après association au lysosome le substrat doit être linéarisé afin de pouvoir traverser sa membrane (Salvador et al., 2000). La linéarisation se réalise alors que le complexe multimérique de LAMP-2A est en cours de formation

et est médiée par hsc70 et ses co-chaperonnes. Le mécanisme de la translocation du substrat dans le lysosome n'est pas encore précisément connu. Cependant, la présence d'une forme lysosomale de hsc70 (lys-hsc70) est requise. Le rôle de lys-hsc70 consiste probablement à « tirer » la protéine à dégrader d'une part, et de la retenir au sein du lysosome d'autre part. Après la translocation complète de la protéine substrat, le complexe multimérique de LAMP-2A se dissocie en monomères.

Nous avons évoqué que l'accessibilité du motif consensus reconnaissable par hsc70 permet de réguler l'activité de la CMA. Un autre moyen de le faire consiste à réguler l'expression de LAMP-2A et ainsi de moduler son abondance à la membrane des lysosomes. La stabilité du complexe de translocation peut aussi moduler la CMA (Bandyopadhyay et al., 2010). Enfin, une trop grande quantité de lipides à la membrane des lysosomes inhibe la CMA (Rodriguez-Navarro et al., 2012).

I.2 Mécanismes moléculaires de la (macro)autophagie

Dans la suite du manuscrit nous allons utiliser le terme autophagie pour désigner la macroautophagie. L'autophagie est un processus très finement régulé par de nombreuses protéines dont les protéines ATG (ATG ; AuTophagy-related). Nous allons décrire les partenaires moléculaires principaux impliqués dans chacune des étapes de l'autophagie.

I.2.1 L'initiation de l'autophagie

L'un des premiers événements dans l'initiation de l'autophagie dans les cellules mammifères est le recrutement du complexe ULK, constitué des protéines ULK1 (uncoordinated-51-like kinase), ATG13, FIP200 et ATG101 (Hara et al., 2008; Hosokawa et al., 2009; Mercer et al., 2009). Un autre complexe, le complexe Beclin-1/VPS34/VPS15 est également recruté lors de l'initiation de la formation des autophagosomes. Il est composé de plusieurs protéines différentes. Son activation donne lieu à la synthèse de phosphatidylinositol triphosphate (PI3P) nécessaire au recrutement d'autres effecteurs indispensables à l'autophagie : DFCP1 (double FYVE domain-containing protein et des membres de la famille de protéines WIPI (WD-repeat protein interacting with phosphoinositides).

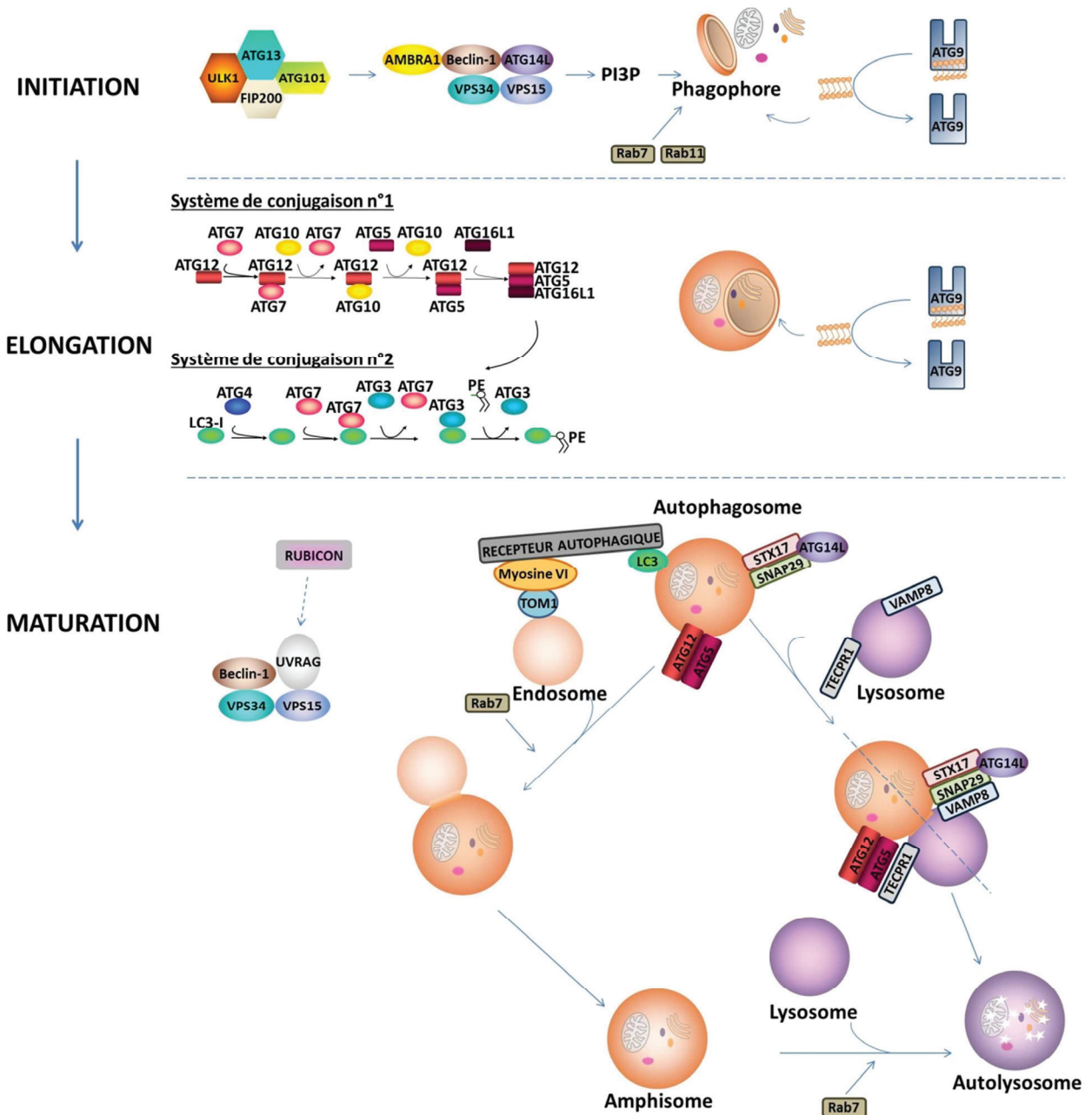


Figure 4 : Acteurs moléculaires de l'autophagie

I.2.1.a Régulation de l'autophagie par le complexe ULK

Le signal d'initiation de l'autophagie le mieux caractérisé est la présence et le niveau de nutriments (glucose et acides aminés) qui implique la sérine/thréonine kinase mTOR (mécainistic Target of Rapamycin) et AMPK (AMP-activated protein kinase).

mTOR participe à deux complexes appelés mTORC1 et mTORC2 mais seulement le premier est impliqué dans la régulation de l'autophagie. En présence de nutriments mTORC1 est directement lié au complexe ULK. Cette liaison phosphoryle la kinase ULK1 en position S₇₅₇, ainsi que ATG13, ce

qui inactive le complexe ULK1 et inhibe l'autophagie (Hosokawa et al., 2009; Kim et al., 2011; Shang et al., 2011). En condition de carence en nutriments, mTORC1 se dissocie du complexe ULK1, entraînant la déphosphorylation d'ATG13 et ULK1 et l'activation de l'activité kinase d'ULK1. Il peut ensuite phosphoryler ATG13 et FIP200 ce qui active l'autophagie. Le complexe est responsable de l'assemblage et l'élongation du phagophore, notamment en contrôlant le complexe Beclin-1 et la synthèse de PI3P (McAlpine et al., 2013) (*Figure 4*). Chez la levure l'absence de nutriments et l'inhibition de mTOR conduisent à une stabilisation de l'interaction entre ATG1 (ULK1) et ATG13 et ATG17 (FIP200), ce qui induit l'autophagie.

Une carence en glucose, acides gras ou bien du pyruvate peut activer l'AMPK. En effet la cellule produit l'énergie nécessaire au maintien de ses fonctions grâce à l'hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate) en ADP (adénosine diphosphate) puis AMP (adénosine monophosphate). L'accumulation d'AMP est détectée par l'AMPK lors de la liaison de l'AMP à la sous-unité γ de l'AMPK. Cette liaison entraîne la phosphorylation de la sous-unité α de l'AMPK par la Sérine/Thréonine kinase 11 (STK11). L'AMPK ainsi activée participe à une cascade d'évènements conduisant à l'inactivation de mTORC1 (Inoki et al., 2003) et par conséquent à l'induction de l'autophagie (Matsui et al., 2007; Meley et al., 2006). De plus AMPK peut phosphoryler ULK1 en position S₄₆₇ et S₅₅₅, ce qui active la mitophagie en condition de stress nutritif (Egan et al., 2011).

1.2.1.b Régulation de l'autophagie par le complexe VPS34/Beclin-1

Comme évoqué plus haut, l'activation du complexe ULK permet de recruter le complexe VPS34/Beclin-1 sur le site de formation du phagophore. Ce complexe est constitué de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) de type III VPS34, ainsi que de VPS15 qui la régule, mais aussi de Beclin-1, ATG14L, UVRAG (UV radiation resistance-associated) et AMBRA1 (autophagy/Beclin-1 regulator 1) (He and Levine, 2010). VPS34 génère du phosphatidylinositol triphosphate (PI3P) à partir de phosphatidylinositol (Kim et al., 2013). Cette activité dépend de l'interaction de VPS34 avec Beclin-1. Les PI3P recrutent les protéines DFCP1 (Axe et al., 2008) et WIPI (WIPI1, 2 et 4) qui permettent l'initiation de la formation du phagophore (Polson et al., 2010; Proikas-Cezanne et al., 2004, 2007).

A l'état basal, Beclin-1 est inhibé car il interagit avec plusieurs protéines dont les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L (Pattingre et al., 2005). Ces interactions peuvent être abolies par diverses événements de phosphorylation de Bcl-2 par la kinase JNK1 (c-Jun N-terminal Kinase 1) ou bien de phosphorylation de Beclin-1 par la DAPK1 (death-associated protein kinase) (Ravikumar et al., 2010a). Des modifications post-transcriptionnelles d'un groupe de protéines appartenant à la

famille des Bcl-2, appelées protéines « BH3-only », peuvent contribuer à augmenter leur affinité pour Bcl-2 et Bcl-X_L et à entrer en compétition avec Beclin-1 pour ces interactions, ce qui conduit à l'induction de l'autophagie (Maiuri et al., 2007).

Lorsque l'autophagie n'est pas induite, AMBRA1 relie le complexe VPS34/Beclin-1 au cytosquelette et plus précisément aux microtubules grâce à son interaction avec la dynéine. Si l'autophagie est induite, ULK1 phosphoryle AMBRA1, ce qui conduit au détachement du complexe des microtubules et une translocation vers le réticulum endoplasmique qui fait partie des sites de formation d'autophagosomes (cf paragraphe I.2.1.c.i) (Di Bartolomeo et al., 2010). En outre, AMBRA1 est négativement régulée par la E3 ubiquitine ligase CUL4A (Cullin 4A) (Antonioli et al., 2014). L'induction de l'autophagie induit la dissociation d'AMBRA1 et CUL4A de manière ULK1-dépendante, ce qui indique l'existence d'une boucle de régulation positive de l'induction de l'autophagie ainsi que la collaboration étroite entre les deux complexes protéiques ULK et VPS34/Beclin-1.

ATG14L est un régulateur positif de l'autophagie. Il est recruté très tôt à la membrane du phagophore en cours de formation et est nécessaire à l'activité de VPS34 et VPS15 qui constituent la PI3K de type III (Itakura et al., 2008; Matsunaga et al., 2009; Sun et al., 2008).

La protéine UVRAG interagit également avec Beclin-1. De façon intéressante UVRAG et ATG14L interagissent avec Beclin-1 de manière mutuellement exclusive. UVRAG interagit avec SH3GLB1 (SH3-domain GRB2-like endophilin B1, appelée aussi Bif-1), augmentant ainsi l'activité de la PI3K, et induit l'autophagie (Itakura et al., 2008; Matsunaga et al., 2009; Sun et al., 2008). Il est important de noter qu'UVRAG intervient également dans la maturation des autophagosomes (*Figure 4*).

AMPK peut également activer VPS34 directement en phosphorylant Beclin-1 (Kim et al., 2013). Enfin la protéine Bif-1 et la protéine Rubicon interagissent également avec le complexe VPS34/Beclin-1 et potentiellement modulent son activité (He and Levine, 2010). Cependant les mécanismes qui les relient à la formation des autophagosomes ne sont pas encore bien connus.

I.2.1.c Origine de la membrane du phagophore

Nous avons vu que l'étape la plus précoce dans le processus autophagique est la formation du phagophore. Sa formation a lieu au niveau de la structure pré-autophagosomale (PAS : pre-atophagosomal structure/phagophore assembly site). L'imagerie de cellules vivantes a révélé que les autophagosomes se forment au bout de 5-10 min après le début de la carence en nutriments. Ceci suggérerait que les autophagosomes naissent à partir de structures déjà préassemblées et/ou grâce

à un transport de lipides et protéines très efficace (Tooze, 2013). De nombreux organites ont été proposés comme source de la membrane du phagophore, que nous allons détailler.

I.2.1.c.i Le réticulum endoplasmique

Nous avons déjà évoqué l'interaction entre DFCP1 et le PI3P (Axe et al., 2008). DFCP1 colocalise avec le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi contrairement aux autres protéines qui interagissent avec PI3P qui sont cytosoliques. La carence en nutriments induit des structures ponctiformes positives pour DFCP1 sur le RE (Axe et al., 2008). Des études plus poussées de ces structures montrent que des membranes positives pour un des marqueurs des autophagosomes, LC3 (cf le paragraphe I.2.2.b) se forment à partir de ces structures que les auteurs ont appelées des omégasomes à cause de leur forme (Axe et al., 2008). Deux autres études suggèrent que le phagophore se forme au niveau des omégasomes sur le RE (Hayashi-Nishino et al., 2009; Ylä-Anttila et al., 2009). Des extensions étroites reliant le RE et le phagophore ont été observées dans la deuxième étude. De plus ATG14L qui est associé au complexe d'initiation de l'autophagie VPS34/Beclin-1 forme également des structures ponctiformes sur le RE en condition de carence de nutriments (Matsunaga et al., 2010). ULK1 et ATG5 colocalisent pour la plupart avec des structures ponctiformes positives pour la protéine transmembranaire VMP1 (vacuole membrane protein 1) déjà présentes sur le RE (Koyama-Honda et al., 2013). VMP1 localise au RE indifféremment des niveaux cellulaires de nutriments ce qui pourrait suggérer que VMP1 est un marqueur du PAS. Cependant l'absence de VMP1 n'empêche pas l'autophagie mais induit une accumulation aberrante de protéines ATG sur le RE. Ceci indique que VMP1 intervient dans des étapes tardives de l'autophagie, malgré le fait qu'il précède le recrutement des ATGs (Itakura and Mizushima, 2010).

I.2.1.c.ii Le site de contact RE-mitochondries

Une autre étude a émis l'hypothèse que les membranes mitochondriales jouent un rôle dans la formation du phagophore en cas de carence en nutriments (Hailey et al., 2010). De manière intéressante, seulement les protéines qui se trouvent sur la surface externe de la membrane externe des mitochondries sont capables de colocaliser avec des structures ponctiformes positives pour LC3. Finalement les modèles décrivant le RE et les mitochondries comme source de la membrane du phagophore ont été réconciliés un peu plus tard (Hamasaki et al., 2013). En effet la zone de contact entre le RE et les mitochondries a été proposée comme une source possible de la membrane du phagophore. Les membranes du RE associées aux mitochondries (MAM : mitochondria-associated ER membrane) contiennent les sites de contact entre ces deux organites. Les MAM ont été isolées par

fractionnement subcellulaire et en condition de privation de nutriments des représentants du complexe VPS34/Beclin-1 y ont été détectés. On retrouve ainsi VPS34, VPS15, Beclin-1 et ATG14L. De manière intéressante la protéine SNARE, associé au RE, Syntaxin 17 (STX17) est responsable du recrutement d'ATG14L dans les MAMs. L'absence de STX17 induit une accumulation de structures ponctiformes ATG14L-positives en dehors des MAM (Hamasaki et al., 2013) et une accumulation de structures autophagiques ATG5-positifs mais jamais d'autolysosomes (Itakura et al., 2012b).

I.2.1.c.iii Le compartiment intermédiaire RE-appareil de Golgi

Récemment le compartiment intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi a été proposé comme une autre source possible de la membrane du phagophore (Ge et al., 2013). En effet, des expériences de fractionnement subcellulaire de cellules murines ont révélé que LC3 est préférentiellement associé à des membranes portant des marqueurs de ce compartiment. En outre, la rupture de ce compartiment induit une diminution du recrutement d'ATG14L.

I.2.1.c.iv La membrane plasmique

La membrane plasmique est également une source possible du phagophore (Ravikumar et al., 2010b). D'après ces travaux ATG16L1 interagit avec les chaînes lourdes de la clathrine qui est impliquée dans l'endocytose. Ainsi ce processus est capable de former des précurseurs d'autophagosomes. En effet l'inhibition de l'endocytose clathrine-dépendante induit une baisse du nombre de structures ponctiformes ATG16L1-positives ainsi que le nombre d'autophagosomes. Des études complémentaires ont révélé que ces précurseurs fusionnent entre eux pour former des phagophores. Ces fusions dépendent de quelques protéines SNARE dont VAMP7 (Moreau et al., 2011). Enfin ATG9 colocalise avec des endosomes et interagit de manière transitoire avec des phagophores et des autophagosomes. Ainsi les membranes endosomales pourraient également être sources de membranes pour l'assemblage des autophagosomes et le transport de ces membranes s'effectuerait grâce à ATG9 (Orsi et al., 2012).

I.2.1.c.v Autres sources membranaires

Des études chez la levure ont révélé que l'appareil de Golgi pourrait être à l'origine de la membrane du phagophore (van der Vaart et al., 2010). Enfin d'autres études chez la levure ont déterminé qu'un compartiment particulier du RE, appelé le site de sortie du réticulum endoplasmique (ERES : endoplasmic reticulum exit site) pourrait servir de source aux phagophores (Graef et al., 2013; Suzuki et al., 2013).

L'ensemble de ces découvertes indique qu'il existe plusieurs sources de membrane du phagophore. L'utilisation de l'une de ces sources pourrait dépendre du contexte d'induction de l'autophagie.

1.2.2 L'élongation de la membrane du phagophore

Nous avons déjà mentionné un rôle de la protéine ATG9 dans l'élongation du phagophore dans le sous-chapitre précédent. C'est la seule protéine ATG qui est transmembranaire. Elle colocalise partiellement avec LC3, en revanche elle ne se retrouve pas sur les autophagosomes (Orsi et al., 2012). En effet, ATG9 est proposé comme un transporteur de lipides vers le site de formation des autophagosomes (Lamb et al., 2013). L'élongation du phagophore est régie également par deux systèmes de conjugaison « ubiquitin-like » : le système ATG5/ATG12/ATG16L1 et le système LC3. Ces deux systèmes ressemblent au système de conjugaison de l'ubiquitine. En effet il y a nécessité d'une enzyme d'activation (enzyme E1-like), d'une enzyme de conjugaison (E2-like) et enfin d'une enzyme de ligation (E3-like) (*Figure 4*), que nous allons détailler.

1.2.2.a Le système ATG5/ATG12/ATG16L1

Ce premier système de conjugaison donne lieu au complexe ATG5/ATG12/ATG16L1 qui sert de ligase pour le système LC3 et est donc crucial pour l'élongation et la formation de l'autophagosome. La formation du complexe commence par l'activation d'ATG12 en son extrémité C-terminal par ATG7. ATG12 et ATG7 sont liés de manière transitoire suite à quoi ATG12 est transféré à ATG10 (enzyme E2-like). Ensuite ATG12 est lié de façon covalente à ATG5 sur un résidu lysine conservé. Cette ligation se fait de manière directe, sans l'assistance d'enzyme E3-like (Klionsky and Schulman, 2014). Le complexe ATG5/ATG12 s'associe par une liaison non-covalente à la protéine ATG16L1. Le domaine coiled-coil de cette dernière promeut l'oligomérisation du complexe tri-protéique en larges complexes multimériques qui peuvent atteindre plus de 300kDa. ATG16L1 est responsable de l'association de ces complexes à la membrane de l'autophagosome en cours de formation (Fujita et al., 2008; Suzuki et al., 2007) grâce notamment à l'interaction d'ATG16L1 avec la protéine FIP200 du complexe ULK (Nishimura et al., 2013). ATG16L1 lie également la protéine WIPI2b ce qui permet de relier le complexe de conjugaison avec PI3P, ainsi que de définir les sites de lipodation de LC3 et donc la localisation de LC3 au niveau des autophagosomes (Dooley et al., 2014).

I.2.2.b Le système LC3

La protéine MAP1LC3 (Microtubule-associated protein 1 light chain 3, appelée LC3 dans le reste du manuscrit), exprimée dans les cellules mammifères, fait partie de la famille des protéines ATG8-like, qui ne contient qu'un seul représentant chez la levure, ATG8. Cette protéine joue un rôle primordial dans le contrôle de la biogénèse des autophagosomes (Kaufmann et al., 2014). En effet, elle contrôle l'élongation et la fermeture du phagophore notamment grâce à son rôle de plateforme d'interactions protéine-protéine (Shintani et al., 2002). Cependant le rôle dans l'élongation du phagophore ne semble pas s'opérer par une induction directe de fusion avec des membranes. La conjugaison d'ATG8 avec la phosphatidylethanolamine (PE), un lipide de forme conique qui s'ancre dans la membrane du phagophore, pourrait plutôt modifier la fluidité de cette dernière rendant sa croissance possible (Klionsky and Schulman, 2014; Nair et al., 2011).

Chez les mammifères la famille ATG8 se compose de 3 protéines LC3 (LC3A, LC3B et LC3C), de deux protéines de la famille GABARAP (γ -amino-butyric acid receptor-associated protein) : GABARAP et GABARAPL1, ainsi que de la protéine GABARAPL2 qui est le seul représentant de la famille GATE-16 (Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa). Malgré leur structure relativement similaire, il a été montré que les LC3 ont un rôle plutôt dans les étapes précoces de l'autophagie, tandis que les GABARAP seraient impliquées dans les étapes de maturation (Weidberg et al., 2010).

La protéine LC3 existe sous deux formes. La forme LC3-I, qui est non lipidée, est une forme cytosolique. C'est la forme LC3-II, conjuguée à la PE, qui est ancrée à la membrane des autophagosomes. LC3 est synthétisée sous une forme précurseur inactive dont une partie en C-ter est clivée par la cystéine protéase ATG4 pour aboutir à la forme LC3-I. Il est à noter que chez la levure il existe une seule forme d'ATG4, tandis que dans les cellules mammifères il y a quatre protéines ATG4 (ATG4A/B/C et D). Leurs différentes fonctions ne sont pas encore déterminées avec précision mais il est connu qu'ATG4B clive les protéines LC3, tandis que ATG4A serait responsable du clivage des protéines GABARAP (Li et al., 2011b). LC3-I est activée par ATG7 (protéine E1-like) et est ensuite transférée à ATG3 (protéine E2-like). En outre une étude très récente a montré qu'ATG3 sert de détecteur de la courbure membranaire et favoriserait ainsi la lipidation de LC3/GABARAP aux extrémités du phagophore qui présentent une très forte courbure (Nath et al., 2014). Enfin sous l'action du complexe ATG5/ATG12/ATG16L1 (E3-like) LC3 est liée de manière covalente à la PE, pour former la forme LC3-II. Ainsi LC3-II peut s'ancrer sur les deux faces du phagophore en croissance.

Après la fermeture de l'autophagosome, ATG4 remplit encore une fois des fonctions de clivage de LC3, cette fois en clivant LC3-II de la membrane externe de l'autophagosome au niveau du site de conjugaison à la PE (Kirisako et al., 2000). Ainsi ces protéines sont libérées dans le cytosol et recyclées. A l'inverse, le LC3-II se trouvant enfermé dans l'autophagosome reste ancré à la

membrane et sert de marqueur de ces vésicules. Enfin, quand l'autophagosome fusionne avec un lysosome lors de la maturation, ce LC3-II est dégradé en même temps que le reste du contenu de l'autophagosome.

Parmi les protéines ATG8, c'est LC3B qui est la mieux caractérisée et la plus utilisée pour mesurer l'activité autophagique d'une cellule. Cela peut se faire par la mesure de la conversion de LC3-I en LC3-II par Western blot car les deux formes migrent à des vitesses différentes. En effet LC3-II conjugué à la PE migre plus rapidement que LC3-I. En microscopie de fluorescence on peut visualiser la distribution de LC3 dans la cellule. LC3-I présente une distribution diffuse dans le cytosol, tandis que LC3-II est concentrée sur les autophagosomes et par conséquent présente une distribution ponctiforme. Cette visualisation peut se faire soit par un marquage de LC3 en immunofluorescence, soit en utilisant des cellules transfectées (stablement ou de manière transitoire) avec la protéine de fusion GFP-LC3. La propriété de LC3-II à s'ancrer sur les autophagosomes peut être utilisée en cytométrie en flux pour distinguer entre les deux formes. En effet, une perméabilisation de la membrane cellulaire avec de la saponine permet l'élimination de la forme cytosolique de LC3 par les pores formés. Ainsi l'intensité du signal correspondant à LC3-II uniquement peut être mesurée. Enfin les autophagosomes peuvent être observés en microscopie électronique grâce à leur morphologie unique révélant la présence d'une double membrane (Klionsky et al., 2012).

Les protéines LC3 peuvent interagir avec de nombreuses protéines qui contiennent un motif d'interaction avec LC3, appelé motif LIR (LC3-interacting region), ce qui permet leur recrutement au niveau de l'autophagosome. Ainsi LC3 a un deuxième rôle en dehors de sa participation à l'assemblage de l'autophagosome, qui est de servir de point d'ancrage de substrats à la membrane interne de l'autophagosome. De manière intéressante ces deux fonctions sont mutuellement exclusives (Kaufmann et al., 2014). Les interactions de LC3 sont particulièrement bien décrites dans le cas de l'autophagie sélective que nous allons détailler plus loin dans le manuscrit.

1.2.3 La maturation

La maturation est l'étape finale du processus autophagique. En effet c'est lors de la maturation que la dégradation des substrats a lieu. La maturation doit être régulée en plusieurs étapes. La première est la fusion des autophagosomes ou des amphisomes avec les lysosomes. Ensuite l'acidification de l'autolysosome résultant doit être également contrôlée. Le dernier niveau de régulation est le recyclage des métabolites dégradés.

La fusion de l'autophagosome avec les endosomes ou les lysosomes se fait après la fermeture de l'autophagosome. Dans le cas contraire le contenu risque de se déverser dans le

cytosol, ce qui conduirait à un défaut de dégradation (Ganley, 2013). Ainsi les régulateurs de la fusion devraient pouvoir reconnaître les autophagosomes fermés. Cependant à ce jour aucun marqueur de fermeture des autophagosomes n'est connu. Certaines études suggèrent un rôle d'ATG8, qui serait également impliqué dans la fermeture, dans cette signalisation. En effet des études chez la levure indiquent que l'absence d'ATG8 sur la membrane externe du phagophore serait le signal de fermeture de l'autophagosome en assurant l'enlèvement de la machinerie d'initiation et d'élongation (cf sous-chapitre précédent) (Nair et al., 2012; Yu et al., 2012).

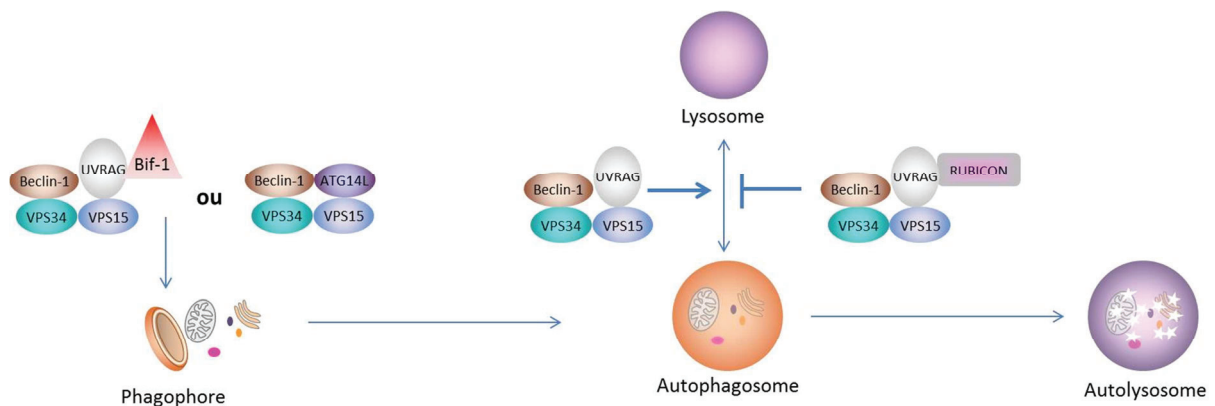


Figure 5 : Rôle de Beclin-1 dans la régulation de l'autophagie

I.2.3.a Régulateurs de la maturation

I.2.3.a.i UVRAG et Rubicon

Nous avons vu dans le paragraphe I.2.1.b qu'UVRAG peut participer à l'initiation de l'autophagie grâce à son interaction avec Bif-1 (Itakura et al., 2008; Matsunaga et al., 2009; Sun et al., 2008). Aussi, quand UVRAG s'associe à Beclin-1 dans le complexe avec VPS34, VPS15 et Beclin-1, il participe à la maturation des autophagosomes. Si en revanche UVRAG lie Rubicon alors qu'il est associé au complexe VPS34/Beclin-1, il inhibe la maturation (Matsunaga et al., 2009; Zhong et al., 2009) (Figure 5). Il a été récemment montré que mTORC1 qui est fortement impliqué dans les stades d'induction de l'autophagie (cf paragraphe I.2.1.a), régule positivement la liaison entre UVRAG et Rubicon (Kim et al., 2015b). Le complexe mTORC1 lie et phosphoryle UVRAG en conditions basales. La phosphorylation d'UVRAG renforce la liaison avec Rubicon, ce qui a un effet inhibiteur sur la maturation dépendante d'UVRAG.

Très récemment un autre rôle de Rubicon a été montré. En effet Rubicon est nécessaire à la phagocytose associée à LC3 (LAP : LC3-associated phagocytosis) qui participe à la lutte contre

Aspergillus fumigatus. Rubicon participe au recrutement de LC3-II, ATG7 et le complexe VPS34/Beclin-1/UVRAG à la membrane de ces phagosomes (LAPosomes). Leur maturation dépend de la présence de LC3-II à leur membrane (Martinez et al., 2015). Ainsi Rubicon promeut la maturation des LAPosomes et inhibe celle des autophagosomes.

I.2.3.a.ii Les protéines GABARAP

Nous avons évoqué dans le paragraphe I.2.2.b que les protéines GABARAP sont plutôt impliquées dans la maturation des autophagosomes. Une récente étude a apporté des éléments complémentaires pour la compréhension de ce processus (Wang et al., 2015). Dans cette étude les auteurs ont montré que les protéines GABARAP recrutent la phosphatidylinositol 4-kinase II α , appelée PI4KII α au niveau de l'autophagosome. PI4KII α est capable de générer PI4P (phosphatidylinositol 4-phosphate) et est en effet connue comme étant capable de lier les GABARAP. Ainsi cette kinase génère le PI4P directement au niveau des autophagosomes ce qui est indispensable à la fusion avec les lysosomes.

I.2.3.a.iii Les protéines Rab

Les protéines Rab appartiennent à la famille des Ras GTPase et peuvent hydrolyser la GTP en GDP. Plusieurs protéines Rab sont impliquées dans la régulation de l'autophagie. Par exemple la protéine Rab7 favorise la fusion entre les autophagosomes et des endosomes tardifs ou des lysosomes (Jäger et al., 2004). La protéine Rab11 quant à elle facilite la fusion entre les autophagosomes et les endosomes tardifs chez la drosophile en condition de carence en nutriments (Szatmári et al., 2014). La même observation a été faite dans des lignées de cellules erythroleucémiques (Fader et al., 2008).

I.2.3.a.iv Les protéines SNARE

Parmi les régulateurs de la maturation on retrouve également certaines protéines SNARE. Ce sont des protéines transmembranaires qui suite au rapprochement de deux compartiments possédant des SNARE adaptées, peuvent former un complexe très stable. La formation de ce complexe libérerait de l'énergie qui promeut la fusion entre les deux compartiments. Le complexe nécessite une protéine ayant un résidu arginine (R) dans le motif SNARE sur l'une des membranes, appelée R-SNARE et trois protéines ayant un résidu glutamine (Q) dans le motif SNARE sur l'autre membrane (Ganley, 2013). Ainsi la Q-SNARE Vti1b et les R-SNARE VAMP8 sont impliquées dans la fusion des autophagosomes avec des lysosomes dans le cas de la dégradation de Streptocoques de

groupe A (Furuta et al., 2010). Une autre équipe a identifié la Q-SNARE Syntaxin 17 comme étant spécifique au processus autophagique. Elle est recrutée au niveau des autophagosomes spécifiquement. La perte de son expression conduit à la perte de fusion avec les lysosomes mais n'a pas d'effet sur la fusion avec des endosomes (Itakura et al., 2012b). Enfin un autre groupe a montré que la protéine ATG14L intervient positivement dans la formation du complexe entre le complexe bi-protéique Syntaxin 17-SNAP29 et VAMP8. Ainsi ATG14L promeut la fusion des autophagosomes avec des endosomes et des lysosomes (Diao et al., 2015).

I.2.3.a.v Autres régulateurs

Les protéines ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) jouent un rôle important dans le trafic endosomal et la biogénèse des endosomes tardifs. Le complexe ESCRT III peut être impliqué dans la fusion des autophagosomes avec les endosomes tardifs et les lysosomes (Lee et al., 2007b). Les protéines lysosomales LAMP-1 et LAMP-2 sont également nécessaires à la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (Huynh et al., 2007; Tanaka et al., 2000). Par ailleurs, le complexe ATG5-ATG12 interagit avec la protéine lysosomale TECPR1 (Tectonin β -propeller repeat-containing protein 1) ce qui contribue à la fusion avec les lysosomes dans les cellules mammifères (Chen et al., 2012). Une étude récente montre qu'ATG16L1 et TECPR1 partagent le même site de liaison sur ATG5. Ainsi, le complexe ATG5-ATG12 remplirait un double rôle dans la régulation de l'autophagie de manière séquentielle, en fonction du partenaire qui lie ATG5 (Kim et al., 2015a).

D'autres travaux récents ont décrit la protéine PLEKHM1 (Pleckstrin homology domain containing protein family member 1) comme nécessaire à la maturation (McEwan et al., 2015). Cette protéine est un effecteur de Rab7 (cf I.2.3.a.iii) et participe au recrutement de la protéine SNARE Syntaxin 17 (cf I.2.3.a.iv) sur les autophagosomes grâce à son domaine LIR. La perte de PLEKHM1 conduit à un défaut de maturation et de dégradation d'agrégats protéiques.

I.2.3.b Rôle du cytosquelette dans la maturation

Le cytosquelette a de nombreuses fonctions dans les cellules comme la motilité et la division cellulaire, ainsi que le maintien de la morphologie cellulaire. De plus les microtubules et les filaments d'actine qui font partie du cytosquelette participent au transport de protéines et de membranes, notamment dans le processus autophagique (Monastyrska et al., 2009).

Les microtubules sont constitués de dimères de tubuline α et β et sont des polymères polarisés. L'extrémité (-) est souvent rattachée au centrosome, tandis que l'extrémité (+) se trouve à

la périphérie de la cellule. Les mouvements le long des microtubules sont assurés par des molécules moteurs appelés kinésine (transport vers la périphérie) et dynéine (transport vers le centrosome). De manière surprenante, les microtubules ne sont pas nécessaires à l'autophagie dans la levure. En revanche, dans les cellules mammifères ils facilitent la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Monastyrska et al., 2009). En effet, les autophagosomes se forment à des endroits différents dans la cellule, tandis que les endosomes tardifs et les lysosomes se trouvent dans la zone périnucléaire. Ainsi les autophagosomes se déplacent le long des microtubules pour fusionner efficacement avec ces vésicules (Kimura et al., 2008). De plus, l'absence de dynéine conduit à l'accumulation de LC3-II et une réduction de la dégradation d'agrégats protéiques (Ravikumar et al., 2005). De même, l'accumulation de lysosomes dans la région périnucléaire, qui est le résultat de l'abolition de l'expression de certaines kinésines, augmente la fusion avec les autophagosomes (Korolchuk et al., 2011). Plusieurs protéines assurent l'attachement des autophagosomes aux microtubules. En effet la protéine MAP1S (microtubule-associated protein 1) interagit avec LC3 et participe à son recrutement sur les microtubules (Xie et al., 2011). Aussi, la protéine FYCO1 (FYVE and coiled-coil domain-containing protein) peut lier LC3 et Rab7 et favoriser le transport des autophagosomes le long des microtubules (Pankiv et al., 2010). Rab7 est une petite GTPase, associée à la membrane de l'autophagosome. Récemment il a été montré que dans les neurones, la protéine d'échafaudage JIP1 qui est capable de lier la dynactine (qui active les dynéines) et la kinésine-1 lient les autophagosomes aux microtubules *via* son interaction avec LC3 (Fu et al., 2014).

Figure protégée (Figure S8C, Tumbarello et al., 2012)

Figure 6 : Rôle de la Myosine VI dans la maturation des autophagosomes. Adapté de (Tumbarello et al., 2012).

1) La Myosine VI se déplace le long des filaments d'actine après avoir lié des endosomes grâce à l'interaction avec Tom1. Ainsi elle délivre les endosomes près des autophagosomes. **2)** La Myosine VI s'assemble en dimères dont un des monomères lie les endosomes *via* l'interaction avec Tom1, tandis que l'autre monomère interagit avec l'un des récepteurs autophagiques sur les autophagosomes. **3)** La Myosine VI s'associe aux autophagosomes grâce à Tom1 puis elle interagit avec les récepteurs autophagiques. En se déplaçant sur les filaments d'actine, la Myosine VI emmène les autophagosomes vers les lysosomes.

Les filaments d'actine jouent également un rôle dans le transport et la fusion des autophagosomes avec les lysosomes notamment dans les cellules mammifères. De manière

surprenante, une étude a montré un lien entre l'agrégation et la polymérisation de l'actine (Lee et al., 2010b). Les auteurs ont montré que HDAC6 (hystone déacétylase 6) promeut le recrutement d'une protéine, appelée cortactine au niveau des autophagosomes. La cortactine peut activer la polymérisation de l'actine. La perte de ces deux protéines ou bien la perturbation de la polymérisation de l'actine inhibe l'agrégation mais pas l'autophagie « aléatoire ». De plus une des protéines moteurs associées à l'actine, appelée Myosine VI est également impliquée dans la maturation puisque l'inhibition de son expression conduit à l'accumulation d'autophagosomes (Tumbarello et al., 2012). La Myosine VI interagit avec Tom 1, qui appartient aux protéines ESCRT (cf paragraphe I.2.3.a.v), liée aux endosomes. Ceci suggère une importance de Myosine VI dans la fusion entre autophagosomes et endosomes (*Figure 6*). Enfin, il a été montré que Myosine VI interagit avec trois protéines appartenant à la famille des récepteurs autophagiques (cf paragraphes I.2.5.b, I.2.5.c et I.2.5.d) : Optineurine, NDP52 (appelée aussi Calcoco2) et T6BP (appelée également TAX1BP1 ou Calcoco3). Ces protéines lient des substrats spécifiques qui doivent être dégradés d'une part et possèdent un domaine LIR pour l'interaction avec LC3 d'autre part. Ainsi les travaux de Tumbarello *et al.* suggèrent une double fonction de ces (ou du moins certaines) protéines.

En conclusion, l'acidification des lysosomes est l'étape décisive de la maturation et par conséquent de l'autophagie (Mehrpour et al., 2010). Ainsi l'inhibition de l'acidification des lysosomes, inhibe l'activité des enzymes ayant une action dégradative, et le flux autophagique est bloqué. Les agents pharmacologiques Chloroquine ou Bafilomycine A1 sont des inhibiteurs de la maturation et sont régulièrement utilisés pour étudier le flux autophagique.

I.2.4 Autophagie non canonique et utilisation non canonique de protéines autophagiques

Les mécanismes que nous avons décrits jusque-là font partie de l'autophagie dite canonique. Cependant, il existe d'autres mécanismes, indépendants de certaines des protéines ATGs, qui régulent l'autophagie dite non canonique. La plupart du temps, l'autophagie non canonique survient lors d'induction en conditions très particulières. Nous allons en donner quelques exemples ici. Par exemple il existe une voie d'autophagie indépendante d'ATG5 et d'ATG7 où la formation des autophagosomes repose sur Rab9 (Nishida et al., 2009). Il existe également une autophagie dépendante d'ATG5 et ATG7 mais qui est Beclin-1 indépendante. Ce cas de figure se présente quand par exemple des cellules cancéreuses du cancer du sein sont exposées au resveratrol (Scarlatti et al., 2008), ou bien lors de l'exposition à l'hémolysine de la bactérie *S. aureus* (Mestre et al., 2010). Un autre exemple est l'induction d'une autophagie indépendante de Beclin-1 par l'acide oléique, un

acide gras non saturé (Niso-Santano et al., 2015). De plus, l'inhibition de l'expression d'un membre des protéines SNARE, appelé α SNAP induit un flux autophagique complet indépendamment de Beclin-1 (Naydenov et al., 2012). Une autre étude a montré que le mécanisme principal d'élimination des mitochondries dans les réticulocytes est l'autophagie ULK1-dépendante mais d'ATG5-indépendante (Honda et al., 2014).

Enfin un rôle dans l'induction de l'autophagie par PI5P quand VPS34 est inhibé a récemment été découvert (Vicinanza et al., 2015). Ce lipide est assez mal connu pour le moment en raison de sa faible abondance. Dans ces travaux le rôle de PI5P dans la biogénèse des autophagosomes se substitue à celle de PI3P et pourrait expliquer des observations précédentes d'autophagie PI3P-indépendante (Zhou et al., 2010).

L'autophagie non canonique peut être induite lors d'infections virales ; En effet, l'infection par le virus de la maladie Foot-and-Mouth (FMDV) induit l'autophagie en l'absence de VPS34 (Berryman et al., 2012).

La phagocytose LC3-dépendante (LAP : LC3-associated phagocytosis) est un exemple d'utilisation non canonique de protéines autophagiques où des substrats et en particulier des pathogènes phagocytés se retrouvent dans des vésicules à simple membrane, marquées par la protéine autophagique LC3 (Sanjuan et al., 2007). Le recrutement de LC3 sur les phagosomes dépend d'ATG5 et d'ATG7 ainsi que de l'activité de Beclin-1 et facilite la fusion avec les lysosomes et par conséquent la dégradation.

ATG5 est décrite aussi comme capable d'assurer le transport de protéines IRG qui contribuent au contrôle de l'infection par des microorganismes intracellulaires. En effet, dans des macrophages murins infectés avec *Toxoplasma gondii* ATG5 est nécessaire au recrutement de la GTPase IIGP1 à la vacuole contenant le parasite afin de la détruire (Zhao et al., 2008).

IFN γ requiert le complexe ATG5/ATG12/ATG16L1 mais pas la formation d'autophagosomes pour empêcher l'assemblage du complexe de réplication du norovirus murin (Hwang et al., 2012).

Enfin, ATG5 et ATG16L1 sont nécessaires pour l'exocytose de granules contenant des peptides antimicrobiens dans la lumière de l'intestin par les cellules de Paneth chez l'homme et la souris (Cadwell et al., 2008).

1.2.5 Autophagie sélective

Nous avons déjà vu que l'autophagie n'est pas uniquement un processus de dégradation aléatoire, mais peut cibler sélectivement différents substrats. En effet nous avons vu en détail les différents types d'autophagie dirigée contre des organites spécifiques ou des agrégats spécifiques.

Nous avons évoqué également que l'autophagie peut protéger les cellules d'agents pathogènes notamment des bactéries en les dégradant sélectivement lors d'un processus qui s'appelle xénophagie. L'autophagie sélective s'opère grâce à des molécules adaptatrices appelées récepteurs autophagiques dont le but est de relier un substrat donné à la machinerie autophagique. Il existe plusieurs récepteurs autophagiques dont l'étude est un sujet de recherche en plein essor.

La caractéristique commune aux récepteurs autophagiques est la présence d'un domaine LIR (LC3-interacting region) ou AIM (ATG8 interacting motif) dans le cas des levures, qui permet le ciblage des substrats vers le phagophore en croissance. Ces récepteurs possèdent également un domaine qui permet la reconnaissance de leur cible. Le domaine LIR correspond à une courte séquence qui, quand elle est « canonique » se trouve sous la forme suivante : $X_3X_2X_1W_0X_1X_2LX_3$. La position W est appelée site tryptophane et peut être constituée d'un des trois acides aminés : tryptophane (W), phénylalanine (F) ou tyrosine (Y). La position L est appelée site leucine et peut être constituée d'un des trois acides aminés : leucine (L), isoleucine (I) ou valine (V). En général au moins un des résidus X_3 , X_2 ou X_1 est un acide aspartique (D) ou un acide glutamique (E). Si ce n'est pas le cas un de ces deux acides se trouve en position X_1 et/ou X_2 (Johansen and Lamark, 2011). Quand LC3 interagit avec un récepteur il adopte une conformation qui permet la formation de deux « poches » hydrophobes, capables d'accueillir le site W et le site L (Suzuki et al., 2014). En revanche la nécessité d'un acide aminé peut être substituée par un événement post-traductionnel de phosphorylation. Ainsi Optineurine nécessite une phosphorylation d'une sérine en amont du site W, occupé par une phénylalanine dans ce cas, pour interagir efficacement avec LC3 (Rogov et al., 2013).

Ces récepteurs autophagiques peuvent soit interagir avec des substrats ubiquitinés ou bien lier ces derniers directement. Par exemple les protéines p62 (Pankiv et al., 2007), NDP52 (Thurston et al., 2009), Optineurine (Johansen and Lamark, 2011) et NBR1 (Kirkin et al., 2009) contiennent des domaines de liaison à l'ubiquitine. En outre Optineurine et NDP52 peuvent également lier des substrats sans l'intermédiaire de l'ubiquitine (Korac et al., 2013; Thurston et al., 2012). D'autres récepteurs recrutent les substrats en interagissant directement avec eux. Par exemple une protéine appelée Stbd1 (Starch-binding domain-containing protein 1) possédant un motif LIR qui lui permet de lier GABARAPL1 interagit avec le glycogène et est potentiellement impliquée dans la glycophagie (Jiang et al., 2011) (cf Tableau 1).

Une étape clé pour la compréhension des interactions entre les récepteurs et LC3 est la découverte récente d'un motif AIM/LIR tridimensionnel (Kaufmann et al., 2014). Il implique la phénylalanine 185 et l'isoleucine 111. Ce domaine se trouve sur ATG12 dans le complexe avec ATG5 et est requis pour le recrutement du complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 par ATG8 à la membrane du phagophore.

De façon intéressante, une étude sur l'affinité de liaison de différents peptides avec GABARAP (Weiergräber et al., 2008) a révélé qu'un peptide interagit avec GABARAPL1 *via* un motif LIR « inversé ». En effet l'interaction se fait grâce à un résidu leucine en position 9 et de manière surprenante le tryptophane en position 11. Le résidu tryptophane se trouve donc du côté C-terminal du peptide.

Il existe également des récepteurs qui ne portent pas de domaine LIR, mais qui interagissent tout de même avec LC3, comme c'est le cas de la protéine NCOA4, indispensable pour la ferritinophagie (Dowdle et al., 2014; Mancias et al., 2014). Enfin, il existe des protéines qui sont importantes pour l'autophagie sélective et qui servent d'échafaudage pour lier les substrats à la machinerie autophagique. Tel est le cas par exemple de la protéine ALFY qui lie p62, elle-même liant des agrégats protéiques d'un côté et ATG5 de l'autre (Filimonenko et al., 2010).

Enfin, la protéine T6BP (connue encore sous le nom Tax1BP1 ou Calcoco3) a également été proposée comme étant un récepteur autophagique (Newman et al., 2012). Cette protéine contient plusieurs LIRs potentiels et un domaine de liaison aux ubiquitines. La caractérisation de cette protéine dans l'autophagie reste incomplète et concerne une partie de mon travail de thèse qui sera présenté dans les sections résultats et discussion.

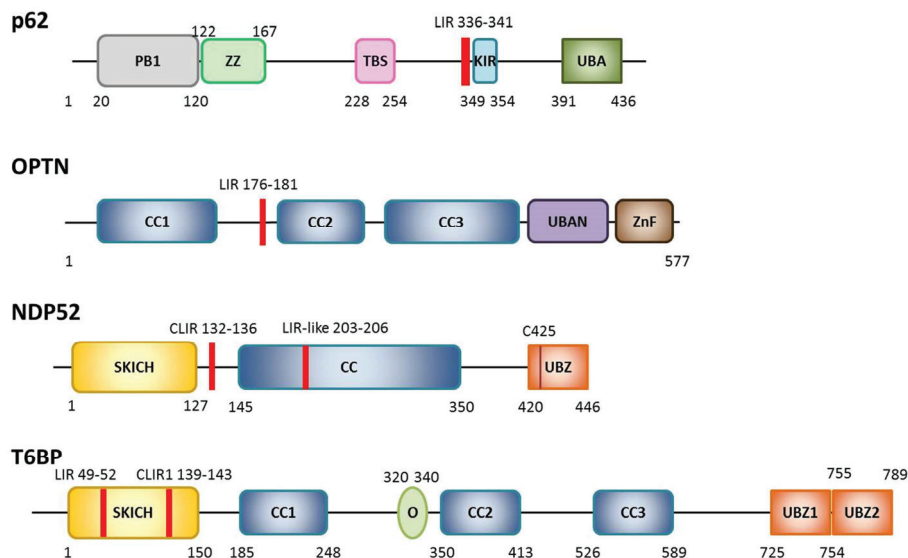


Figure 7 : Domaines de quelques récepteurs autophagiques

p62 : le domaine PB1 permet l'oligomérisation de p62, TBS : domaine de liaison à TRAF6, ZZ : domaine en doigt de zinc de type ZZ (capable de lier deux ions de zinc), KIR : domaine de liaison à KEAP1, UBA : ubiquitin associated

OPTN : CC : domaine coiled-coil, UBAN : ubiquitin binding in ABIN and NEMO domain, ZnF : domaine en doigt de zinc

NDP52 : SKICH : skeletal muscle and kidney-enriched inositol phosphatase carboxyl homology domain, CLIR: domaine LIR non canonique, CC : domaine coiled-coil, UBZ : ubiquitine-binding zinc finger

T6BP : SKICH : skeletal muscle and kidney-enriched inositol phosphatase carboxyl homology domain, CLIR: domaine LIR non canonique, CC : domaine coiled-coil, le domaine O est responsable de l'oligomérisation de T6BP, UBZ : ubiquitine-binding zinc finger.

I.2.5.a p62/SQSTM1

Le premier récepteur autophagique identifié est la protéine p62 appelée encore SQSTM1 (Sequestosome 1) (Bjørkøy et al., 2005; Pankiv et al., 2007). C'est une protéine de 440 aa qui possède un domaine PB1 en N-terminal un domaine en doigt de zinc (ZnF), un domaine LIR, un domaine KIR (KEAP1 interacting region) et un domaine d'interaction avec l'ubiquitine (UBA) en C-terminal (*Figure 7*). Le domaine PB1 soutient l'homopolymérisation de p62 ainsi que des interactions avec d'autres protéines. Le domaine PB1 possède des surfaces chargées de manière opposée, ce qui induit la homopolymérisation en « tête à queue » de p62. Les domaines PB1 et UBA permettent à p62 d'agrégier des substrats ubiquitinés. La protéine p62 possède également des domaines de signalisation de localisation et export nucléaire (NLS et NES respectivement). Ces domaines lui permettent de se déplacer entre le noyau et le cytoplasme de la cellule. Le domaine UBA reconnaît les protéines mono-ubiquitinées ainsi que les chaînes poly-ubiquitinées K48 et K63.

Nous avons déjà évoqué le rôle de p62 dans la dégradation autophagique de protéines mal conformées (cf Tableau 1). En effet, ces protéines sont reconnues et ubiquitinées par les chaperonnes. La reconnaissance de l'ubiquitine par p62 ainsi que la capacité de p62 à s'agrégier et à interagir avec LC3, induisent la formation de structures ALIS (aggresome-like inducible structure), ainsi que leur dégradation. Il est à noter que p62 est également impliquée dans la xénophagie de plusieurs bactéries comme nous allons le voir dans le paragraphe I.3.1.

La protéine p62 est un récepteur autophagique mais est également substrat de l'autophagie. Ainsi elle peut être utilisée comme indicateur du flux. En effet, un blocage de la maturation induit une accumulation de p62 qui peut être visualisée par Western blot. Cependant, l'interprétation des résultats concernant le flux sur la base des quantités de p62 doivent être faites avec précaution. Cette protéine peut également être dégradée par le protéasome. Aussi, sa transcription (et donc la quantité de protéine) peut être altérée dans certains cas (Klionsky et al., 2012).

I.2.5.b Optineurine

Optineurine possède un domaine coiled-coil, un domaine en doigt de zinc et un domaine LIR mais également un domaine appelé UBAN (ubiquitin binding in ABIN and NEMO domain) lui permettant de se lier à l'ubiquitine (ABIN : A20 binding and inhibitor of NF- κ B, NEMO : NF- κ B essential modulator) (Majcher et al., 2015) (*Figure 7*). Optineurine est impliqué dans la dégradation par xénophagie de différentes bactéries mais aussi dans l'agrégation ubiquitine-indépendante. (Korac et al., 2013). Optineurine participe également à la mitophagie et est recrutée par des mitochondries marquées par la protéine Parkin ubiquitinée (Wong and Holzbaur, 2014). Dans la

mesure où Optineurine peut s'oligomériser grâce à son domaine coiled-coil, il est possible qu'elle forme des agrégats suite à sa liaison aux substrats, à l'instar de p62.

I.2.5.c NDP52

La protéine NDP52 est constituée d'un domaine SKICH (skeletal muscle and kidney-enriched inositol phosphatase carboxyl homology domain), d'un domaine coiled-coil, d'un domaine UBZ, capable de lier l'ubiquitine mais également de deux domaines LIR (von Muhlinen et al., 2012; Verlhac et al., 2015, Annexe 1) (*Figure 7*). La protéine NDP52 est également impliquée dans la xénophagie.

Le premier domaine LIR est un domaine dit non canonique puisqu'il manque un résidu aromatique en position W. Ce domaine est nécessaire à la liaison avec LC3C et par conséquent est indispensable au ciblage des bactéries vers les autophagosomes. Il est à noter que les autres protéines homologues d'ATG8 sont incapables d'induire une xénophagie efficace contre cette bactérie (von Muhlinen et al., 2012). Ce domaine non canonique est appelé domaine CLIR (non canonical LIR domain). De plus, NDP52 lie les bactéries ubiquitinées par son domaine UBZ ou bien reconnaît la Galectin 8 qui lie des glycanes exposés sur les glycoprotéines cellulaires des endosomes internalisant des bactéries. Le deuxième domaine LIR, qui est également un domaine non classique, est quant à lui essentiel à la maturation des autophagosomes mais aussi à une xénophagie efficace comme le montre un travail de l'équipe récent auquel j'ai participé (Verlhac et al., 2015, Annexe 1). Le site de liaison à la Myosine VI de NDP52 qui se trouve dans son domaine UBZ est également indispensable à la maturation car il serait responsable de la fusion des autophagosomes avec des endosomes. En plus de la xénophagie et le rôle dans la maturation, NDP52 recrute TBK1 (Tank-binding kinase) qui participe à la signalisation menant à la production d'IFN-I, qui permet aussi de limiter la prolifération bactérienne (Thurston et al., 2009).

De manière intéressante, Optineurine et NDP52 peuvent être localisées dans des domaines communs sur *Salmonella typhimurium*, ce qui soulève la question de savoir si ces deux protéines remplissent des rôles similaires ou complémentaires dans la xénophagie de cette bactérie.

I.2.5.d T6BP

La protéine T6BP (TRAF6-binding protein), aussi appelée Calcoco3 ou Tax1BP1 (Tax1-binding protein 1) est surtout connue pour son rôle de régulateur négatif de la voie NF- κ B. Elle a été initialement identifiée comme un partenaire de la protéine Tax du virus HTLV-1 (human T-cell leukemia virus 1) grâce à un crible en double hybride chez la levure (Gachon et al., 1998). T6BP interagit également avec la protéine en doigt de zinc A20 qui a des fonctions anti-apoptotiques (De

Valck et al., 1999). Par ailleurs, la perte de l'interaction entre T6BP et A20 conduit à une incapacité complète d'A20 d'inhiber l'activation de la voie NF- κ B induite par le TNF- α (Klinkenberg et al., 2001). En outre T6BP facilite l'interaction entre A20 et TRAF6, qui est un activateur des I κ B kinases (IKK) (Boone et al., 2004; Iha et al., 2008). L'association entre T6BP et TRAF6 inhibe l'activation de la voie NF- κ B induite par les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1. Cette action inhibitrice se fait grâce à l'activité déubiquitinase d'A20 qui déubiquitine la lysine K63 de TRAF6. TRAF6 ne peut alors plus recruter les kinases TAK1 et IKK qui ne sont par ailleurs pas activées. Ainsi la signalisation de NF- κ B est inhibée. T6BP contribue de cette manière au retour à un état homéostatique et prévient des réponses inflammatoires exacerbées (Ruland, 2011).

La séquence canonique de la protéine T6BP possède 789 acides aminés. En effet il existe quatre isoformes de T6BP, suite à un épissage alternatif de l'ARNm (UniProt : Q86VP1). L'isoforme 2 est délétée de 42 acides aminés par rapport à la séquence canonique (les acides aminés 604 à 645 sont absents). Les isoformes 3 et 4 sont délétées également de cette séquence ainsi que des 184 ou des 157 premiers acides aminés respectivement. L'isoforme 2 appelée encore TXBP151-L est la plus largement exprimée (De Valck et al., 1999).

T6BP est structurellement très proche de NDP52 (*Figure 7*). T6BP possède un domaine SKICH, trois domaines coiled-coil deux domaines zinc finger, qui lient l'ubiquitine (Ceregido et al., 2014), mais aussi la Myosine VI, comme c'est le cas de NDP52 (Morriswood et al., 2007). Enfin, T6BP possède le même domaine LIR atypique que NDP52 avec la séquence D₁₃₉M₁₄₀L₁₄₁V₁₄₂V₁₄₃ (Newman et al., 2012). De plus T6BP est capable d'interagir avec LC3B, LC3C et GABARAP, avec des affinités possiblement différentes d'après les données de co-purification par affinité. Un second motif LIR, se trouvant à l'extrémité N-ter, a été proposé dans ces travaux : W₄₉V₅₀G₅₁I₅₂. La mutation individuelle de ces deux domaines LIR entraîne la perte d'interaction avec LC3B puisque les mutants ne colocalisent plus avec les autophagosomes marqués par la protéine de fusion GFP-LC3B stablement exprimée. Enfin un troisième domaine LIR hypothétique a été proposé, sur la base de comparaison avec la séquence consensus (Kalvari et al., 2014). Ainsi T6BP agit comme un récepteur autophagique, liant des substrats avec les phagophores en cours d'élongation. De plus l'inhibition simultanée de l'expression des trois protéines NDP52, Optineurine et T6BP conduit à un défaut de la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (Tumbarello et al., 2012). Cependant, jusque-là le rôle individuel de chacune de ces trois protéines n'était pas connu. Des travaux très récents de notre équipe ont montré que NDP52 rend possible la maturation des autophagosomes en soutenant la fusion des autophagosomes avec des lysosomes par le biais d'un nouveau domaine pseudo-LIR. Le récepteur Optineurine régule également positivement la maturation des autophagosomes (Verlhac et al., 2015, Annexe 1). En revanche un rôle éventuel dans la régulation de la maturation ou de l'autophagie n'a

pas été clairement démontré pour T6BP. D'éventuels rôles de T6BP en tant que récepteur à pathogènes sont également à explorer.

1.2.5.e Autres récepteurs autophagiques

Les récepteurs que nous venons d'évoquer en détail ont été décrits comme étant des récepteurs à pathogènes. Cependant, p62 par exemple ainsi que plusieurs autres protéines peuvent détecter d'autres substrats afin de les cibler vers une dégradation autophagique. Par exemple la protéine NBR1 dont les caractéristiques structurales rappellent p62 (domaine PB1, domaine LIR, domaine UBA) a été décrite comme un récepteur dans la pexophagie (Deosaran et al., 2013) et l'agrégophagie (Hyttinen et al., 2014).

Très récemment plusieurs membres de la famille des protéines TRIM (tripartite motif protein family) ont été décrits comme étant des récepteurs autophagiques. Les protéines TRIM avaient été connus pour leurs rôles dans l'immunité, notamment en régulant la signalisation des TLRs et des RLRs par exemple (Kawai and Akira, 2011). Une étude très récente a montré que plusieurs membres de cette famille sont impliqués dans l'autophagie dite de précision (autophagie très spécifique durant laquelle l'initiation et la nucléation se forment *in situ*, au niveau du substrat) (Kimura et al., 2015). Cette étude a montré que TRIM20 reconnaît des composants de l'inflammasome (NLRP1, NLRP3 et la Pro-Caspase 1), tandis que TRIM21 reconnaît le facteur de transcription IRF3, impliqué dans la transcription de l'IFN- β (cf paragraphe 1.3.2.a.i). Le tableau suivant résume les récepteurs autophagiques autres que les récepteurs à pathogènes.

Nom	Substrat à dégrader	Nom	Substrat à dégrader
NCOA4	Ferritine	p62	Mitochondries ubiquitinées Peroxisomes Agréats protéiques
Stbd1	Glycogène	FAM134B	Réticulum endoplasmique
Nix	Mitochondries	Ubp3	Ribosomes (levure)
FUNDC1	Mitochondries	NBR1	Peroxisomes Agréats protéiques
BNIP	Mitochondries	TRIM20	NLRP1, NLRP3 et Pro-Caspase 1
AMBRA1	Mitochondries	TRIM21	IRF3
HDAC6	Mitochondries ubiquitinées		

Tableau 2 : Récepteurs autophagiques (hors récepteurs à pathogènes)

I.3 Autophagie et immunité

En dehors des fonctions présentées jusque-là concernant l'établissement et le maintien de l'homéostasie cellulaire, l'autophagie joue des rôles très importants pour l'immunité. C'est un mécanisme autonome de défense cellulaire contre des agents pathogènes envahissant les cellules. Par exemple, de nombreuses bactéries sont dégradées par un processus d'autophagie sélective, appelé xénophagie. L'autophagie participe également à la régulation de l'immunité innée, ainsi qu'à la mise en place de l'immunité adaptative.

I.3.1 Xénophagie

La xénophagie désigne la dégradation par autophagie d'éléments « étrangers » à la cellule (Levine, 2005). Comme nous l'avons déjà évoqué, l'autophagie peut être dirigée contre des virus ou bactéries intracellulaires. Nous avons également vu qu'une réponse autophagique peut être très rapidement induite. Ainsi la xénophagie constitue une ligne de défense importante contre les microorganismes pathogènes. Ici nous allons nous concentrer sur quelques exemples de xénophagie des bactéries ; ainsi que sur des mécanismes d'échappement utilisées par certaines d'entre elles. Les réponses autophagiques aux infections virales sont abordées dans le chapitre I.4.

I.3.1.a Streptocoque de groupe A

La première souche bactérienne pour laquelle l'élimination par xénophagie a été démontrée est un *Streptococcus pyogenes*, connu aussi sous le nom Streptocoque de groupe A (GAS), (Nakagawa et al., 2004). Cette bactérie de Gram négatif entre dans les cellules par endocytose. Au début de l'infection elle est contenue dans des endosomes. Une heure après l'infection, GAS s'échappe des endosomes en sécrétant la streptolysine O qui forme des pores dans la membrane endosomale. Il a été montré que l'exposition de GAS dans le cytoplasme induit la xénophagie dans des cellules HeLa qui semble être ATG5-dépendante puisque les fibroblastes embryonnaires murins (MEF) ou les cellules souches embryonnaires murines déficientes pour ce gène sont incapables de dégrader GAS (Nakagawa et al., 2004). Notre équipe a montré que GAS, qui utilise CD46 comme récepteur d'entrée, comme le fait le virus de la rougeole, est sensible à une autophagie induite par l'engagement de ce récepteur (Joubert et al., 2009). Aussi, l'autophagie induite par CD46 aurait pour but de retarder la réplication de la bactérie tandis que celle induite suite à l'exposition de la bactérie au cytosol est dégradative. De manière intéressante les protéines Rab7 (qui participe à la formation des endosomes), Rab23 (qui régule le transport vésiculaire) et Rab9A (impliquée dans la fusion des

autophagosomes et lysosomes) colocalisent avec les autophagosomes qui contiennent des GAS (Nozawa et al., 2012; Sakurai et al., 2010). Comme Rab9A et Rab23 ne sont pas impliquées dans l'autophagie canonique induite par la carence en nutriments, ces observations indiqueraient que ces protéines auraient un rôle spécifiquement dans la xénophagie (Huang and Brumell, 2014).

En revanche, une étude récente a montré que le sérotype MIT1 de GAS est capable de synthétiser une protéase qui peut dégrader les récepteurs autophagiques p62, NBR1 et NDP52, ce qui lui permet d'échapper à l'autophagie et de se répliquer dans le cytosol (Barnett et al., 2013).

1.3.1.b Mycobacterium tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis infecte les macrophages alvéolaires par phagocytose et peut y résider pendant des années en formant des granulomes (état de latence). *M. tuberculosis* survit dans les macrophages grâce à sa capacité d'inhiber la maturation des phagosomes et leur fusion avec des lysosomes (Armstrong and Hart, 1975). L'autophagie induite par privation de nutriments, le traitement à la Rapamycine, l'engagement du TLR4 par traitement au LPS (alors que *M. tuberculosis* n'en comporte pas dans sa paroi) ou encore le traitement à l'IFN- γ contrôle la répllication de la bactérie dans les macrophages (Gutierrez et al., 2004; Xu et al., 2007). En effet l'IFN- γ peut induire la xénophagie grâce à la GTPase murine Irgm1 (LRG-47) chez la souris (MacMicking et al., 2003). L'homologue humain IRGM semble contrôler également la répllication de *M. tuberculosis* dans les macrophages humains par xénophagie (Chauhan et al., 2015a; Singh et al., 2006).

1.3.1.c Salmonella typhimurium

Salmonella typhimurium est une bactérie qui peut se répliquer en dehors ou à l'intérieur des cellules. A l'intérieur des cellules, elle est enfermée dans une vésicule appelée SCV (Salmonella-containing vacuole) qui fournit à la bactérie une niche de répllication. Le système de sécrétion de la bactérie lui permet de former un pore dans la membrane de la SCV afin qu'elle puisse s'échapper dans le cytosol et avoir accès aux nutriments (Birmingham et al., 2006). Elle y est ensuite ubiquitinée et est reconnue dès lors par les récepteurs autophagiques p62, Optineurine et NDP52 (Thurston et al., 2009; Wild et al., 2011; Zheng et al., 2009). L'activation de la kinase TBK1 phosphoryle Optineurine ce qui augmente son affinité pour LC3 et par conséquent l'efficacité de recrutement à la machinerie autophagique sur la bactérie (Wild et al., 2011). De manière intéressante, quand la vacuole qui contient la bactérie est endommagée, c'est le récepteur à sucres Galectin 8 qui cible l'ensemble vacuole/bactérie et recrute NDP52, indépendamment de l'ubiquitine (Thurston et al., 2012; Verlhac et al., 2015, Annexe 1).

I.3.1.d Adherent-invasive Escherichia coli

Adherent-invasive *E. coli* est une souche pathogène qui se retrouve en quantité anormalement élevée dans les muqueuses de l'iléon des patients souffrant de la Maladie de Crohn (Darfeuille-Michaud et al., 1998). La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique du tube digestif pour laquelle aucun traitement curatif n'existe et qui nécessite des chirurgies invasives pour exciser les tissus enflammés. La pathogénèse de cette maladie n'est pas encore clairement élucidée, en revanche de nombreux travaux suggèrent une implication de la dérégulation de l'autophagie comme un des facteurs déclencheurs possibles (Brest et al., 2011; Cadwell et al., 2009; Netea-Maier et al., 2015). L'infection par AIEC peut être prise en charge par l'autophagie qui contrôle la réplication des bactéries intracellulaires (Lapaquette et al., 2012). A l'inverse, la dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans la régulation de l'autophagie tels que ATG16L1 ou IRGM conduisent à une prolifération anormale d'AIEC dans des cellules épithéliales (Brest et al., 2011; Lapaquette et al., 2010) et des macrophages (Lapaquette et al., 2012). De même, un défaut d'expression du facteur de transcription inductible par l'hypoxie HIF-1, provoque un défaut de maturation des autophagosomes et donne lieu à une prolifération anormale d'AIEC (Mimouna et al., 2014).

I.3.1.e Staphylococcus aureus

Comme nous l'avons vu à plusieurs reprises, l'autophagie peut protéger l'organisme par la dégradation de microorganismes intracellulaires. Il existe aussi un autre mécanisme de protection qui est d'induire la tolérance envers l'agent pathogène, protégeant ainsi des dommages causés par celui-ci ou par une réponse immunitaire trop violente. Des travaux très récents montrent que l'autophagie protège de l'infection par *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* est une bactérie à Gram positif qui induit de nombreuses pathologies responsables d'une forte mortalité et morbidité. Curieusement, chez des souris mutantes hypomorphes pour ATG16L1 ou déficientes pour LC3B, l'infection par *S. aureus* induit une plus forte mortalité que chez les souris WT, sans augmentation de la charge bactérienne (Maurer et al., 2015). Ces résultats indiquent que l'autophagie a un effet protecteur lors de l'infection par *S. aureus*. Le facteur de virulence α -toxine, sécrétée par *S. aureus* provoque la rupture des tissus et notamment les membranes épithéliales et endothéliales lors du contact avec son récepteur cellulaire. Une possible explication du rôle protecteur de l'autophagie lors de l'infection par *S. aureus* est l'observation que ce récepteur est plus fortement exprimé chez les souris hypomorphes pour ATG16L1. Ainsi l'autophagie serait responsable du recyclage de ce récepteur et de son maintien à des niveaux permettant une certaine résistance à la toxine et aux dommages tissulaires provoqués par l'infection.

I.3.1.f Autres bactéries

Certaines bactéries ont développé des stratégies d'échappement ou de détournement de l'autophagie. Nous donnerons quelques exemples dans ce paragraphe. Il existe des bactéries capables d'inhiber l'induction de l'autophagie. Pour exemple, *Legionella pneumophilla* secrète un effecteur capable de cliver la liaison entre LC3 et PE et qui cible de préférence les membranes fortement incurvées, inhibant ainsi la formation d'autophagosomes (Choy et al., 2012; Horenkamp et al., 2015). *Shigella flexneri* inhibe aussi l'induction de l'autophagie grâce à l'effecteur VirA qui inhibe Rab1 (une GTPase importante pour la formation des autophagosomes) (Dong et al., 2012). Un autre moyen d'échapper à la dégradation par autophagie est d'inhiber la maturation, comme le fait la bactérie de la cavité buccale *Porphyromonas gingivalis*. Les autophagosomes qui la renferment, ne colocalisent en effet jamais avec des marqueurs des endosomes tardifs ou des lysosomes (Dorn et al., 2001).

Certaines bactéries utilisent des stratégies leur permettant de résister au mécanisme d'autophagie. *Listeria monocytogenes* secrète un effecteur (ActA) lui permettant d'éviter son ubiquitination et le recrutement des récepteurs autophagiques liant l'ubiquitine comme p62 et NDP52 (Yoshikawa et al., 2009). Cette bactérie code aussi pour InlK qui intéragit avec la protéine MVP (Major Vault protein) dont le rôle n'est pas encore compris. Cette interaction permet à *L. monocytogenes* d'échapper à l'autophagie (Dortet et al., 2011). Dans le cas de *Shigella flexneri* par exemple, la bactérie synthétise un effecteur (IscB) qui joue le rôle de leurre pour la reconnaissance de IscA, important pour la motilité de la bactérie, par la machinerie autophagique (Ogawa et al., 2005).

Enfin, certaines bactéries comme par exemple *Coxiella burnetti* induisent l'autophagie afin de former des niches répliquatives au sein de vésicules portant des marqueurs autophagiques (Berón et al., 2002). De manière surprenante, quand l'autophagie est induite par une carence en nutriments ou par la Rapamycine, la bactérie est capable d'infecter plus de cellules, plus de vacuoles contenant la bactérie sont formées et sa multiplication est augmentée (Beare et al., 2011; Gutierrez et al., 2005).

I.3.2 Immunité innée

L'autophagie régule et est régulée par plusieurs cascades de signalisation impliquées dans l'activation de l'immunité innée, tels que la réponse interféron de type I, la voie NF- κ B, ainsi que l'inflammasome. Nous allons détailler ici les différentes interactions et liens entre l'autophagie et l'immunité innée.

I.3.2.a Autophagie et les réponses interféron

I.3.2.a.i Interféron de type I

- Généralités sur la réponse IFN de type I

Les interférons IFN- α et IFN- β constituent les interférons de type I (IFN-I). Ce sont des cytokines très puissantes qui composent une ligne de défense contre les infections surtout par les virus. L'IFN-I peut agir de manière autocrine ou paracrine.

Des motifs moléculaires caractéristiques aux agents pathogènes, appelés des PAMP (pathogen-associated molecular patterns), tels que des ARN double brin, des îlots CpG (segments composés de cytosines et guanines liés par des liaisons phosphodiester) non méthylés, mais aussi certains sucres, des peptidoglycane, lipoprotéines, la flagelline bactérienne, sont reconnus par des récepteurs de l'immunité innée appelés des PRR (pattern recognition receptor). Les PRR sont constitués des TLRs (toll-like récepteurs) membranaires (TLR1/2/4/5/6) ou endosomaux (TLR3/7/8/9), les RLRs (RIG-like receptors) et les NLRs (Nod-like receptors) qui sont cytosoliques. Le TLR3 (qui recrute la molécule adaptatrice TRIF : TIR domain-containing adapter inducer IFN- β), les TLR7/8/9 (qui recrutent MyD88 : Myeloid Differentiation factor 88), le TLR4 (qui recrute les deux) peuvent induire une réponse IFN-I. Les RLRs (incluant RIG-I : retinoic acid inducible gene I MDA-5 : melanoma differentiation associated factor 5,) interagissent avec IPS-1 (IFN promoter-stimulating factor 1) appelé aussi MAVS se trouvant sur les mitochondries qui induit également une cascade permettant la synthèse d'IFN-I (Swiecki and Colonna, 2011). La réponse IFN-I dépend de l'activation de plusieurs facteurs de transcription induisant la production d'IFN-I, appelés IRF (interferon regulatory transcription factors), dont IRF-3 et IRF-7 (*Figure 8*).

A l'état basal, seul IRF-3 est exprimé dans la cellule mais est inactif. Des signaux provenant par exemple des TLR induisent sa translocation dans le noyau et activent la transcription principalement d'IFN- β (par rapport à l'IFN- α) ainsi que d'autres gènes et notamment IRF-7. IFN- β peut ensuite stimuler le récepteur d'IFN-I (IFNAR : type I IFN receptor subunits α/β). Cette stimulation induit la dimérisation, la phosphorylation et l'activation de deux kinases associées à ce récepteur, Tyk2 et JAK1, qui phosphorylent ensuite respectivement STAT1 et STAT2. STAT1 et STAT2 sont ensuite transloquées dans le noyau où par association avec IRF-9, elles forment un complexe trimerique, appelé ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3). ISGF3 se lie à l'ISRE (INF stimulatory response element) et la transcription d'une multitude de gènes appelés ISG (interferon stimulated genes). Parmi les protéines antivirales et immuno-modulatrices, codées par ces gènes, nous retrouvons par exemple IRF-7 et la protéine kinase R (PKR). La PKR reconnaît l'ARN double brin et

phosphoryle le facteur eIF2 α , ce qui empêche la traduction des protéines. L'activation de TLR7/8 et des RLRs en présence d'IRF-7 activent la transcription d'IFN- α entre autres (Randall and Goodbourn, 2008). L'IFN-I permet aussi la surexpression des molécules du CMH-I et renforce aussi l'activité lytique des cellules NK (natural killer).

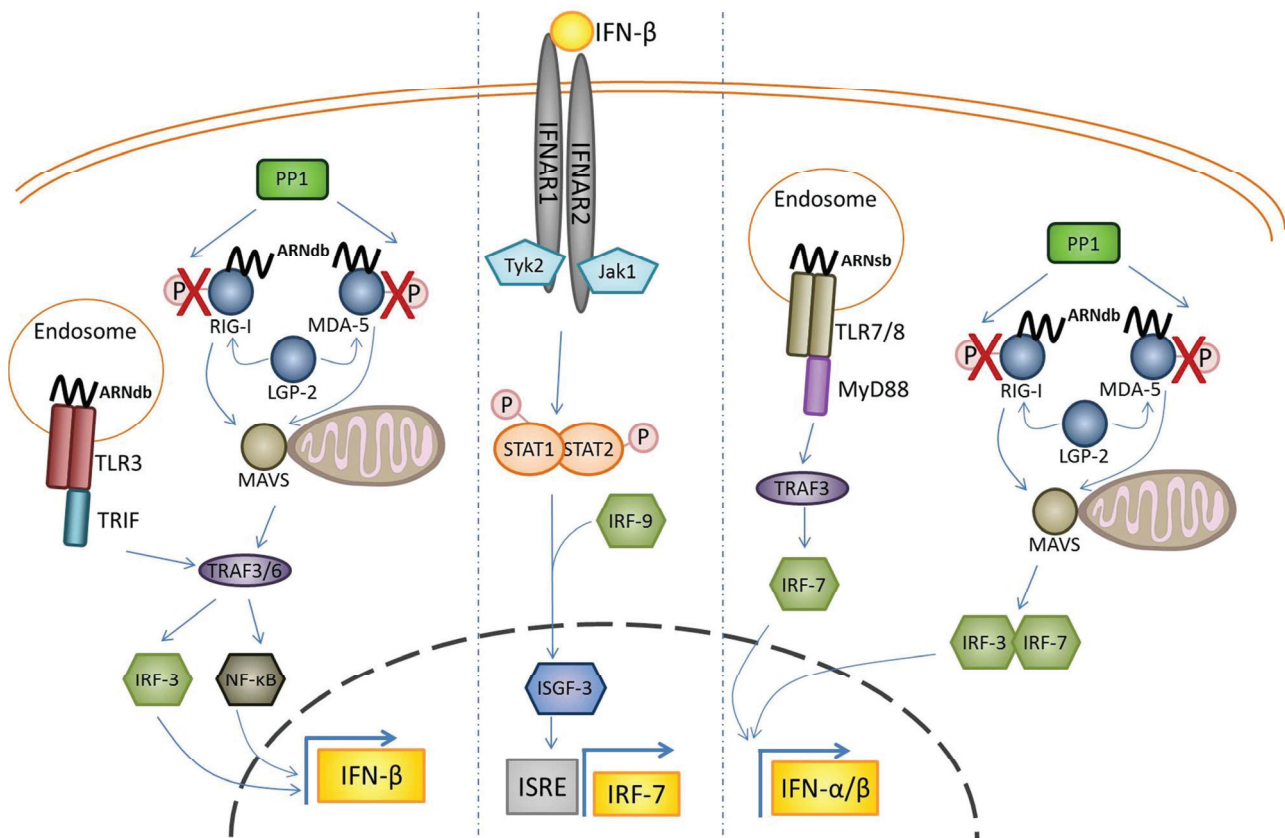


Figure 8 : Schéma simplifié de l'induction de la réponse IFN-I

Le schéma représente les différents stades de l'induction de la réponse IFN-I. L'étape précoce est illustrée à gauche avec l'activation de TLR3 et la transcription d'IFN- β . IFN- β sécrété agit en autocrine ou paracrine et active la transcription du facteur d'IRF-7 (milieu). La stimulation des TLR7/8 ou des RLRs en présence d'IRF-7 active par la suite la transcription d'IFN- α . ARNdb : ARN double brin. ARNsb : ARN simple brin.

- L'autophagie contribue à l'induction de la réponse IFN-I

Comme nous l'avons décrit précédemment, les autophagosomes peuvent fusionner avec des endosomes permettant ainsi la digestion d'agents pathogènes ou leurs composants. Par ce biais l'autophagie peut délivrer des PAMPs aux PRRs endosomaux (TLR3/7/8/9) qui peuvent alors transduire des signaux qui mènent à la sécrétion de l'IFN-I. L'induction d'IFN-I par l'autophagie a été montrée pour la première fois dans des pDC (cellules dendritiques plasmocytoides) murines infectées par le virus de la stomatite vésiculaire (Lee et al., 2007a). Les pDC humaines dépendent également de l'autophagie pour l'induction de la réponse IFN-I lors de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Zhou et al., 2012). Dans les deux cas les ARN simple brin sont reconnus par le TLR7 de manière autophagie-dépendante. Il a été également montré que l'induction d'IFN- α requiert

l'autophagie dans des pDC humaines suite à l'infection par le γ -herpesvirus Epstein-Barr (EBV) (Severa et al., 2013). Le virus respiratoire syncytial induit la sécrétion d'IFN- β par un mécanisme dépendant de l'autophagie dans les cellules dendritiques murines, suggérant que l'autophagie peut induire une réponse IFN-I dans plusieurs types cellulaires différents (Morris et al., 2011).

La voie LAP peut aussi induire une réponse IFN-I (Henault et al., 2012). En effet, l'engagement du TLR9 par un complexe immunitaire comportant des autoanticorps, dirigés contre l'ADN du soi dans des pDCs murines, induit LAP qui est indispensable à l'induction de l'IFN- α .

- L'autophagie peut diminuer la réponse IFN-I

Plusieurs éléments de la machinerie autophagique peuvent inhiber l'activation d'une réponse IFN-I. Un des moyens de le faire est la liaison du complexe ATG5/ATG12 avec RIG-I et IPS-1 ce qui inhibe la signalisation antivirale (Jounai et al., 2007). L'élimination des mitochondries par mitophagie est un autre moyen de limiter la réponse IFN-I puisque les mitochondries contiennent IPS-1 (Tal et al., 2009). En outre, la protéine ATG9 inhibe l'activation du transducteur de signaux permettant l'activation d'IFN-I, STING (stimulator of IFN genes) par l'ADN double brin (Saitoh et al., 2009).

- Régulation de l'autophagie par les IFN-I

Il a été décrit que l'IFN- α peut activer le flux autophagique par un mécanisme dépendant de STAT1 et de NF- κ B dans des cellules cancéreuses (Zhu et al., 2013a). De même IFN- β est également capable d'activer l'autophagie dans une lignée de cancer du sein en activant STAT1 et en inhibant mTOR (Ambjørn et al., 2013).

Cependant l'IFN-I peut aussi inhiber l'autophagie dans plusieurs lignées cancéreuses comme des travaux récents l'ont montré. En effet l'engagement du récepteur IFNAR conduit à la phosphorylation d'ULK1 en position Ser₇₅₇, qui est le même site de phosphorylation effectuée par mTORC1 (Saleiro et al., 2015). Ainsi l'activation de l'autophagie par ULK1 est inhibée (cf paragraphe I.2.1.a). En revanche, la phosphorylation d'ULK1 active potentiellement la voie de p38 MAP kinase connue pour activer IFN-I (Li et al., 2004). Une autre étude récente a montré le même rôle inhibiteur d'IFN-I sur l'autophagie. En effet ISG15, un des effecteurs de la réponse IFN-I et induit par IFN-I, peut se fixer sur Beclin-1 et empêcher ainsi l'activation de l'autophagie dans des lignées épithéliales et hépatiques (Xu et al., 2015).

Ces exemples démontrent les relations complexes qui existent entre l'autophagie et la régulation de la réponse IFN-I et soulignent le fait qu'elles dépendent fortement du type cellulaire ainsi que de l'élément inducteur d'IFN-I.

I.3.2.a.ii Interféron de type II

L'IFN- γ ou l'interféron de type II (IFN-II) est sécrété principalement par les cellules NK et active ces dernières, ainsi que les macrophages, et participe activement à l'établissement d'une réponse immunitaire adaptative. L'engagement du récepteur d'IFN- γ (IFNGR) active une voie de signalisation impliquant la phosphorylation des kinases JAK1 et JAK2. Elles phosphorylent alors le facteur de transcription STAT1 qui est par conséquent transloqué dans le noyau et se fixe au niveau des gènes inductibles par IFN- γ .

L'IFN- γ est capable d'induire l'autophagie (Harris, 2011). Cette cytokine promeut l'élimination de *Mycobacterium tuberculosis* et de *Chlamydia trachomatis* par autophagie (Al-Zeer et al., 2009; Gutierrez et al., 2004). Chez la souris l'induction de l'autophagie par l'IFN- γ dans des macrophages murins est assurée par la petite GTPase inductible par l'IFN- γ , appelée Irgm1 (Singh et al., 2006). L'IFN- γ peut induire l'autophagie dans des macrophages murins par un mécanisme indépendant d'Irgm1 et la phosphorylation de STAT1 mais plutôt *via* un mécanisme dépendant de p38 MAP kinase (Matsuzawa et al., 2012). L'IFN- γ a été également impliqué dans l'induction de l'autophagie dans des hépatocytes humains cancéreux par un mécanisme impliquant IRF-1 (interferon regulatory factor-1), ce qui curieusement induit la mort cellulaire (Li et al., 2012a).

I.3.2.b Autophagie et la signalisation NF- κ B

En plus de la sécrétion d'IFN-I, la reconnaissance de PAMPs par les PRRs mène à la mise en place de la signalisation NF- κ B. Le facteur de transcription NF- κ B occupe une place très importante dans l'immunité innée puisqu'il soutient l'expression par exemple de gènes pro-inflammatoires tels que TNF- α , pro-IL-1, pro-IL-18, IL-6 et IL-8.

La famille de facteurs de transcription NF- κ B est constituée de cinq membres, p50 (NFKB1), p52 (NFKB2), p65 (RelA), RelB et c-Rel, qui partagent en N-terminal le domaine d'homologie Rel (RHD). Ce domaine est responsable de la liaison à l'ADN. NF- κ B proprement dit est constitué d'homo ou hétéro dimères, en combinaisons différentes entre ces 5 protéines. Dix dimères ont été identifiés : (p50-p50, p50-p65, p65-p65, p65-c-Rel, c-Rel-c-Rel, p50-c-Rel, p65-RelB, p50-RelB, p52-RelB et p52-p65). Les protéines p50 et p52 sont issues du clivage en N-terminal de leur précurseurs respectifs p105 et p100. NF- κ B se lie aux sites κ B se trouvant sur les promoteurs des gènes et active ou réprime leur transcription en recrutant des co-activateurs ou co-inhibiteurs. Seuls les membres p65, RelB et c-Rel contiennent un domaine d'activation de la transcription qui régule positivement l'expression de gènes. Dans son état inactif NF- κ B est lié à l'une de trois protéines I κ B (I κ B α (NFKBIA), I κ B β (NFKBIB) ou I κ B ϵ (NFKBIE)) ou bien au précurseur des protéines p50 et p52 qui empêchent sa

translocation dans le noyau. L'activation de NF- κ B est régulée par le complexe IKK, constitué des sous-unités IKK α , IKK β et IKK γ , appelée aussi NEMO. Lors de l'activation, NEMO se lie à I κ B et IKK β phosphoryle ce dernier. La phosphorylation d'I κ B entraîne son ubiquitination et sa dégradation consécutive par le protéasome. NF- κ B est alors transloqué dans le noyau et peut activer la transcription de gènes (Figure 9). Cette voie appelée la voie canonique est induite par l'activation de PRRs et des récepteurs cytokiniques (Hinz and Scheidereit, 2014).

Il existe également une voie non canonique d'activation de NF- κ B qui requiert l'activation d'IKK α par NIK qui phosphoryle ensuite p100, ce qui déclenche sa dégradation par le protéasome. La dégradation de p100 active les dimères p52-RelB et promeut leur translocation dans le noyau. La voie non canonique est activée par divers ligands à des récepteurs de la superfamille de récepteurs de TNF, tels que le récepteur de la lymphotoxine β (LT β R), RANK et CD40 (Hinz and Scheidereit, 2014).

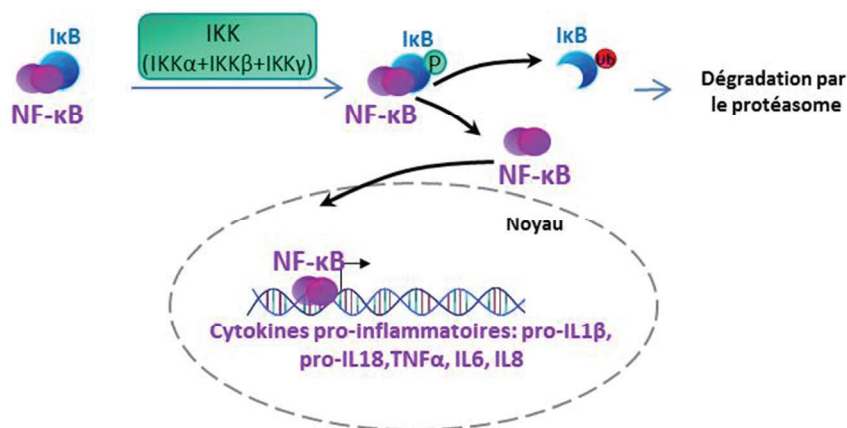


Figure 9 : Schématisation de la voie classique d'activation de la voie NF- κ B

NF- κ B est inhibé par la présence d'I κ B. Le complexe IKK se lie et phosphoryle I κ B, ce qui conduit à son ubiquitination et dégradation par le protéasome. NF- κ B peut alors être transloqué dans le noyau afin d'activer la transcription. Adapté de (Richetta, 2013).

I.3.2.b.i L'autophagie régule la voie NF- κ B

L'autophagie peut induire la voie NF- κ B. Dans des fibroblastes murins, la privation de sérum ou le traitement à la Rapamycine activent IKK conduisant à la phosphorylation d'I κ B. L'absence d'ATG5 ou d'ATG7 compromet cette activation (Criollo et al., 2012). Une autre étude a montré que l'inhibition de l'autophagie par l'inhibiteur 3-méthyladenine (3-MA) réduit l'activation de la voie NF- κ B induite par LPS dans les reins murins (Wu et al., 2015). De plus, il a été démontré que dans les macrophages murins, p62 peut opérer la séquestration de l'inhibiteur de la voie NF- κ B A20 dans les autophagosomes, promouvant ainsi l'activation la transcription de gènes codant pour les chimiokines CXCL1 et CXCL2, capables d'attirer des neutrophiles afin de combattre l'infection par *Candida*

albicans (Kanayama et al., 2015). Dans un contexte infectieux par exemple, la stimulation de Nod2 par le PAMP bactérien muramyl dipeptide induit l'autophagie qui à son tour active la voie NF- κ B. Ces évènements permettent de contrôler l'infection par *Salmonella typhimurium* (Homer et al., 2010). L'autophagie induite par la protéine X du virus de l'hépatite B induit également la voie NF- κ B (Luo et al., 2015).

L'autophagie peut également inhiber la voie NF- κ B. En effet la dégradation par autophagie de composants de la voie NF- κ B permet son l'inhibition (Faure and Lafont, 2013). Le récepteur à pathogènes NDP52 participe à la dégradation des molécules adaptatrices des TLRs, TRAF6 et TRIF, réprimant ainsi la signalisation NF- κ B (Ellinghaus et al., 2013; Inomata et al., 2012). Enfin, l'association de TRAF6 et p62 conduit à l'activation de la voie NF- κ B. En outre, p62 est constamment dégradée par autophagie, ce qui implique que l'autophagie tempère cette voie de signalisation (Lee et al., 2011).

I.3.2.b.ii La voie NF- κ B régule l'autophagie

La voie NF- κ B peut également réguler l'autophagie soit positivement, soit négativement. L'exemple le plus direct de régulation positive est l'induction de la transcription de gènes centraux de la machinerie autophagique. Par exemple p65/RelA est capable d'augmenter la transcription de Beclin-1 et par conséquent de moduler positivement l'autophagie (Copetti et al., 2009). L'activation de l'autophagie par la voie NF- κ B est d'ailleurs cruciale lors du rétablissement de l'homéostasie cellulaire suite à un choc thermique (Nivon et al., 2009).

Inversement, la voie NF- κ B peut inhiber l'induction de l'autophagie, comme cela a été décrit dans le contexte de cellules cancéreuses traitées par le TNF- α (Djavaheri-Mergny et al., 2006).

Enfin la régulation de l'autophagie et de la voie NF- κ B peuvent se faire en même temps. En effet, deux protéines qui lient la kinase TAK1 (TGF β -activated kinase 1), appelées TAB2 et TAB3 sont capables de lier Beclin-1 ce qui inhibe l'autophagie. TAB2 et TAB3 sont en outre des protéines capables d'activer IKK et par conséquent la voie NF- κ B *via* leur interaction avec TAK1. Lors de l'induction de l'autophagie TAB2 et TAB3 se dissocient de Beclin-1 ce qui contribue à une amplification de la réponse autophagique d'une part et permet le recrutement de TAK1 par TAB2/3 et l'activation de la voie NF- κ B d'autre part (Criollo et al., 2011).

Ainsi, l'autophagie peut soit induire soit inhiber la voie NF- κ B. En effet la dégradation autophagique des inhibiteurs de NF- κ B a pour effet d'induire cette voie. Au contraire la dégradation de protéines impliquée directement dans la signalisation NF- κ B, l'inhibe. Aussi, comme nous venons

de le voir, la voie NF- κ B peut induire ou inhiber l'autophagie. La relation entre ces deux processus dépend fortement du contexte.

1.3.2.c Autophagie et inflammasome

L'inflammasome est constitué de plusieurs complexes multiprotéiques qui sont capables après activation de cliver les précurseurs pro-IL-1 β et pro-IL-18 pour générer les cytokines inflammatoires IL-1 β et IL-18. L'inflammasome est constitué d'un récepteur NLR, une molécule adaptatrice ASC et de la Pro-Caspase 1. Le clivage de ces formes précurseur des cytokines est effectué par la caspase 1 qui est la forme active de la Pro-Caspase 1. Parmi les récepteurs de l'inflammasome on trouve : NLRP1, NLRP3, NLRP4, NLRC4 (IPAF), NLRP7, NLRP10, NLRP12 et AIM2 (Figure 10).

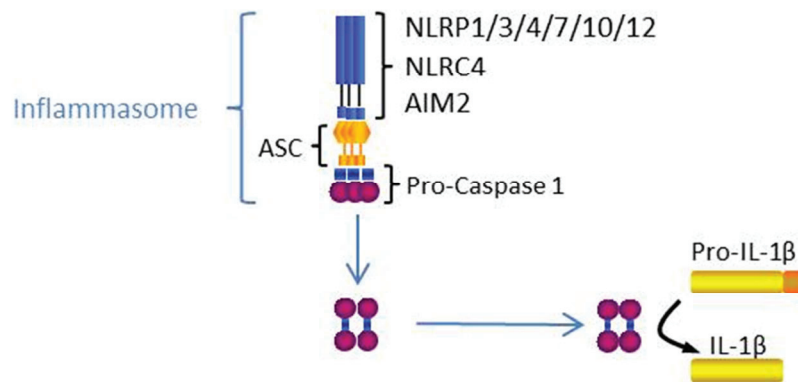


Figure 10 : Schématisation de la structure de l'inflammasome

Les récepteurs de l'inflammasome recrutent ASC capable de convertir la Pro-Caspase 1 sous sa forme caspase 1 qui clivera la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 en IL-1 β et IL-18 actifs. Extrait de (Richetta, 2013).

Les récepteurs peuvent détecter la présence de signaux de danger ou bien d'agents pathogènes. Au-delà de l'activation des cytokines pro-inflammatoires, l'inflammasome peut également induire la pyroptose, qui est une forme de mort cellulaire, associée à l'inflammation (Lamkanfi and Dixit, 2014).

Plusieurs études ont montré que l'autophagie régule négativement l'inflammasome. En effet une étude a montré que l'autophagie induite par un traitement à la Rapamycine ou bien lors de l'engagement de différents TLR, induit une dégradation de la pro-IL-1 β (Harris et al., 2011). De plus, l'activation de l'inflammasome *via* NLRP3 ou AIM2 induit l'autophagie ainsi que l'ubiquitination de la protéine adaptatrice ASC qui est ciblée vers la dégradation autophagique par p62, ce qui régule négativement l'inflammasome (Shi et al., 2012). L'autophagie est capable aussi de dégrader

sélectivement des composants de l'inflammasome tels que NLRP1, NLRP3 et la Pro-Caspase 1 (Kimura et al., 2015).

L'autophagie peut également réguler négativement l'activité de l'inflammasome en dégradant les signaux d'activation en amont de ses récepteurs. Par exemple les ROS sont de puissants activateurs de l'inflammasome, alors que la mitophagie permet de diminuer leur génération et donc de diminuer l'activation de l'inflammasome (Zhou et al., 2011).

Enfin, l'autophagie contrebalance son action inhibitrice sur l'inflammasome en participant à la sécrétion extracellulaire d'IL-1 β *via* une voie de sécrétion non conventionnelle (Dupont et al., 2011; Ponpuak et al., 2015).

Nous avons déjà évoqué que NLRP3 et AIM2 peuvent induire l'autophagie afin d'inhiber l'adaptateur ASC (Shi et al., 2012). A l'inverse d'autres NLRP pourraient inhiber l'autophagie. Par exemple NLRP4 et NLRC4 inhibent l'autophagie en interagissant avec Beclin-1 (Jounai et al., 2011). De plus NLRP4 semble inhiber la maturation des autophagosomes.

1.3.3 Immunité adaptative

L'autophagie contribue également à l'équilibre d'une réponse immunitaire adaptative et mémoire. Elle régule en effet l'homéostasie lymphocytaire ou encore la présentation antigénique. Nous allons très brièvement exposer certains éléments de cette contribution.

1.3.3.a Autophagie et hématopoïèse

L'autophagie influence le développement, la sélection, la maturation, l'homéostasie, ainsi que la polarisation des lymphocytes T. en effet l'autophagie a un effet cytoprotecteur sur les cellules souches hématopoïétiques (Warr et al., 2013). De plus des défauts dans l'autophagie modélisés par des délétions conditionnelles d'ATG7 dans les cellules souches hématopoïétiques perturbent l'équilibre entre les cellules progénitrices myéloïdes et lymphoïdes (Mortensen et al., 2011). L'autophagie participe également à la sélection positive dans le thymus (Nedjic et al., 2008). Elle a aussi un rôle dans la maturation des lymphocytes T, grâce à la mitophagie (Pua et al., 2009). L'autophagie influence aussi leur polarisation. Par exemple une réponse de type Th17 est induite préférentiellement lors de la maintenance prolongée des synapses immunologiques entre des lymphocytes T et des cellules dendritiques déficientes pour l'autophagie (Wildenberg et al., 2012).

L'autophagie est également importante pour la survie des lymphocytes B mémoires (Chen et al., 2014). Enfin, l'absence d'autophagie dans les lymphocytes B plasmocytaires induit une sécrétion d'anticorps anormale (Pengo et al., 2013).

I.3.3.b Effets sur la présentation d'antigènes

La présentation d'antigènes est l'un des piliers de l'immunité adaptative. L'induction de la réponse adaptative nécessite la présentation de peptides dérivés de microorganismes infectieux sur les molécules des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou II. Le CMH de classe I (CMH-I) est exprimé sur toutes les cellules et présente des peptides aux cellules T CD8+ cytotoxiques. Le CMH de classe II (CMH-II) est exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigène tels que les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages, les lymphocytes B mais aussi sur des cellules épithéliales du thymus. Le CMH-II présente des peptides aux lymphocytes T CD4+ auxiliaires, dont l'activation après la reconnaissance du complexe CMH-II/peptide active des réponses de l'immunité adaptative.

Le CMH-I présente des peptides issus de la dégradation de protéines contenus dans le cytoplasme (protéines du soi ou bien de microorganismes pathogènes). Ces protéines dites « endogènes » sont dégradées par le protéasome, puis sont transportées dans le réticulum endoplasmique. Elles sont alors chargées sur le CMH-I puis exportées à la membrane plasmique en association avec ce dernier.

A l'inverse, le CMH-II présente généralement des peptides dérivés de protéines « exogènes », c'est-à-dire qui sont internalisés par la cellule par phagocytose ou endocytose. Les phagosomes et les endosomes fusionnent avec des lysosomes, ce qui permet la dégradation des protéines en peptides. Ces vésicules contenant les fragments de protéines exogènes fusionnent avec des vésicules riches en molécules CMH-II ce qui donne lieu à la formation de complexes CMH-II/peptide. Ces complexes sont ensuite exportés à la membrane plasmique soit par fusion directe entre la vésicule qui les contient, soit par le biais des exosomes.

Il existe également des voies de présentation croisée de chargement de peptides exogènes sur le CMH-I ou bien des peptides endogènes sur le CMH-II (*Figure 11*).

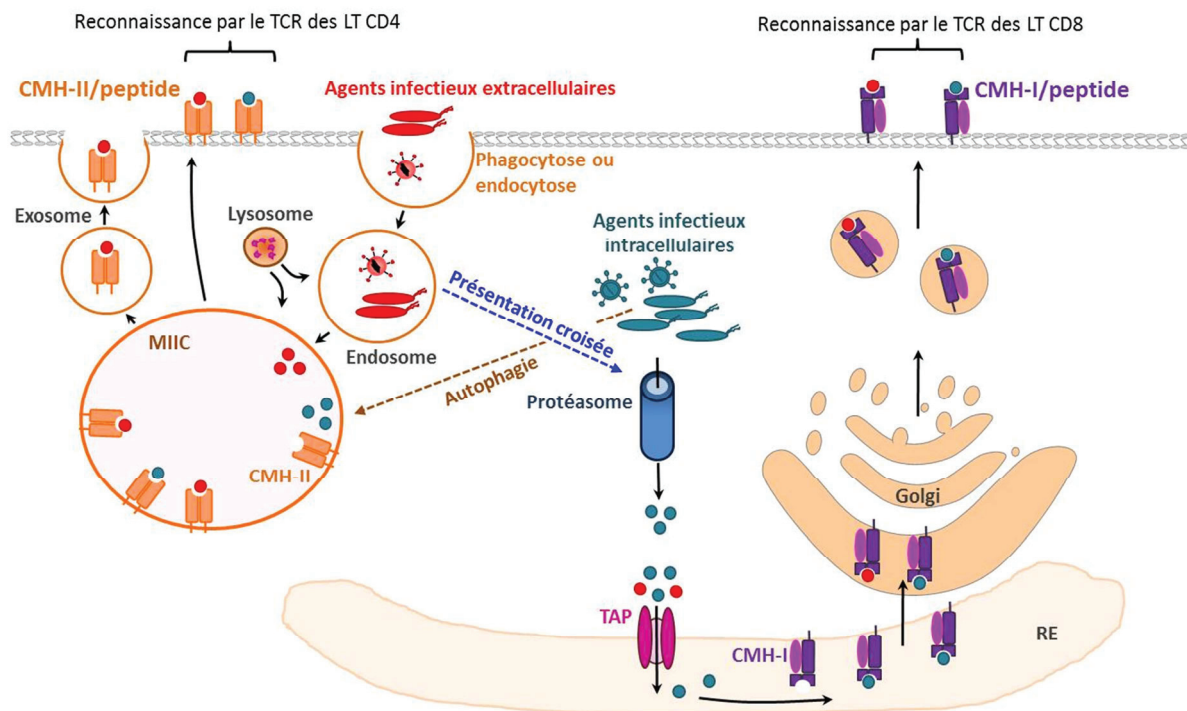


Figure 11 : Mécanismes de présentation antigénique

Extrait de (Richetta, 2013).

L'autophagie contribue à la présentation constitutive de peptides du « soi » dans le contexte CMH II par l'épithélium thymique (Aichinger et al., 2013; Nedjic et al., 2008) et par les cellules présentatrices de l'antigène (Dengjel et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2003; Schmid et al., 2007; Zhou et al., 2005). Dans ce dernier cas, les antigènes concernés sont essentiellement cytosoliques et nucléaires. L'autophagie contribue aussi à la présentation de peptides dérivés de microorganismes intracellulaires (Kuballa et al., 2012; Münz, 2009).

Ainsi, l'antigène EBNA1 du virus Epstein-Barr peut être présenté dans le contexte CMH II via un apprêtement qui implique l'autophagie canonique (Paludan et al., 2005). Chez la souris, des cellules dendritiques dépourvues d'ATG5 perdent leur capacité à activer les cellules T CD4 *in vivo* en réponse au virus HSV-1 (Lee et al., 2010a). En l'occurrence, ATG5 joue un rôle dans des phénomènes non canoniques qui contribuent à la maturation des phagosomes. La promotion de la présentation antigénique dans le contexte CMH II peut également être liée à la réponse cellulaire au stress. Ceci a été observé dans le cas du vaccin contre la fièvre jaune. Après vaccination, la réponse T CD4 est réduite si les souris sont déficientes pour le facteur GCN2 qui est un détecteur de carence en aminoacides et un inducteur d'adaptation au stress. GCN2 active l'autophagie dans les cellules dendritiques en réponse à la sur-consommation des aminoacides imposée par la réplication virale et promeut la présentation de peptides viraux dans le contexte CMH II (Ravindran et al., 2014).

La présentation antigénique dans le contexte CMH I peut aussi bénéficier de processus autophagiques. Par exemple, dans le cas de présentation d'antigènes exogènes acquis par endocytose/phagocytose (présentation CMH I croisée), il a été montré que la présentation d'antigènes de l'influenza-A par les cellules dendritiques est significativement améliorée si les cellules infectées qui sont prises en charge sont en état de forte autophagie (Uhl et al., 2009). La réponse T CD8 et la présentation croisée par les cellules dendritiques étant aussi réduites chez les souris déficientes pour le facteur GCN2, il est vraisemblable que l'autophagie associée à la réponse au stress contribue également à la présentation de peptides du virus de la fièvre jaune dans le contexte CMH I (Ravindran et al., 2014).

I.4 Interactions virus – autophagie

Contrairement aux bactéries où il existe beaucoup d'exemples d'élimination par xénophagie, très peu d'informations existent sur l'élimination des virus par ce mécanisme. Les virus infectent les cellules en délivrant leur matériel génomique ou leurs nucléocapsides directement dans le cytoplasme après fusion avec la membrane plasmique ou bien après endocytose. Beaucoup de virus induisent l'autophagie au moment de la réplication de leur génome. Il existe plusieurs mécanismes d'induction de l'autophagie par les virus, comme par exemple la reconnaissance du génome par les PRR, le stress du réticulum endoplasmique, ou la réponse UPR, ou bien l'interaction directe du virus avec des protéines autophagiques.

I.4.1 Induction de l'autophagie lors des infections virales

I.4.1.a Induction suite à la reconnaissance par les TLRs

Nous avons déjà décrit le rôle des molécules adaptatrices TRIF et MyD88 dans la signalisation qui induit l'IFN-I. Ces protéines sont capables d'interagir avec Beclin-1 lors de l'activation des TLRs correspondants. Ces interactions sont en compétition avec Bcl-2 pour l'interaction avec Beclin-1, qui inhibe l'induction de l'autophagie (Shi and Kehrl, 2008). Les travaux de Delgado et collègues ont montré que l'autophagie peut être induite par l'ensemble de TLR3, TLR7 et TLR8. En particulier l'infection avec un pseudo virus VIH (qui exprime des glycoprotéines d'un autre virus afin de modifier le tropisme ; ici glycoprotéine G du VSV) induit l'autophagie *via* TLR7 et TLR8 (Delgado et al., 2008).

I.4.1.b Induction *via* la PKR et la ribonucléase L

En dehors des TLRs, d'autres protéines cytosoliques sont capables de détecter la présence de virus et d'induire l'autophagie. En effet la PKR qui est induite par l'IFN-I détecte les ARN double brin. Cette détection conduit ensuite à la phosphorylation du facteur de l'initiation de la traduction eIF2 α , le rendant inactif ce qui inhibe la traduction de protéines dans la cellule. L'activation de la PKR induit l'autophagie comme cela a été montré grâce à l'utilisation d'un virus HSV-1 déficient pour le facteur de virulence ICP34.5 (Tallóczy et al., 2006). Le réovirus aviaire (ARV) induit l'autophagie *via* plusieurs mécanismes et notamment grâce à l'activation de la PKR. Curieusement une seule protéine de l'ARV permet d'induire l'autophagie à travers plusieurs mécanismes. ARV soutient la formation d'autolysosomes, en revanche le flux est incomplet (Chi et al., 2013).

La ribonucléase L (RNase L) est une endonuclease antivirale capable de cliver des ARN simple brin viraux ou cellulaires et de produire des ARN double brin courts capables d'amplifier de nombreuses réponses de l'hôte à des infections virales. L'activation de RNase L induit l'autophagie. Par ailleurs, cette induction requiert l'activation de la PKR et JNK1/2 (Siddiqui and Malathi, 2012). En effet l'activation de la RNase L par l'infection avec le virus Sendai ou le virus de encéphalomyocardite (ECMV) dans des cellules MEF induit la phosphorylation de Bcl-2 ce qui le dissocie de Beclin-1 et promeut l'autophagie. Cependant, récemment la même équipe a montré qu'un des produits de l'activation de la RNase L est capable de cliver Beclin-1 ce qui promeut l'apoptose et non plus l'autophagie (Siddiqui et al., 2015).

I.4.1.c Le récepteur CD46 et l'induction de l'autophagie

Nous avons déjà évoqué brièvement que l'engagement de CD46, utilisé comme récepteur d'entrée par plusieurs types de pathogènes intracellulaires induit l'autophagie grâce à l'interaction de la partie cytoplasmique de CD46 avec la protéine d'échafaudage GOPC capable de lier le complexe d'initiation de l'autophagie (Joubert et al., 2009; Meiffren et al., 2010). Nous allons décrire ce mécanisme plus en détail dans le paragraphe II.3.1.a.ii.

I.4.1.d Induction par le stress du RE

La réponse UPR fait intervenir trois senseurs, localisés dans le RE : IRE-1, PERK et ATF6. En condition de stress du RE, ATF6 est clivé et sa forme active est transloquée dans le noyau où elle régule la transcription de gènes ERSE (ER-stress response elements) tels que CHOP et XBP1. Le stress du RE phosphoryle également PERK qui phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α ,

pour inhiber la synthèse protéique. Enfin, l'activation de la voie IRE-1 conduit à l'épissage de l'ARNm de XBP1. XBP1 et CHOP sont des facteurs de transcription qui activent la transcription de gènes ayant un site UPR (UPR elements). Lors d'une infection virale, la synthèse protéique est fortement augmentée et peut induire un stress du RE qui à son tour déclenche une réponse UPR qui elle-même active l'autophagie.

Cela est vrai par exemple pour l'infection par le HCV. HCV induit l'autophagie *via* un stress du RE et en induisant la réponse UPR. En outre la réponse UPR est nécessaire à la réplication de ce virus (Ke and Chen, 2011; Sir et al., 2008). Cette induction passe par l'inhibition de la cible du complexe mTORC1 par HCV, le complexe AKT-TSC (Huang et al., 2013). De plus, lors de l'infection par HCV, l'activation de la réponse UPR par le biais d'ATF6 induit l'autophagie grâce à l'augmentation de l'expression de LC3B et ATG12 (Wang et al., 2014). L'infection par le virus de l'encéphalite japonaise (JEV) induit l'autophagie probablement en partie par la réponse UPR. En effet ce virus induit l'UPR (Bhattacharyya et al., 2014) et l'autophagie est induite en parallèle de la synthèse des protéines (Sharma et al., 2014), suggérant un lien entre les deux mécanismes. Un lien entre la réplication de Coronavirus, la réponse UPR et l'induction de l'autophagie a également été proposé (Fung and Liu, 2014). Le virus du Chikungunya est également capable d'induire l'autophagie en induisant la réponse UPR (Joubert et al., 2012).

1.4.1.e Rôle de protéines virales dans l'induction de l'autophagie

Nous avons déjà décrit la reconnaissance des bactéries par les récepteurs autophagiques. Ces protéines peuvent aussi reconnaître des virus. En effet la protéine de capsid VP1 du virus de la maladie Foot-and-Mouth (FMDV) semble aussi être reconnu par p62 (Berryman et al., 2012). Un cas intéressant est l'induction de l'autophagie par le virus VIH-1. Lors du cycle viral, les cellules infectées expriment les protéines d'enveloppe virale gp120 et gp41. L'interaction de ces protéines avec les récepteurs des lymphocytes T CD4+ non infectés induit l'autophagie (Denizot et al., 2008).

Les protéines non structurales des virus peuvent également induire l'autophagie. Par exemple la protéine 2BC du poliovirus induit la lipidation de LC3-I en LC3-II (Taylor and Kirkegaard, 2007). La co-expression de 2BC et 3A du poliovirus induit la formation de vésicules à double membrane (Jackson et al., 2005). La protéine X du virus de l'hépatite B induit l'autophagie en augmentant la transcription de Beclin-1 (Tang et al., 2009) mais également en interagissant avec VPS34 (Sir et al., 2010). En outre, l'induction de l'autophagie par la protéine X induit la voie NF- κ B (Luo et al., 2015).

La protéine non structurale C du virus de la rougeole induit l'autophagie, en interagissant avec la protéine IRGM (Immunity-related GTPase family M protein) comme cela a été montré par des

travaux de notre équipe (Grégoire et al., 2011). Un crible en double hybride chez la levure montre qu'IRGM interagit avec quatre protéines autophagiques, Bif-1, ATG5, ATG10 et LC3C, ce qui pourrait expliquer comment IRGM régule l'autophagie lors de l'infection virale. De manière intéressante IRGM est aussi la cible de virus appartenant à cinq familles virales différentes : *Paramyxoviridae*, *Flaviviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Retroviridae* et *Togaviridae*. En effet l'équipe a montré que l'interaction d'IRGM avec Nef du VIH-1 ou encore NS3 du HCV induit l'autophagie (Grégoire et al., 2011). Ainsi plusieurs virus seraient capables d'induire l'autophagie *via* leurs interactions avec IRGM.

1.4.2 Rôle antiviral de l'autophagie

1.4.2.a Virophagie : dégradation de composants viraux

Nous avons vu que de nombreux types bactériens sont dégradés par autophagie dans un processus qui s'appelle xénophagie (cf sous chapitre 1.3.1). Cependant l'autophagie semble ne pas être adaptée à l'élimination de virus complets. En effet il existe très peu d'exemples de ce cas de figure, et ce dans un contexte particulier. Par exemple le HSV-1 mutant pour le facteur de virulence ICP34.5 se retrouve emprisonné dans des autophagosomes de macrophages murins (Tallóczy et al., 2006). Le virus sauvage en revanche inhibe l'autophagie comme nous allons voir dans le paragraphe 1.4.3.a, ce qui indique qu'il n'est pas dégradé par autophagie.

Dans un modèle d'exposition au génome d'HCV d'hépatocytes murins, la virophagie est induite par la synthèse d'IFN- β . Dans ce cas, la protéine non-structurale NS3 de l'HCV est dégradée. Cependant, l'IFN- α , synthétisé plus tardivement, induit l'autophagie mais inhibe la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. Seule la fusion entre les autophagosomes et les endosomes est assurée, ce qui délivre des éléments viraux aux TLRs et amplifie la réponse IFN-I (Desai et al., 2011).

Lors de l'infection par le virus du Chikungunya (ChikV) et le virus Sindbis (SINV) les capsides virales sont reconnues par le récepteur autophagique p62 et dégradées (Judith et al., 2013; Orvedahl et al., 2010). Cette dégradation a comme effet de protéger les cellules infectées d'une accumulation toxique de capsides.

Dans le cas de l'infection par le VIH-1, le virus induit l'autophagie rapidement après l'infection de lymphocytes T CD4+ suite aux interactions entre les glycoprotéines virales d'enveloppe et les récepteurs cellulaires. Cette autophagie dégrade sélectivement la protéine transactivatrice Tat suite à sa reconnaissance par p62 (Sagnier et al., 2015). La reconnaissance de Tat par p62 est indépendante de l'ubiquitine. Cependant cet effet antiviral est rapidement contourné par le virus. Une autre étude a montré la colocalisation entre la protéine Gag du virus VIH-1 et GFP-LC3 dans des macrophages humains. Les auteurs ont également observé des particules virales dans des structures

à double membrane qui pourraient être des autophagosomes en microscopie électronique à transmission (Kyei et al., 2009). Cependant dans cette étude les auteurs montrent que le virus inhibe la maturation des autophagosomes par l'interaction de la protéine non-structurale Nef avec Beclin-1. En outre le virus est également connu pour inhiber l'autophagie dans les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD4+ infectés, ce qui indique que la dégradation du VIH ou ses composants reste un phénomène marginal (Blanchet et al., 2010; Borel et al., 2015).

Un exemple récent de rôle antiviral de l'autophagie est l'infection par le virus de l'encéphalite japonaise. En effet dans des cellules MEF déficientes pour ATG7, le virus se réplique de manière sensiblement plus efficace, bien que les cellules soient plus susceptibles à la mort induite par le virus (Sharma et al., 2014). Cependant le rôle de l'autophagie n'est pas clair dans ce cas précis. En effet bien que le complexe de réplication du virus colocalise avec LC3 endogène aucune colocalisation n'a été observée avec la construction GFP-LC3. En outre les structures LC3-positives qui colocalisent avec le complexe de réplication ne présentent pas de marqueurs endosomaux ou lysosomaux, suggérant que dans ce cas LC3 aurait une fonction indépendante de l'autophagie. Ainsi l'effet inhibiteur de l'autophagie sur la réplication de ce virus n'est pas lié à la virophagie du complexe de réplication et reste à être déterminé.

Ces exemples montrent que l'effet antiviral de l'autophagie serait opéré plutôt par la dégradation de composants viraux comme c'est le cas du virus du Chikungunya et du virus Sindbis (Judith et al., 2013; Orvedahl et al., 2010). Cependant, dans le cas de ces virus la dégradation des capsides virales respectives pourrait en fin de compte être bénéfique pour les virus *in vitro* puisqu'elle prévient la mort cellulaire due à leur forte accumulation.

1.4.2.b Induction des réponses immunitaires

Comme nous l'avons déjà évoqué l'autophagie et l'immunité sont intimement liées. Dans le tableau ci-dessous sont résumées certaines des réponses immunitaires provoquées par l'induction de l'autophagie suite aux infections virales.

Virus	Réponse immunitaire induite	Référence
Virus du Chikungunya	Dégradation de la capside	(Judith et al., 2013)
Virus de Sindbis	Dégradation de la capside	(Orvedahl et al., 2010)
Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV)	Reconnaissance par TLR-7 Production d'IFN-I dans les pDC murines	(Lee et al., 2007a)
Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	Reconnaissance par TLR-7 Production d'IFN-I dans les pDC humaines Dégradation du transactivateur Tat après reconnaissance par p62	(Zhou et al., 2012) (Sagnier et al., 2015)
Virus Epstein Barr	Production d'IFN- α dans les pDC humaines	(Severa et al., 2013)
Virus respiratoire syncytial	Production d'IFN- β dans les cellules dendritiques murines	(Morris et al., 2011)
Virus de l'herpès simplex 1 (HSV-1)	L'autophagie augmente la maturation des phagosomes contenant HSV-1 et permet la présentation d'antigène sur CMH-II L'autophagie permet la présentation d'antigènes sur CMH-I	(Lee et al., 2010a) (Broberg et al., 2004)

Tableau 3 : Liens entre autophagie et réponses immunitaires.

1.4.3 Inhibition de l'autophagie par les virus

Lors des infections, les virus subissent constamment une pression de sélection qui promeut la formation de mutations leur permettant de s'adapter à leur hôte, notamment en échappant à ses mécanismes de défense tels que l'autophagie. Les virus peuvent inhiber les étapes d'induction de l'autophagie ou bien les étapes de maturation des autophagosomes.

1.4.3.a Inhibition de l'initiation

Plusieurs virus échappent à l'action antivirale de l'autophagie en inhibant sa mise en place. Par exemple certains virus expriment des protéines semblables à la protéine Bcl-2 qui, comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1.2.1.b, inhibe l'autophagie dans ses étapes initiales grâce à son interaction avec Beclin-1. Les virus HHV8 (human herpesvirus 8) et HV-68 (herpesvirus murin) expriment des protéines homologues à Bcl-2 (Sinha et al., 2008).

Un autre virus qui inhibe l'initiation de l'autophagie est le virus herpès simplex 1 (HSV-1) qui effectue cette inhibition par plusieurs mécanismes. Très tôt dans le cycle viral, le virus exprime la protéine ICP34.5 qui inhibe l'autophagie en interagissant avec Beclin-1 d'une part, et en déphosphorylant le facteur d'initiation eIF2 α de la traduction d'autre part (Orvedahl et al., 2007; Tallóczy et al., 2006). De plus, il a été récemment montré qu'une autre protéine, US11, inhibe l'initiation de l'autophagie également (Lussignol et al., 2013). Cette protéine interagit avec la PKR, ce qui empêche son activation et l'induction de l'autophagie. La synthèse de cette protéine requiert la réplication de l'ADN viral, ce qui signifie que son action sur l'autophagie survient lors des étapes

tardives du cycle viral. Le fait que le virus emploie deux stratégies différentes pour inhiber l'induction de l'autophagie et ce à des moments différents de son cycle viral, souligne l'importance de cette inhibition pour le virus.

Un autre virus inhibant l'initiation de l'autophagie est le cytomégalovirus humain (HCMV). Très rapidement après l'infection, le virus induit l'autophagie mais le rôle de cette induction n'est pas encore élucidé. Cependant, après l'expression de protéines virales la protéine TRS1 bloque l'autophagie *via* sa liaison avec Beclin-1 (Chaumorcel et al., 2012).

Récemment, l'inhibition de l'autophagie par le VIH-1 dans des lymphocytes T CD4+ a été décrite pour impliquer la protéine virale Vif après son interaction avec LC3B (Borel et al., 2015).

1.4.3.b Inhibition de la maturation

Certains virus induisent les étapes initiales du processus autophagique, tout en inhibant les phases de maturation. Tel est le cas par exemple du virus VIH-1. En effet après une induction des phases initiales de l'autophagie par sa protéine fusogénique Env, VIH-1 bloque la maturation des autophagosomes grâce à l'interaction de la protéine non structurale Nef avec Beclin-1 perturbant ainsi les fonctions du complexe Beclin-1/VPS34/UVRAG (Kyei et al., 2009). De manière intéressante, Nef agit également sur le reste du processus autophagique. En effet une fois que l'infection productive est établie, Nef contribue à la phosphorylation du facteur de transcription TFEB qui reste alors séquestré dans le cytosol, ce qui limite la transcription de gènes autophagiques (Campbell et al., 2015).

Le virus de la grippe A inhibe également la maturation en ciblant Beclin-1 et en perturbant le complexe avec UVRAG grâce à sa protéine de matrice M2 (Gannagé et al., 2009).

Le Coxsackievirus B3 promeut la formation d'autophagosomes mais inhibe leur maturation également. Nous allons voir la manière dont ce virus exploite l'autophagie dans les paragraphes 1.4.4.a et 1.4.4.c. Enfin le poliovirus induit l'autophagie grâce à l'action commune de ses protéines non structurales 3A et 2BC comme nous l'avons décrit dans le paragraphe 1.4.1.e. En revanche la protéine 3A bloque le transport des autophagosomes le long des microtubules en se liant à la dynéine, ce qui les empêche de se retrouver à proximité des lysosomes (Taylor et al., 2009).

1.4.4 Rôle pro-viral de l'autophagie ou de protéines autophagiques

En plus des mécanismes d'échappement à l'autophagie certains virus ont développé des stratégies pour tirer profit des moyens de défense déployés par les cellules cibles. Ainsi certains virus ont évolué afin de pouvoir détourner l'autophagie à leur avantage. Plusieurs virus sont capables de

se multiplier de manière plus efficace quand l'autophagie est fonctionnelle. Nous allons donner ici quelques exemples de virus qui détournent l'autophagie à leur avantage.

1.4.4.a L'autophagie sert de plateforme de réplication

Certains virus notamment ceux à ARN de polarité positive sont connus pour se répliquer au niveau des membranes intracellulaires. Ce mécanisme facilite la production du virus car les complexes de réplication se retrouvent concentrés au même endroit. Ainsi certains virus semblent utiliser les membranes des autophagosomes comme de telles plateformes de réplication. Le premier virus identifié à exploiter l'autophagie de telle manière est le poliovirus. Ce virus se réplique sur des structures à double membrane. De plus, la protéine non structurale 3A du virus en plus de travailler de concert avec 2BC pour lipider LC3-I en LC3-II, colocalise avec LC3. En outre, la stimulation de l'autophagie augmente la réplication de ce virus (Jackson et al., 2005). D'autres virus utilisant les autophagosomes comme plateforme de réplication sont le Coxsackievirus B3 (Wong et al., 2008), ainsi que l'entérovirus 71 et le FMDV (Shi and Luo, 2012). Le virus de la Dengue induit l'autophagie lors de sa réplication et des ARN double brin ainsi que la protéine non structurale NS1 colocalisent avec LC3, suggérant que ses complexes de réplication se trouvent au niveau des autophagosomes (Panyasrivanit et al., 2009).

1.4.4.b L'autophagie retarde la mort cellulaire

Les virus peuvent également tirer profit de l'autophagie quand elle prolonge la survie des cellules infectées. Tel est le cas par exemple du virus du Chikungunya et du virus Sindbis pour lesquels, l'induction de l'autophagie lors de l'infection permet la dégradation des capsides virales toxiques pour la cellule (Joubert et al., 2012; Judith et al., 2013; Orvedahl et al., 2010).

Un autre exemple est le virus de la grippe A qui synthétise des facteurs pro-apoptotiques. Sur la base d'observations que l'inhibition de l'autophagie induit davantage l'apoptose lors de l'infection par ce virus, les auteurs proposent l'hypothèse que l'autophagie permet de diminuer son effet cytopathique (Gannagé et al., 2009). Il est intéressant de préciser que le virus de la grippe A bloque la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes grâce à la protéine de matrice M2. Par conséquent le flux autophagique qu'il induit est incomplet. Ceci suggère que l'autophagie promeut la survie cellulaire et que le virus peut réguler ce processus en bloquant la maturation des autophagosomes.

En revanche, le virus de l'encéphalite japonaise (JEV) quant à lui induit un flux autophagique complet qui augmente sa capacité de se répliquer et protège les cellules de la mort cellulaire. En effet l'inhibition de l'autophagie lors de l'infection par JEV active les caspases et mène à la mort

cellulaire (Jin et al., 2013). En revanche l'induction de cette autophagie limite la production de particules virales (Sharma et al., 2014). Ceci suggère que JEV manipule l'autophagie afin d'atteindre un équilibre entre survie cellulaire et multiplication optimale.

Enfin, le parvovirus B19 induit spécifiquement la mitophagie afin de prévenir les signaux apoptotiques que les mitochondries émettent (Nakashima et al., 2006).

1.4.4.c L'autophagie aide à l'assemblage et à la sortie des virus

L'autophagie peut avoir un effet pro-viral en assistant l'assemblage des virions. Par exemple le virus VIH-1 est capable d'induire et de contrôler l'autophagie pour se répliquer de façon optimale. En effet l'autophagie induite par VIH-1 permet le clivage du précurseur de Gag (polyprotéine). Au contraire, l'inhibition de l'autophagie diminue la quantité d'un des produits de ce clivage, la protéine p24. Ainsi l'autophagie favorise la production de particules virales. Cette action ainsi que la capacité du virus d'inhiber la maturation des autophagosomes afin d'éviter sa dégradation permettent une multiplication optimale (Kyei et al., 2009). Le virus de l'hépatite B est un autre virus qui nécessite l'autophagie pour accomplir son assemblage. En effet la protéine SHB de ce virus induit l'autophagie afin de promouvoir l'acquisition d'une enveloppe virale par le virus (Li et al., 2011a). Enfin l'autophagie est requise par le virus de la Dengue pour sa maturation. L'inhibition de l'autophagie donne lieu à la production de nombreuses particules non infectieuses (Mateo et al., 2013).

L'autophagie peut également promouvoir la propagation des virus en promouvant l'exocytose non lytique. Un virus qui utilise potentiellement l'autophagie pour quitter la cellule infectée par ce biais-là est le Coxsackievirus B. En effet il est libéré à l'extérieur des cellules au sein de « microvésicules extracellulaires » sur lesquelles la forme lipidée de LC3, LC3-II est retrouvée préférentiellement, suggérant un rôle pour l'autophagie dans ce type de sortie (Robinson et al., 2014).

Enfin la protéine de Matrice 2 (M2) du virus de la grippe interagit avec LC3 *via* un domaine LIR, ce qui favorise le bourgeonnement du virus et assure la stabilité du virus (Beale et al., 2014). En effet lors du bourgeonnement LC3 est relocalisé à la membrane plasmique où il interagit avec la queue cytoplasmique de M2. Ainsi M2, en plus d'inhiber la maturation des autophagosomes, détourne l'autophagie afin d'assurer une sortie efficace de la cellule infectée.

1.4.4.d L'autophagie module favorablement le métabolisme cellulaire

Certains virus comme le virus de la Dengue sont capables de modifier le métabolisme cellulaire afin de promouvoir leur propre réplication. Le virus de la Dengue induit une autophagie qui

dégrade les gouttelettes lipidiques (lipophagie), ce qui permet la libération d'acides gras et leur conversion ultérieure en ATP au sein des mitochondries. L'ATP est utilisé par le virus lors de la réplication (Heaton and Randall, 2010). L'inhibition de l'autophagie ou encore de la β -oxydation qui permet la synthèse d'ATP réduit considérablement l'efficacité de réplication du virus. En revanche dans le cas de cellules déficientes pour l'autophagie, l'apport exogène d'acides gras permet au virus de se répliquer avec la même efficacité.

I.4.4.e Autophagie et induction de la mort cellulaire

Le VIH-1 est connu comme capable d'induire l'apoptose. En effet les cellules dendritiques infectées par le VIH-1 induisent l'apoptose dans des lymphocytes T CD4+ infectés ou non par un mécanisme impliquant les ligands TRAIL et FasL (Lichtner et al., 2004). Ce phénomène pourrait expliquer la baisse drastique du nombre de lymphocytes T CD4+ caractéristique de la maladie du SIDA. De manière intéressante, une autre étude a montré que l'autophagie pourrait aussi jouer un rôle dans l'induction de l'apoptose (Espert et al., 2006). Les glycoprotéines d'enveloppe gp41 et gp120 exprimées à la surface des cellules infectées induisent l'autophagie dans les cellules voisines non infectées *via* un processus impliquant le récepteur CXCR4 et la fusion des membranes cellulaires. Cette autophagie est nécessaire à la mort par apoptose de ces cellules qui à son tour contribue probablement aussi à l'immunodéficience. En revanche, dans les cellules infectées l'induction de l'autophagie est rapidement inhibée ce qui souligne la capacité du virus à échapper à l'activité antivirale de l'autophagie (Blanchet et al., 2010; Kyei et al., 2009).

I.4.4.f Autres rôles pro-viraux de l'autophagie

Une étude récente sur le virus du Chikungunya a révélé des rôles distincts pour les deux récepteurs autophagiques p62 et NDP52 (Judith et al., 2013). Nous avons déjà évoqué que p62 reconnaît la capsid virale et la cible pour dégradation autophagique. NDP52 quant à elle reconnaît la protéine non-structurale nsP2. Cette interaction régulerait positivement la réplication de l'ARN viral. De plus elle prévient la mort cellulaire induite par nsP2. Enfin, cette interaction est spécifique à NDP52 humaine et expliquerait la permissivité accrue des cellules humaines par rapport aux cellules murines par exemple.

Comme nous l'avons déjà décrit, l'autophagie peut inhiber la voie NF- κ B en dégradant des composants de cette voie (Faure and Lafont, 2013). Cette stratégie est utilisée par le Cytomégalovirus humain qui induit la dégradation autophagique de NEMO, empêchant ainsi la signalisation NF- κ B (Fliss et al., 2012).

Certains virus utilisent la capacité de l'autophagie à inhiber la réponse IFN-I à leur avantage. En effet le virus de l'hépatite C (HCV) induit l'autophagie en déclenchant la réponse UPR (cf paragraphe I.4.1.d) (Ke and Chen, 2011). L'infection par le virus VSV induit également l'autophagie par l'interaction entre ATG5/ATG12 et la protéine mitochondriale TUFM (Lei et al., 2012). TUFM est capable d'interagir également avec un régulateur négatif d'IPS-1, ce qui séquestre ce dernier à la membrane mitochondriale et l'empêche de remplir ses fonctions de signalisation. Ainsi TUFM induit l'autophagie et inhibe la réponse IFN-I en même temps. Cependant, dans ce cas précis il reste à déterminer si l'induction de l'autophagie inhibe directement la production d'IFN-I. Enfin, mon équipe d'accueil a identifié la protéine IRGM comme responsable de l'induction de l'autophagie suite à l'infection par la virus de la rougeole (Grégoire et al., 2011). Comme IRGM peut être localisée au niveau des mitochondries, une hypothèse à explorer serait que son ciblage pourrait permettre de contrôler les réponses IFN-I également, comme nous l'avons proposé dans une revue bibliographique (Petkova et al., 2012, Annexe 2).

II Le virus de la rougeole, un modèle d'étude de l'autophagie

Le virus de la rougeole comme n'importe quel autre virus est capable de perturber et de détourner des fonctions cellulaires majeures afin d'assurer sa survie, réplication et dissémination. En particulier, le virus de la rougeole est capable d'induire l'autophagie à plusieurs niveaux de son cycle viral, comme des données de l'équipe le montrent. Ainsi nous utilisons ce virus pour perturber l'autophagie afin de mieux comprendre les mécanismes qui la régulent. Cette stratégie a permis d'identifier par exemple que l'engagement du récepteur CD46 est capable d'induire l'autophagie. De plus le VR détourne l'autophagie de ses fonctions de défense cellulaire, puisqu'elle lui permet de se répliquer plus efficacement. L'étude de ce détournement a aussi rendu possible l'identification de plusieurs régulateurs de l'autophagie, comme nous allons le détailler dans la partie Résultats.

II.1 Présentation générale du virus de la rougeole

La rougeole, est une maladie virale extrêmement contagieuse dont l'agent étiologique est le virus de la rougeole (VR). Cette infection est une des causes principales de mortalité et morbidité dans le monde notamment chez les enfants. La rougeole a été documentée pour la première fois au IX siècle où elle a été décrite comme une variante atténuée de la variole. Ce n'est qu'en 1846 que les signes cliniques, la période d'incubation et le déroulement de l'infection ont été décrits par le médecin Danois Peter Panum. Le virus a été finalement isolé en 1954 par Enders et Peebles qui ont inoculé des cellules primaires humaines de rein en culture avec un échantillon de sang d'un patient, appelé David Edmonston, infecté avec le virus de la rougeole et qui donnera son nom à une des souches du VR (Enders and Peebles, 1954).

Le VR se transmet par des gouttelettes contaminées issues du tractus respiratoire des patients infectés et dans des cas plus rares, par aérosols (Chen et al., 1989). De plus le virus conserve son pouvoir infectieux dans ces gouttelettes pendant plusieurs heures. Lors des premiers jours après l'infection initiale, aucun signe clinique ne se manifeste. Le premier symptôme de rougeole est en général une forte fièvre qui survient 10 à 12 jours après exposition au virus et qui dure entre quelques jours et une semaine. Les autres symptômes tels que toux, rhume, conjonctivite et dans certains cas des diarrhées et vomissements surviennent rapidement après l'apparition de la fièvre. Deux jours environ après les premiers symptômes, des taches blanches appelées signe de Koplik peuvent apparaître sur la muqueuse interne de la bouche. Ce signe est spécifique à l'infection par le

VR et permet un diagnostic certain avant même l'apparition de l'éruption cutanée caractéristique de la maladie. L'éruption cutanée quant à elle se manifeste trois à cinq jours après l'apparition des premiers symptômes. Elle se caractérise par des taches rouges et sans relief qui apparaissent initialement sur tout le visage jusqu'à la limite des cheveux puis se propagent sur le cou, le torse, les membres supérieurs et inférieurs et les pieds (Moss and Griffin, 2012). Les taches peuvent fusionner entre elles pour former des plus grandes plaques rouges au cours de la progression de l'éruption sur le corps. Elle dure entre trois et cinq jours, suite à quoi chez les patients immunocompétents elle se résorbe et la fièvre diminue. En outre, les personnes qui ont été infectées par le VR développent une immunité humorale (Black and Rosen, 1962) et cellulaire (van Binnendijk et al., 1990), les protégeant efficacement contre une nouvelle infection par le VR.

Cependant, une immunosuppression transitoire mais sévère survient dans les semaines après élimination du virus. Ce phénomène a été décrit pour la première fois par Von Pirquet au début du XX siècle. Il a observé une inhibition des réponses d'hypersensibilité cutanée à la tuberculine chez des patients infectés par le VR (Pirquet, 1908). L'infection par le VR est aussi associée à une réduction importante des lymphocytes totaux avec une forte inhibition de la prolifération des cellules T *in vitro* (Coovadia et al., 1978). En revanche le nombre de lymphocytes revient à un niveau normal au bout d'une semaine après la disparition des symptômes, tandis que l'immunosuppression persiste (Ryon et al., 2002), (Ward et al., 1991), (Griffin, 1991). De plus, des essais *in vitro* ont montré que les « synapses immunologiques » entre des cellules dendritiques infectées par le VR et des lymphocytes T sont instables dans le temps, ce qui empêche une activation robuste de ces derniers (Shishkova et al., 2007).

Parmi les complications qui peuvent résulter de l'infection par le VR et l'immunosuppression qu'elle induit, on retrouve des infections du tractus respiratoire (et le développement d'une pneumonie), des laryngotrachéobronchites, des otites, des encéphalites. Dans certains cas des diarrhées peuvent aussi survenir, aggravant ainsi l'état de dénutrition et de déshydratation (Duke and Mgone, 2003).

Plusieurs complications peuvent aussi toucher le système nerveux central : l'encéphalite post-éruptive (appelée encore encéphalite post-infectieuse), l'encéphalite aiguë à inclusions, et la panencéphalite sclérosante subaiguë (PESS). L'encéphalite post-éruptive qui se caractérise par une démyélinisation est la plus courante des trois et survient dans 0.1% des cas d'infection par le VR. Dans 10% des cas cette complication s'avère être fatale (Johnson et al., 1984). L'encéphalite aiguë à inclusions touche les patients immunodéprimés au bout d'un à six mois après l'infection par le VR. Elle résulte de l'incapacité à éliminer les cellules infectées en raison d'un faible nombre de cellules T cytotoxiques. De même, l'issue de cette complication est souvent fatale ou bien laisse des séquelles

graves (Roos et al., 1981). Enfin, la PESS, décrite pour la première fois en 1933 (Dawson, 1933), se caractérise aussi par une persistance du VR dans le cerveau et induit une baisse drastique dans les capacités cognitives, des problèmes moteurs, des convulsions, un coma et finalement la mort. Cette complication se manifeste plusieurs années après la contraction du VR (Gutierrez et al., 2010).

Il n'existe aucun traitement particulier pour guérir la rougeole, en revanche des vaccins d'une très grande efficacité sont commercialisés depuis maintenant plus de cinquante ans. Malgré leur existence, le VR reste largement répandu dans le monde. En effet, d'après les données de l'Organisation mondiale de santé (OMS) (publiées dans Global measles and rubella strategic plan : 2012-2020), après une chute de 75% des cas mortels suite à une infection par le VR, une stagnation, voire une tendance inverse est observée. Les estimations de l'OMS (2014) indiquent qu'en 2012, 122 000 personnes sont décédées suite à l'infection par le VR, tandis qu'en 2013 ce chiffre s'élève à 145 700. Cette persistance est due à une couverture vaccinale mondiale incomplète. En effet en raison du fort pouvoir infectieux du virus de la rougeole, ainsi que de sa capacité à survivre à l'état « libre », une couverture vaccinale de plus de 95% est nécessaire afin de pouvoir l'éradiquer. Malgré les efforts d'éradication menés par l'OMS, plusieurs problèmes se posent. En effet les pays en voie de développement présentent notamment des difficultés d'accès aux services de vaccination, un manque de suivi, des délais importants dans la signalisation et l'étude de l'origine d'une nouvelle infection et d'autres problèmes logistiques (Duke and Mgone, 2003). En outre, la méfiance accrue envers les vaccins que l'on observe ces dernières années ainsi que la fausse impression par la population que la rougeole est une maladie bénigne, contribuent à l'établissement d'une couverture vaccinale insuffisante pour éradiquer le virus (Caseris et al., 2015). Cette insuffisance a été précisément à l'origine de l'épidémie qui a touché plusieurs pays en Europe entre 2007 et 2011. En France le pic de l'épidémie a été atteint en 2011 (près de 15 000 cas déclarés). Depuis le VR continue de circuler sans pour autant donner lieu à une nouvelle épidémie. Dans le monde le VR est toujours bien présent, notamment dans les pays en voie de développement, où la vaccination systématique reste difficile.

II.2 Biologie du virus de la rougeole

Le virus de la rougeole est un virus enveloppé, à ARN simple brin, non segmenté, de polarité négative ce qui le place dans l'ordre *Mononegavirales*. Il appartient au genre *Morbillivirus*, et à la famille *Paramyxoviridae*. Les particules virales sont pléiomorphiques mais le plus souvent elles ont une forme sphérique. Leur taille varie entre 100 et 300nm (Lund et al., 1984). Le génome viral code pour six protéines structurales (**N** : la nucléoprotéine, **P** : la phosphoprotéine, **M** : la protéine de

matrice, **F** : la protéine de fusion, **H** : l'hémagglutinine, **L** : la polymérase (large protein)) et deux protéines non-structurales (**V** et **C**). Nous allons décrire ces protéines dans les sous chapitres II.2.1 et II.3.2.

II.2.1 Structure du virus de la rougeole

Comme évoqué précédemment, le virus de la rougeole est un virus enveloppé qui possède un brin d'ARN de polarité négative. Son génome code pour six protéines structurales et deux protéines non structurales. Nous allons décrire les protéines structurales et leurs fonctions de manière plus détaillée dans le présent sous-chapitre.

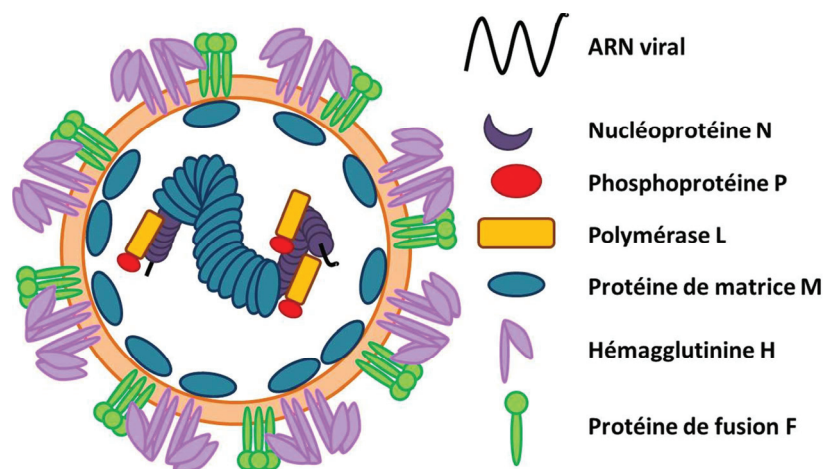


Figure 12 : Schéma général du virus de la rougeole.

II.2.1.a La nucléoprotéine N

Le génome viral est entouré par la nucléoprotéine N qui est la protéine la plus abondante du virus de la rougeole. Le complexe qui en résulte s'appelle la nucléocapside. Le rôle de la nucléoprotéine est de protéger l'ARN viral des nucléases d'une part et d'assurer la transcription et la réplication d'autre part. Les monomères de nucléoprotéine ainsi que toute la nucléocapside sont des structures dynamiques qui subissent des réarrangements constants afin d'assurer l'accès de la polymérase au génome viral de manière continue.

La nucléoprotéine forme une hélice de monomères dans laquelle chaque monomère interagit précisément avec six nucléotides comme c'est le cas pour tous les virus de la famille *Paramyxoviridae* (Egelman et al., 1989). Elle est constituée de 525 acides aminés (aa) et possède deux domaines appelés domaine Ncore et domaine Ntail.

Figure protégée (Figure 1E et 1F, Gutsche et al., 2015)

Figure 13 : Structure de la nucléocapside constituée du domaine Ncore et l'ARN viral, résolue en cryo-microscopie électronique. Vue de l'extérieur (à gauche) et de l'intérieur (à droite) de l'hélice de la nucléocapside.

Sur la figure sont représentés 3 monomères Ncore. Les parties en bleu clair et bleu foncé représentent la partie N terminale du domaine Ncore (NTD). Les parties en rose et jaune correspondent au domaine C terminal (CTD). NTD et CTD sont les deux domaines globulaires entre lesquels se loge l'ARN viral représenté en vert. L'oligomérisation de N est assurée par les deux petits sous-domaines de NTD et CTD représentés en bleu foncé et jaune respectivement.

Extrait de (Gutsche et al., 2015).

Le domaine Ncore (du 1^{er} au 399^{ème} acide aminé) est un domaine très ordonné constitué de deux domaines globulaires qui forment une fente où l'ARN viral se loge (Figure 13). Ainsi il est responsable de la liaison à l'ARN viral mais également de l'assemblage de la nucléocapside par le biais du sous-domaine à l'extrémité N-ter du domaine NTD et le sous-domaine à l'extrémité C-ter du domaine CTD, appelés bras NTD et bras CTD. En effet, le bras NTD lie le monomère N suivant, tandis que le bras CTD lie le monomère précédent (Gutsche et al., 2015).

Le domaine Ntail contient 126 aa (du 400^{ème} au 525^{ème}). A l'inverse du domaine Ncore, le domaine Ntail est désordonné en l'absence d'interaction avec d'autres protéines (Bourhis et al., 2006; Longhi et al., 2003). Ntail interagit avec la phosphoprotéine P du virus de la rougeole, ce qui promeut la transcription puis la réplication virale. Cette interaction est possible grâce au bras du domaine CTD qui permet aussi la sortie du domaine Ntail de l'hélice de nucléocapside pour lui permettre de rapprocher le complexe de polymérase virale vers le génome. De manière intéressante, il a été récemment montré que la partie Ntail n'est pas indispensable au recrutement de P à la nucléocapside (Krumm et al., 2013). En revanche Ntail est important pour la progression du complexe polymérase virale le long du génome *via* le domaine qui lie P. En outre il est possible que cette liaison facilite l'accès de la polymérase au génome car, comme évoqué plus haut dans le paragraphe, la liaison de Ntail avec des partenaires protéiques induit une structure ordonnée.

Ntail interagit aussi avec un certain nombre de protéines cellulaires : hsp 70 (hsp : heat-shock protéin 70)(Couturier et al., 2010), hsp 72 (Zhang et al., 2005), IRF-3 (interferon regulatory factor) (tenOever et al., 2002) et eIF3-p40 (domaine p40 du eukaryotic initiation factor (eIF3)) (Sato et al.,

2007), le récepteur à IgG de faible affinité FcγRII (CD32) (Ravanel et al., 1997), ainsi qu'une protéine pas encore identifiée, qui contribue à l'immunosuppression induite par le virus (Laine et al., 2003, 2005). Toutes ces interactions visent à augmenter la capacité répliquative du virus et moduler les réponses immunitaires induites dans les cellules suite à l'infection.

Enfin, une étude a montré récemment que l'état de phosphorylation de la nucléoprotéine a un effet sur le titre et la multiplication virale en régulant l'expression de gènes viraux (Sugai et al., 2013). La phosphorylation excessive de N donne lieu à une instabilité de l'ARN virale face aux ARNases. Enfin les interactions entre N et la phosphoprotéine P régulent la phosphorylation de N.

II.2.1.b La phosphoprotéine P

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que la phosphoprotéine est très importante pour la transcription et la réplication du VR. En effet P joue le rôle de pont entre la nucléocapside, contenant le génome viral, et la polymérase (Johansson et al., 2003). Les interactions dynamiques entre P et la nucléoprotéine qui donnent lieu à des cycles d'associations et dissociations assurent la progression de P le long de la nucléocapside et assurent la transcription et réplication correcte du génome viral par la polymérase virale (Gutsche et al., 2015; Shu et al., 2012).

La phosphoprotéine possède deux domaines qui ont des structures et des fonctions sensiblement différentes. La partie N-terminale (PNT) est un domaine très peu conservé parmi les membres de la sous-famille des *Paramyxovirinae*. Elle est intrinsèquement désordonnée (Karlin et al., 2002) et interagit avec le domaine Ncore. La partie PNT participe à la réplication virale, notamment en assurant l'encapsidation de l'ARN viral nouvellement formé (Curran, 1996; Curran et al., 1994, 1995). A l'inverse, la partie C-terminale de la phosphoprotéine (PCT) est bien conservée chez les *Paramyxovirinae* d'une part et a une structure ordonnée d'autre part. La moitié PCT porte tous les domaines nécessaires à la transcription (Curran, 1996). Elle interagit avec la polymérase L (polymérase virale) et avec le domaine Ntail de la nucléoprotéine. Cette interaction induit une structure ordonnée du domaine Ntail (Longhi et al., 2003).

La phosphoprotéine interagirait aussi avec STAT1 (signal transducers and activators of transcription), un facteur de transcription impliqué dans la signalisation de l'induction d'IFN-I (Devaux et al., 2013) (cf paragraphe I.3.2.a.i et *Figure 18*). Cette interaction pourrait interférer avec la phosphorylation de STAT1 qui est un événement important pour la cascade de signalisation de l'IFN-I.

Enfin, le gène qui code pour la phosphoprotéine code pour deux autres protéines appelées V et C. Ce sont deux protéines non-structurales qui résultent d'un décalage du cadre de lecture de P ou

de la présence d'un autre cadre de lecture au sein de celui de P. Nous allons décrire leurs fonctions dans le sous chapitre II.3.2.

II.2.1.c La polymérase L

La protéine L est la polymérase virale. C'est une ARN-polymérase ARN-dépendante. A l'aide de son co-facteur, la phosphoprotéine P, elle assure la transcription et la réplication du génome viral. Cette protéine de 250kDa, porte tous les domaines enzymatiques nécessaires à la transcription et à la réplication : le coiffage et la polyadénylation des ARNm, ainsi que la polymérisation des nucléotides. Des comparaisons des séquences entre certains membres de l'ordre *Mononégavirales* ont permis l'identification de six domaines conservés qui remplissent les fonctions essentielles de la polymérase (Poch et al., 1990). Cependant, l'étude détaillée de la protéine L est difficile du fait de la grande taille de celle-ci, ainsi que de la présence de domaines flexibles (Kranzusch and Whelan, 2012).

II.2.1.d La protéine de matrice M

L'assemblage du virus de la rougeole se fait à la membrane plasmique, ce qui implique la nécessité d'un transport efficace de tous les composants du virus vers la zone d'assemblage. Ce transport est assuré par la protéine de matrice M, qui a la capacité intrinsèque de s'associer aux membranes cellulaires (Riedl et al., 2002). Par ailleurs, la protéine M est responsable aussi du bourgeonnement des particules virales nouvellement formées. En effet, l'infection avec un virus déficient pour la protéine M donne lieu à des virions incapables de bourgeonner (Cathomen et al., 1998) au profit d'une plus grande capacité à former des syncytia. Dans ce cas précis la colocalisation entre la nucléocapside et les glycoprotéines de surface n'est plus observée, illustrant le rôle de M dans le transport d'éléments viraux. Le rôle de M dans le bourgeonnement est mis en évidence dans le cas de transfection de cette protéine en l'absence de toute autre protéine virale. Ainsi, dans ce contexte, le bourgeonnement de pseudo-particules virales est observé (Pohl et al., 2007).

Pour que l'assemblage et le bourgeonnement soient efficaces, les composants viraux devraient se localiser tous au même endroit, suggérant l'existence possible de zones de « nucléation » où le virus s'assemble. En effet, il a été montré que l'assemblage s'effectuerait au niveau des radeaux lipidiques se trouvant sur la membrane plasmique et qui joueraient le rôle de plateformes d'assemblage (Manié et al., 2000; Vincent et al., 2000). Enfin il a été récemment montré que la protéine M forme une structure hélicoïdale qui entoure la nucléocapside et transporte cette dernière vers la membrane plasmique où l'interaction avec les queues cytoplasmiques des

glycoprotéines de surface et le bourgeonnement qui suit se produisent (Liljeroos et al., 2011). Cette découverte change le modèle qui avait été admis selon lequel la protéine M tapisse l'intérieur de l'enveloppe du virion et suggère un modèle alternatif où seulement une partie minoritaire de la protéine de matrice se trouve à ce niveau-là et interagit avec les queues cytoplasmiques de F et H.

Les fonctions de la protéine M décrites ci-dessus ont aussi des effets indirects. Par exemple, le transport de la nucléocapside vers la membrane plasmique pour l'assemblage, régule négativement la synthèse d'ARN (Iwasaki et al., 2009). Aussi la protéine de matrice peut promouvoir le bourgeonnement en régulant l'activité fusogénique de la protéine F de fusion (Tahara et al., 2007).

Enfin la protéine de matrice peut aussi s'associer avec la F-actine, ce qui empêche l'interaction de M avec les glycoprotéines de surface favorisant la formation de syncytia au dépens du bourgeonnement (Wakimoto et al., 2013).

II.2.1.e La protéine de fusion F

La protéine F est responsable de la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique de la cellule hôte, indépendamment du pH. La protéine F doit obligatoirement être associée à la protéine H afin d'assurer la fusion (Wild et al., 1991). Un mécanisme similaire à celui régissant la fusion entre une particule virale et la cellule cible a lieu aussi lors de la fusion de deux cellules dont au moins une doit être infectée afin d'exprimer la protéine F et la protéine H à sa surface.

C'est une protéine transmembranaire de type I qui a son extrémité N-terminale orientée à l'extérieur du virus. La protéine F est assemblée en homo-trimères dont les monomères sont reliés par leurs domaines transmembranaires (Smith et al., 2013). Elle est synthétisée d'abord sous une forme inactive, appelée F0 (Chang and Dutch, 2012). F0 est ensuite activée par clivage par une protéase cellulaire, la furine, dans le réseau trans-Golgi. Le clivage s'effectue au niveau d'un motif consensus qui a la séquence R-X-K/R-R. La protéine F qui en résulte et qui possède maintenant une activité fusogénique, est composée de deux sous unités F1 et F2 reliées par un pont disulfure (*Figure 14a*). Lors de ce clivage le peptide de fusion (qui a un caractère hydrophobe) est généré également. Ce peptide de fusion s'ancrera dans la membrane de la cellule cible au début de l'infection. Au niveau de la sous-unité F1 se trouvent aussi deux domaines HR (heptad repeat). Ce sont des domaines où tous les 7 aa on retrouve un des résidus leucine, isoleucine ou valine dans la séquence. La structure secondaire du domaine HR est une hélice-alpha. Lors de la fusion ces deux domaines se rapprochent et forment un bouquet à six hélices (6-helix bundle), une structure très stable qui promeut la fusion (*Figure 14b*).

La queue cytoplasmique de F est très importante pour l'assemblage aussi, car elle interagit avec la protéine de matrice comme nous l'avons vu précédemment.

Figure protégée (Figure 4, Palgen et al., 2015)

Figure 14 : Architecture de la protéine de fusion F. **a** : domaines fonctionnels de F après clivage par la furine ; les deux sous-domaines F1 et F2 sont représentés. **b** : structure de la protéine F sous sa forme trimérique après le clivage (forme active à gauche) et après l'ancrage du peptide de fusion dans la membrane plasmique de la cellule cible. La formation du bouquet à six hélices est mise en évidence (hélices rouges et bleues). Les domaines de différents couleurs correspondent à ceux représentés sur la figure a. Extrait de (Palgen et al., 2015).

II.2.1.f La protéine hémagglutinine H

La dernière protéine structurale du virus de la rougeole est l'hémagglutinine H. Cette protéine participe aussi à l'entrée du VR car elle lie la particule virale au récepteur cellulaire. Cette liaison permet l'attachement physique du virus à la cellule et aussi le déclenchement des changements conformationnels au sein de la protéine F, qui permettent la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique.

L'hémagglutinine est une protéine trans-membranaire de type II dont la partie C-terminale se trouve à l'extérieur du virus. La protéine H se présente sous forme de dimères ou de tétramères (dimère de dimères) à la surface du virus (Chang and Dutch, 2012; Hashiguchi et al., 2011a). Un monomère est constitué d'une queue cytoplasmique, un domaine transmembranaire, une tige et un domaine globulaire. Ce sont les têtes globulaires qui assurent la liaison entre l'hémagglutinine et les récepteurs cellulaires (Hashiguchi et al., 2011a). Deux monomères se lient par des ponts disulfure au niveau de la tige pour former un dimère (Colf et al., 2007). Ces dimères peuvent ensuite s'associer en dimères pour former des tétramères (Hashiguchi et al., 2011b). La tige porte la zone activatrice de la protéine de fusion qui est masquée avant l'engagement de H par le récepteur cellulaire. Après cet événement d'attachement, cette partie de la tige est exposée et induit des changements de conformation dans la protéine de fusion (Ader et al., 2012). Ce modèle de « 4 heads down/4 heads

up », dont le nom rappelle le changement simultané de la configuration des têtes globulaires des quatre monomères entraînant l'exposition de la zone activatrice de la protéine F serait commun à tous les *Paramyxoviridae*, dont le virus de la rougeole (Jardetzky and Lamb, 2014). En effet un virus recombinant exprimant l'hémagglutinine sans les têtes globulaires est capable d'activer la protéine de fusion (Brindley et al., 2013). Une étude récente suggère que H mais pas F est capable d'induire l'apoptose dans des cellules HeLa (Yi et al., 2013).

Enfin la queue cytoplasmique de H interagit avec la protéine de matrice M ce qui influence l'assemblage et la capacité de fusion du virus (Tahara et al., 2007).

II.2.2 Cycle viral

La production de nouvelles particules virales se fait en plusieurs étapes successives. Tout d'abord le virus se fixe à un récepteur cellulaire *via* la protéine hémagglutinine (H). Ensuite la protéine F subit des changements conformationnels qui entraînent le rapprochement et la fusion de l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. Cette étape permet l'entrée du virus dans la cellule hôte et la libération de la nucléocapside. Le génome viral est alors transcrit en ARN messagers (ARNm) et les protéines virales sont traduites à partir de ces derniers. Des ARN de polarité positive sont aussi produits et servent de matrice pour la réplication de l'ARN génomique nouvellement formé. Enfin l'assemblage du virus s'effectue à la membrane plasmique. Le virus se propage soit par bourgeonnement soit en formant des syncytia (Figure 15).

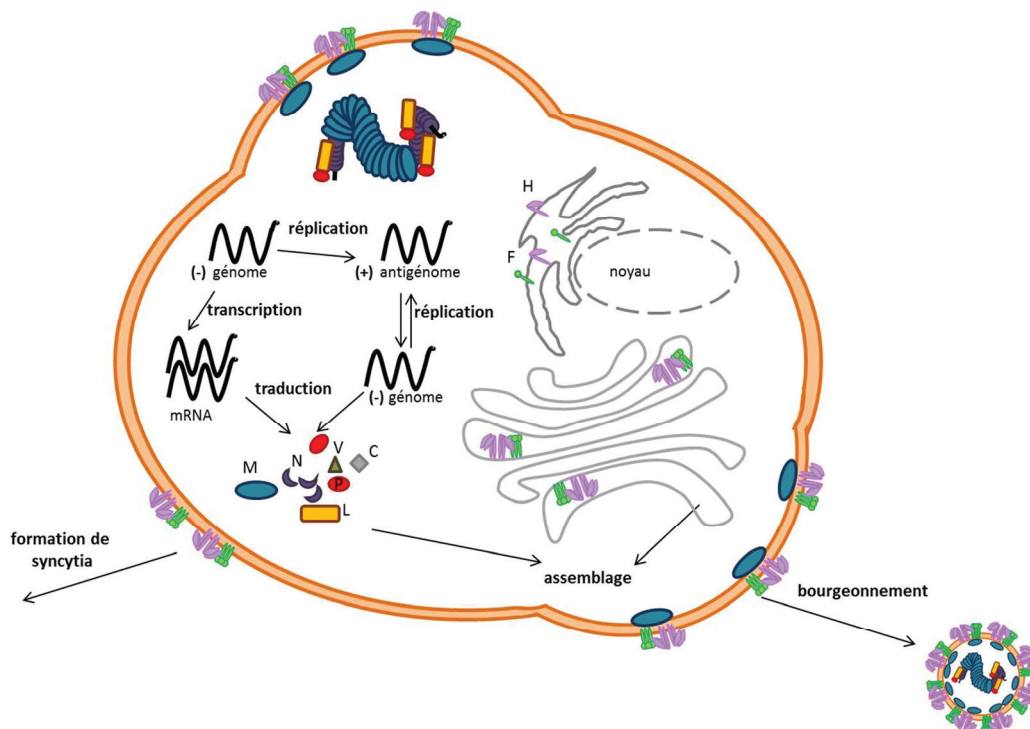


Figure 15 : Représentation schématique du cycle viral du virus de la rougeole.

II.2.2.a L'entrée du VR dans la cellule cible

Comme évoqué plus haut, l'entrée virale nécessite deux glycoprotéines de surface, la protéine H (hémagglutinine) et la protéine F (protéine de fusion). La présence de H est indispensable à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire (Wild et al., 1991). De plus H et F interagissent entre elles sans qu'il y ait liaison avec le récepteur cellulaire. Enfin, il a été montré que l'efficacité de fusion du virus avec la cellule hôte et la force de liaison entre H et F sont inversement proportionnelles (Plempner et al., 2002).

L'attachement de l'hémagglutinine au récepteur cellulaire entraîne des changements conformationnels qui exposent la partie de H capable d'activer la protéine de fusion (Navaratnarajah et al., 2011). La protéine de fusion subit alors à son tour des changements conformationnels qui lui permettent d'insérer la partie contenant le peptide de fusion dans la membrane plasmique de la cellule cible. D'autres changements conformationnels permettent par la suite le rapprochement entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire puis la fusion entre ces deux dernières (Lamb and Jardetzky, 2007), (Figure 16).

Il est à noter que le VR peut lier plusieurs récepteurs différents. Nous allons développer ce point dans sous-chapitre II.3.1.

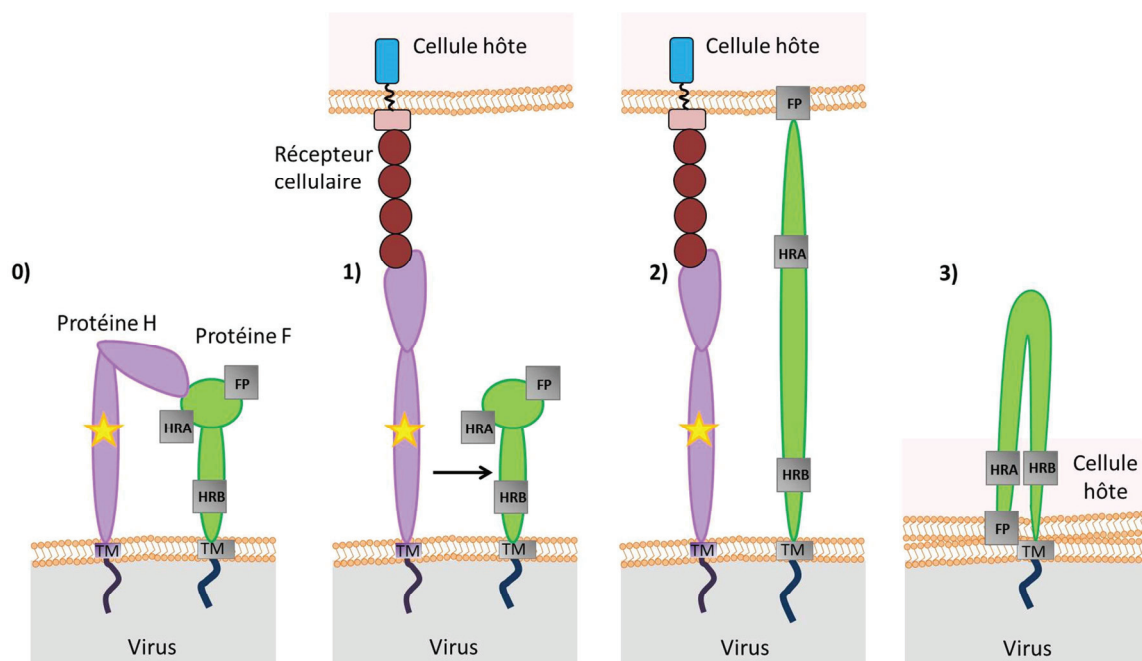


Figure 16 : Schématisation du mécanisme d'entrée du virus de la rougeole dans la cellule hôte : 0) représentation des protéines H et F. **1)** La protéine H se lie au récepteur cellulaire et par conséquent change de conformation. Ce changement expose un domaine qui peut activer la protéine F (représenté par une étoile). **2)** L'activation de F entraîne un changement conformationnel de F également. Ainsi F peut enchâsser son peptide de fusion (FP) dans la membrane plasmique de la cellule hôte. **3)** Un nouveau changement de conformation de F visant à rapprocher les domaines heptad repeat A et B (HRA, HRB) permet le rapprochement de la membrane plasmique et l'enveloppe virale puis leur fusion.

II.2.2.b La transcription et la réplication virales

Après l'entrée du virus qui résulte de la fusion de l'enveloppe virale et la membrane plasmique, la nucléocapside se retrouve libre dans le cytoplasme de la cellule infectée. L'ARN génomique associé à la nucléocapside est alors transcrit en ARN messagers (ARNm) à l'aide de l'ARN polymérase ARN-dépendante, constituée de la polymérase L et de son cofacteur la phosphoprotéine P. En effet la transcription du génome en ARNm n'est efficace que si le génome est encapsidé dans le homopolymère hélicoïdal constitué par la nucléoprotéine N (Brunel et al., 2014).

La polymérase reconnaît le promoteur à l'extrémité 3' de l'ARN génomique et la transcription de la nucléoprotéine N (qui se trouve au tout début du génome viral) commence. A la fin du gène qui code pour N la polymérase reconnaît le signal d'arrêt (« gene stop signal »). Deux cas peuvent alors se présenter. La polymérase reconnaît le signal de début du gène (« gene start signal ») suivant (la phosphoprotéine P dans le cas du VR) et l'ARNm de celui-ci est synthétisé. Dans le cas contraire elle se décroche de l'ARN génomique et pourrait revenir au début du génome pour recommencer la transcription du premier gène. Ce phénomène caractéristique à tous les virus appartenant à l'ordre des *Mononégavirales* s'appelle « gradient de transcription ». Ainsi plus un gène se trouve près du début du génome, plus ses ARNm sont transcrits en grand nombre (Cattaneo et al., 1987). La quantité d'ARNm, de la plus abondante à la moins abondante est comme suit : nucléoprotéine (N), phosphoprotéine (P), matrice (M), protéine de fusion (F), hémagglutinine (H) et enfin la polymérase (L).

Dans certains cas la polymérase virale ne reconnaît pas le signal d'arrêt de gène et continue la transcription d'un ARNm qui correspond à deux ou plusieurs gènes (ARNm bi- ou polycistroniques).

Au bout de 5-6 heures d'infection des nouvelles polymérases virales sont synthétisées et l'accumulation d'ARNm cesse d'être linéaire mais devient exponentielle. Quand une quantité suffisante de N et P s'accumule (au bout de 12-14h post infection) la transcription s'arrête et laisse la place à la réplication et la transcription secondaire (transcription à partir de RNAs viraux synthétisés *de novo* (Plumet et al., 2005). Lors de la réplication, la polymérase ne s'arrête pas au niveau des régions inter géniques, mais synthétise un ARN de polarité positive qui correspond au génome complet du virus et qui sert comme matrice pour la synthèse d'ARN de polarité négative. Ces ARN peuvent servir à la transcription secondaire ou peuvent être dirigés à la membrane plasmique tout comme les protéines virales structurales où l'assemblage de nouveaux virions a lieu.

II.2.2.c L'assemblage et le bourgeonnement

L'assemblage du virus de la rougeole se fait à la membrane plasmique où le virus bourgeonnera pour se propager vers d'autres cellules (Harrison et al., 2010). L'enveloppe virale se

« forme » au cours de ce bourgeonnement et est dérivée de la membrane plasmique. La protéine M est cruciale pour l'assemblage du virus du fait de sa capacité de lier plusieurs protéines du VR ainsi que plusieurs facteurs cellulaires (Maisner et al., 2000; Peeples, 1991). Cette protéine synthétisée dans le cytosol des cellules infectées est rapidement associée aux membranes cellulaires (Riedl et al., 2002) et interagit à ce niveau avec les domaines cytoplasmiques des glycoprotéines F et H. Elle est capable aussi d'interagir avec la nucléocapside du VR. En outre, elle colocalise avec les inclusions périnucléaires constituées des nucléocapsides virales. Enfin, c'est précisément la protéine M qui assure le transport de la nucléocapside depuis les inclusions périnucléaires vers le site de bourgeonnement sur la membrane plasmique (Runkler et al., 2007). Il est intéressant de noter que dans le cas du virus de la rougeole la protéine M est suffisante pour le bourgeonnement et le relargage de « virus-like particles » (pseudo-particules virales qui ne portent pas un génome viral), en absence d'autres protéines virales. Ceci signifie que la protéine M est suffisante pour la formation d'une courbure dans la membrane plasmique ainsi que pour la scission de cette dernière (Pohl et al., 2007; Runkler et al., 2007).

Le virus de la rougeole ainsi que de nombreux autres virus de la famille *Paramyxoviridae* bourgeonnent du côté apical des cellules polarisées telles que les cellules épithéliales (Blau and Compans, 1995). De manière intéressante, les glycoprotéines H et F ont une capacité intrinsèque à s'ancrer au niveau de la face baso-latérale des cellules épithéliales, si elles sont exprimées en absence d'autres protéines virales. En revanche, lors d'une infection virale, H et F sont exprimées du côté apical et le virus bourgeonne à ce niveau-là (Maisner et al., 1998), phénomène contrôlé très probablement par la protéine M (Naim et al., 2000).

De manière intéressante, le cytosquelette d'actine est aussi impliqué dans le bourgeonnement de certains membres de *Paramyxoviridae* et du virus de la rougeole en particulier. En effet un lien étroit entre le bourgeonnement viral et la formation de filaments d'actine a été montré (Bohn et al., 1986). Une étude récente a mis en évidence que les filaments d'actine intacts sont nécessaires au transport de la nucléocapside et de la protéine M vers la membrane plasmique d'une part mais que les mouvements dynamiques de l'actine sont indispensables au bourgeonnement et à la scission de la membrane cellulaire d'autre part (Dietzel et al., 2013).

Une autre étude suggère que le réseau de microtubules est également impliqué dans le transport d'éléments viraux vers le site d'assemblage et le bourgeonnement. En effet dans des cellules Vero exprimant le récepteur CD150/SLAM humain, la nucléocapside ainsi que la protéine L sont transportées le long des microtubules vers le centre d'organisation des microtubules. Ce phénomène dépend de Rab11a, appartenant à la sous-famille des Rab11 GTPase, qui sont importantes pour le trafic des endosomes de recyclage (Nakatsu et al., 2013).

II.2.2.d La formation de syncytia : mécanisme de propagation du VR

Un autre mécanisme de transmission du virus de la rougeole à d'autres cellules est la formation de syncytia. En effet, l'hémagglutinine H et la protéine de fusion F sont exprimées à la surface des cellules infectées (*Figure 15*). Ainsi la cellule infectée peut fusionner avec une nouvelle cellule *via* un mécanisme similaire à la fusion de la particule virale avec une cellule cible. Cette fusion requiert aussi l'expression de F et H (Wild et al., 1991). Ce genre de fusion donne lieu à la formation de cellules géantes multinucléées, appelées syncytia et permet la transmission du génome viral vers d'autres cellules. Par ailleurs cette propriété du VR serait responsable de la capacité du virus de la rougeole d'infecter l'organisme de manière systémique (Maisner et al., 1998; Moll et al., 2004). Ce phénomène est observable en cas d'infection de cellules en culture (Fugier-Vivier et al., 1997; Takeuchi et al., 2003) mais aussi lors d'infections en conditions physiologiques (McChesney et al., 1997), notamment dans les organes lymphoïdes de patients atteints de rougeole.

II.3 Interactions cellule hôte-virus de la rougeole

II.3.1 Les Récepteurs cellulaires du VR

Trois récepteurs cellulaires du virus de la rougeole sont connus à ce jour. Le premier récepteur du VR à avoir été identifié est la molécule CD46, découverte au début des années quatre-vingt-dix dans mon équipe d'accueil, alors dirigée par le Pr. Chantal Rabourdin-Combe (Naniche et al., 1993). En 2000, une équipe japonaise identifie un autre récepteur du VR, la molécule CD150 appelée encore SLAM (signaling lymphocyte activation molecule). Enfin, le dernier récepteur, qui a été identifié en 2011, s'appelle Nectine-4. Nous allons décrire en détail la structure et les différentes fonctions de ces récepteurs dans la cellule.

II.3.1.a Le récepteur CD46

Ce récepteur est utilisé uniquement par les souches atténuées (souches de laboratoire et souches vaccinales). CD46, appelée aussi Membrane Cofactor Protein (MCP) a été initialement connue pour son rôle dans la régulation du complément.

II.3.1.a.i Généralités

La molécule CD46 est une glycoprotéine transmembranaire de type I qui est exprimée à la surface de toutes les cellules nucléées. Le gène qui code pour CD46 est constitué de 14 exons et 13

introns. CD46 appartient à la famille des régulateurs de l'activation du complément (regulatory complement activator) et est impliquée dans la protection des cellules d'une activité autodestructrice du complément. Comme les autres membres de cette famille, elle se caractérise par la présence de motifs de liaison aux fragments du complément (SCR : Short Consensus Repeat), orientés vers l'extérieur de la cellule. Les SCR sont suivis par des régions riches en Sérine, Thréonine et Proline (région STP) (*Figure 17*). Une petite région juxta membranaire, appelée région U, se trouve à côté de la région STP, puis on retrouve la région transmembranaire et la queue cytoplasmique en C-ter de la protéine. La queue cytoplasmique peut s'exprimer sous la forme de deux isoformes Cyt-1 et Cyt-2 qui résultent d'un épissage alternatif de l'exon 13. L'isoforme Cyt-1 est exprimée quand l'exon 13 est épissé. Il comporte un codon stop qui empêche la traduction de l'exon 14. A l'inverse Cyt-2 est le produit de l'excision de l'exon 13 et la traduction de l'exon 14 (Purcell et al., 1991). Les deux isoformes qui ont des séquences très différentes sont cependant co-exprimées dans les mêmes cellules. En revanche le ratio entre les deux groupes d'isoformes cytoplasmiques varie en fonction des différents types cellulaires (Johnstone et al., 1993).

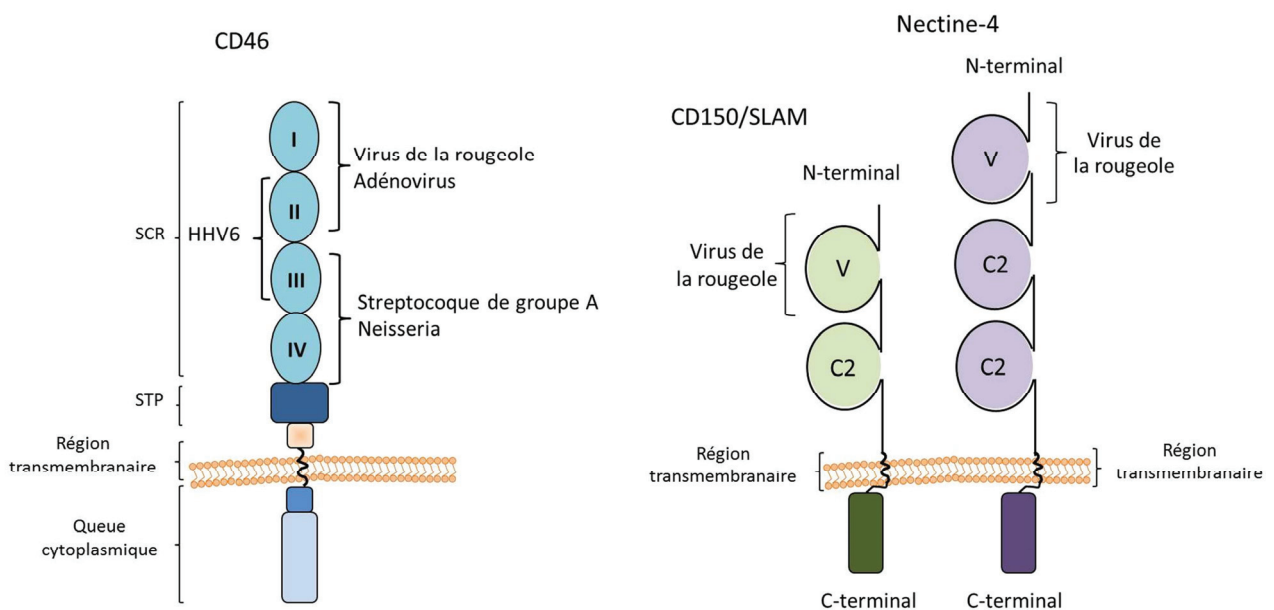


Figure 17 Structure schématique des récepteurs cellulaires du VR.

II.3.1.a.ii Fonctions de CD46 dans la cellule

Un des rôles de CD46 est de réguler négativement le système du complément. Le complément est un acteur majeur dans l'immunité innée car il participe à de nombreux processus visant à combattre les agents pathogènes. Par exemple le système du complément joue un rôle primordial dans la lyse directe, par formation d'un complexe d'attaque membranaire, ou l'opsonisation de pathogènes pour préparer ces derniers à être détruits par les cellules

phagocytaires. De plus, le complément participe aussi à l'initiation de signaux inflammatoires. Cependant des composants de ce système peuvent se lier aux cellules hôtes et ainsi de promouvoir leur destruction. CD46 est capable d'empêcher ce phénomène (Liszewski et al., 1991, 1996).

CD46 joue d'autres rôles dans l'immunité. Ce récepteur facilite la présentation d'antigènes sur les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II, favorisant ainsi une réponse adaptative efficace. Chez des souris transgéniques exprimant CD46 (qui supportent l'entrée du VR), des antigènes peptidiques du VR sont présentés sur les CMH de classe I et II (Gerlier et al., 1994a, 1994b).

Notre laboratoire a démontré que CD46 fonctionne aussi en tant que molécule de costimulation des lymphocytes T CD4⁺ (Astier et al., 2000; Zaffran et al., 2001) et induit notamment leur prolifération et des changements morphologiques. La costimulation par CD46 induit la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T régulateurs de type I (Treg1) (Kemper et al., 2003; Meiffren et al., 2006), qui expriment Granzyme B (Grossman et al., 2004). Ces Treg sont une population de cellules qui sécrètent la cytokine anti-inflammatoire IL-10 en grande quantité et modulent négativement les réponses immunitaires. De manière intéressante, l'engagement du récepteur CD46 sur des lymphocytes T cytotoxiques humaines empêche le recrutement du récepteur CD3 et de la molécule cytotoxique perforine à l'interface avec les cellules présentatrices d'antigène, ce qui réduit la réponse immunitaire (Oliaro et al., 2006). Des observations similaires ont été faites par la même équipe, concernant CD46 exprimé à la surface des cellules NK (natural killer), où l'engagement de CD46 induit également un défaut dans l'engagement de la perforine.

La différenciation en Treg1 dépend également de l'environnement cytokinique. En effet, la stimulation de CD46 sur des cellules T CD4⁺ donne lieu à des Treg1 suppressives en présence d'une grande concentration d'IL-2. A l'inverse si la concentration d'IL-2 est faible une induction d'une réponse Th1 (IFN- γ ⁺/IL-10⁻) est observée (Cardone et al., 2010). Enfin il a été montré que les cellules Treg1 stimulent la production d'anticorps par des lymphocytes B (Fuchs et al., 2009).

Par ailleurs, les deux groupes d'isoformes intracytoplasmiques de CD46 semblent avoir des fonctions différentes dans la régulation des lymphocytes T. En effet dans un modèle murin d'hypersensibilité de contact, notre laboratoire a montré que les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs, qui exacerbent la réponse d'hypersensibilité, et les lymphocytes CD4⁺, qui à l'inverse régulent cette réaction, sont activés de manière différentielle en fonction de la présence de Cyt-2 ou Cyt-1 respectivement (Marie et al., 2002).

En plus du virus de la rougeole, de nombreux autres agents pathogènes très différents utilisent CD46 comme récepteur d'entrée. Ces observations ont valu à cette molécule l'appellation

« aimant à pathogènes » (pathogen magnet) (Cattaneo, 2004). La diversité des agents pathogènes qui utilisent CD46 pourrait s'expliquer en partie par son action immunosuppressive suite à son engagement dont nous venons de discuter.

En plus des souches atténuées du VR, les Adénovirus utilisent également CD46 comme récepteur d'entrée. Les adénovirus sont des virus à ADN non enveloppés qui sont classifiés en six espèces de A à F. Ce sont la plupart des membres des espèces B (Gaggar et al., 2003; Sirena et al., 2004), ainsi qu'un membre de l'espèce D, qui utilisent CD46 comme récepteur d'entrée (Wu et al., 2004). Les Adénovirus et les souches atténuées du VR se lient sur les mêmes zones de CD46, les SCR1 et SCR2 (Figure 17).

CD46 est aussi utilisé par l'herpesvirus humain 6 (HHV6), un virus à ADN enveloppé qui appartient à la famille des *Herpesviridae* (Santoro et al., 1999). De plus, CD46 bovin est utilisé par le virus de la diarrhée bovine virale (BVDV : bovine viral diarrhea virus), un virus à ARN enveloppé, appartenant à la famille *Filoviridae* (Maurer et al., 2004).

Différents types de bactéries peuvent également utiliser CD46 comme récepteur d'entrée, dont certains sérotypes de *Streptococcus pyogenes*, un streptocoque de groupe A (Okada et al., 1995). Enfin, il a été aussi montré que la bactérie *Escherichia coli* uropathogénique lorsqu'elle est opsonisée, est internalisée par CD46 (Li et al., 2006), ce qui suggère que nombre de pathogènes opsonisés peuvent utiliser CD46 afin d'entrer dans une cellule hôte.

L'engagement de CD46 par des anticorps ou par des agents pathogènes peut induire l'autophagie (Joubert et al., 2009). CD46 est relié à la machinerie autophagique par l'isoforme Cyt-1 de la queue cytoplasmique. Son extrémité C-ter interagit avec le domaine PDZ de la protéine d'échafaudage GOPC. Les domaines PDZ sont les domaines d'interaction protéine-protéine les plus répandus chez l'homme et sont très importants pour la transduction de signaux dans de nombreuses voies de signalisation. Ils sont constitués de deux hélices α et six feuillets β . GOPC est capable à son tour d'interagir avec Beclin-1 qui fait partie du complexe d'initiation du processus autophagique. Lorsque CD46 est engagé par un sérotype de streptocoque de groupe A, les bactéries sont par la suite dégradées par autophagie. Ainsi dans ce cas l'autophagie joue un rôle de défense cellulaire (Joubert et al., 2009; Meiffren et al., 2010).

En revanche il n'en est pas de même pour le virus de la rougeole. En effet, des données de l'équipe montrent que la souche atténuée du VR induit une vague très transitoire d'autophagie par la liaison avec le récepteur CD46 lors de la première heure d'infection (Richetta et al., 2013). De manière intéressante, les souches virulentes qui n'utilisent pas le récepteur CD46, n'induisent pas cette vague d'autophagie. Aussi, l'autophagie induite par CD46 pourrait servir à dégrader des composants viraux dès leur entrée dans la cellule, et/ou à induire la sécrétion d'interférons

antiviraux très rapidement suite à l'infection. Le rôle précis de l'autophagie induite par l'engagement de CD46 par le VR n'est pas encore clairement déterminé. Il est à souligner que le VR induit une seconde vague d'autophagie plus tardivement lors de l'infection, ce que nous détaillerons dans le chapitre *Contexte scientifique et objectifs de la thèse*. Mon projet de thèse s'inscrit dans la compréhension des interactions entre le VR et certaines protéines cellulaires, et leur rôle dans l'induction de cette vague « tardive » de l'autophagie.

II.3.1.b Le récepteur CD150/SLAM

Le second récepteur du VR identifié est la molécule CD150/SLAM, appartenant à la famille SLAM (signaling lymphocyte-activation molecule) (Tatsuo et al., 2000). Cette découverte est basée sur l'observation que les souches virulentes n'infectent pas des cellules de rein de singe, alors qu'elles sont capables d'infecter des cellules lymphoblastoïdes de singe, en conservant leur pouvoir infectieux au cours des passages sur ces cellules. Il est à noter que, les souches atténuées sont également capables d'utiliser ce récepteur. Il a par ailleurs été récemment montré que CD150 du rat des cotonniers (*Sigmodon hispidus*) peut aussi permettre l'infection par le VR, bien que de manière légèrement moins efficace que le CD150 humain (Carsillo et al., 2014).

II.3.1.b.i Généralités

CD150/SLAM est un régulateur de l'activité des lymphocytes (Cocks et al., 1995). CD150 fait partie de la famille des protéines SLAM, dans laquelle on retrouve aussi : CD48, CD84, CD229, CD244, CD319 et CD352 (Schwartzberg et al., 2009). CD150/SLAM est exprimé à la surface des thymocytes, des lymphocytes T et B (l'expression est plus forte quand les cellules sont activées), des cellules dendritiques, des plaquettes, des cellules souches hématopoïétiques et des macrophages. Ainsi la distribution du récepteur CD150 correspond bien à la spécificité tissulaire de l'infection par le VR, contrairement à celle de CD46 qui est ubiquitaire.

La protéine CD150/SLAM est aussi une protéine transmembranaire de type I, qui appartient à la superfamille des immunoglobulines (Cocks et al., 1995; Tangye et al., 2000). La partie extracellulaire de la protéine (N-terminale) possède deux domaines immunoglobuline : un domaine variable V se trouvant du côté distal de la cellule et un domaine constant C2 se trouvant du côté proximal de la cellule (*Figure 17*). Le domaine C2 porte deux ponts disulfures qui maintiennent sa structure, tandis que le domaine V n'en porte aucun. CD150 possède un domaine transmembranaire. Sa queue cytoplasmique est constituée de trois domaines appelés « tyrosine-based motifs » qui ont

la séquence consensus TwYxxV/I/A, favorable à la transduction de signaux. L'hémagglutinine du VR se lie sur le domaine V de CD150 (Hashiguchi et al., 2011b).

II.3.1.b.ii Fonctions de CD150/SLAM

SLAM joue un rôle important dans l'activation et la prolifération des lymphocytes T. La signalisation de SLAM se fait suite à une interaction homotypique (Aversa et al., 1997). L'engagement de SLAM active la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ activées, lors de la reconnaissance d'antigène, et la sécrétion d'IFN- γ (Cocks et al., 1995). Aussi il oriente la réponse immune vers une voie Th1. De plus l'engagement de SLAM sur des lymphocytes B activées induit leur prolifération et la sécrétion d'anticorps (Punnonen et al., 1997). L'engagement de SLAM augmente également la cytotoxicité des lymphocytes T activés et induit l'apoptose CD95-dépendante des lymphocytes B (Henning et al., 2001). Il a été aussi récemment montré que la liaison entre SLAM et la protéine SAP (SLAM – Associated Protein, qui est responsable de la cascade de signalisation en aval des récepteurs des lymphocytes T) promeut la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes Th17 qui sécrètent de l'IL-17 (Huang et al., 2014).

CD150 est impliquée dans plusieurs pathologies. L'une d'entre elles est la maladie lymphoproliférative liée à l'X (XLP : X-linked lymphoproliferative disease) qui se traduit par une forte susceptibilité au virus Epstein-Barr (Engel et al., 2003). Par ailleurs, des niveaux surélevés de CD150/SLAM ont été observés dans les macrophages et monocytes au niveau des portions enflammées de l'intestin de patients souffrant de la Maladie de Crohn (Theil et al., 2005). Des données dans la littérature suggèrent aussi une implication de CD150/SLAM dans l'arthrite rhumatoïde (Isomäki et al., 1997) où des lymphocytes T issus du fluide et tissus synoviaux expriment SLAM très fortement. De plus l'engagement par un anti-CD150 de SLAM sur ces cellules de patients donne lieu à une forte sécrétion d'IL-10, IFN- γ et TNF- α , suggérant un changement dans le profil cytokinique.

Chez la souris l'absence de CD150 induit une susceptibilité à l'infection par *Leishmania major* (Wang et al., 2004). En outre CD150 est un récepteur microbien qui peut reconnaître la bactérie *Escherichia coli* dans des phagosomes de macrophages murins et régule l'activité de la NADPH oxydase en recrutant les protéines autophagiques Beclin-1 et VPS34 à la membrane des phagosomes (Berger et al., 2010).

II.3.1.c Le récepteur Nectine-4

Des études *in vitro* et *in vivo* d'infection par le VR ont montré que le virus est capable d'infecter aussi des cellules épithéliales indépendamment de CD46 et de CD150. Ainsi, une des explications les plus plausibles a été l'existence d'un troisième récepteur du VR. En 2011, ce récepteur, appelé Nectine-4 a été simultanément identifié par deux équipes (Mühlebach et al., 2011; Noyce et al., 2011).

II.3.1.c.i Généralités

Nectine-4 est une protéine transmembranaire de 510 aa faisant partie de la famille des PVRL (Polio Virus Receptor-like molecules). Ce sont des récepteurs d'adhésion qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Reymond et al., 2001). Nectine-4 possède un domaine V et deux domaines C (*Figure 17*). C'est le domaine V qui se trouve du côté le plus distal de la cellule et en N-terminal qui interagit avec l'hémagglutinine du VR. Nectine-4 possède également un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique.

Nectine-4 est exprimée à la surface baso-latérale des cellules épithéliales du tractus respiratoire, notamment au sein de la trachée et des poumons (Mühlebach et al., 2011; Reymond et al., 2001). Des recherches dans le cadre du « Human Protein Atlas Project » (www.proteinatlas.org) ont identifié également les cellules glandulaires de l'estomac, les cellules épithéliales des amygdales, de l'œsophage, de la muqueuse orale et du nasopharynx comme exprimant Nectine-4. Les macrophages du poumon et les cellules neuronales du cortex cérébral expriment également Nectine-4, bien que plus faiblement.

II.3.1.c.ii Fonctions de Nectine-4

Nectine-4 ainsi que les autres représentants de la famille des PVRL (Nectine-1, -2 et -3) sont des molécules d'adhésion qui assurent les jonctions adhérentes entre les cellules. Nectine-4 interagit d'abord avec elle-même à la surface de la même cellule (interaction cis) et ensuite elle peut interagir avec Nectine-4 ou Nectine-1 à la surface d'autres cellules (interaction trans). La queue cytoplasmique de Nectine-4 peut se lier à l'afadine qui se lie à l'actine (Meng and Takeichi, 2009; Reymond et al., 2001).

Nectine-4 est exprimée à la surface baso-latérale des cellules épithéliales, ce qui est en accord avec l'observation que le VR ne peut pas infecter les cellules épithéliales par la face apicale. En effet, dans un modèle d'infection chez le macaque, après inhalation du virus de la rougeole exprimant la GFP (green fluorescent protein), des cellules mononuclées GFP⁺ (des cellules infectées)

ont été retrouvées dans la lumière alvéolaire ou bien attachées à la paroi des alvéoles des poumons très tôt après l'infection. En revanche tous les autres tissus, y compris l'épithélium de la trachée s'avéraient GFP⁻ (non infectés) (Lemon et al., 2011; de Vries et al., 2010). Le modèle d'infection *in vivo* actuellement établi est que le virus est transporté dans les voies respiratoires après inhalation d'aérosols jusqu'au lumen alvéolaire où il peut infecter les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques, puis il est transporté dans les ganglions lymphatiques et la virémie systémique se met en place. L'autre possibilité est que le virus infecte les cellules dendritiques dont les dendrites se projettent au-delà de la surface de l'épithélium muco-siliaire au niveau de la trachée. Comme dans le cas précédent, le virus est ensuite transporté au niveau des ganglions lymphatiques, et par la suite dans tout le corps. Enfin, le virus infecte les cellules épithéliales, des voies respiratoires notamment, par le côté baso-latéral et se propage vers d'autres hôtes *via* la toux et les éternuements. Ainsi Nectine-4 est un récepteur cellulaire du VR nécessaire à la transmission d'un individu à l'autre en permettant la sortie du virus par la voie pulmonaire.

D'autres virus utilisent aussi les protéines Nectines ou Nectine-like comme récepteur d'entrée. Par exemple le virus de la polio utilise la protéine Nectine-like 5 (Mendelsohn et al., 1989) alors que le virus de l'herpès simplex 1 (HSV-1) utilise Nectine-1 et Nectine-2 comme récepteur d'entrée (Geraghty et al., 1998; Lopez et al., 2000).

II.3.2 Rôle des protéines non-structurales lors de l'infection par le VR

Le génome du virus de la rougeole code pour deux protéines qui s'appellent V et C. Elles sont codées par le gène qui code pour la phosphoprotéine P. Elles ne se trouvent pas dans le virion, ce qui les caractérise comme étant des protéines non-structurales. Cependant elles sont particulièrement importantes pour le cycle infectieux, car elles sont des facteurs de virulence *in vivo*, comme nous allons le voir par la suite.

La transcription de la protéine V démarre au même codon initiateur que celle de la protéine P. Cependant, ce cadre de lecture principal est décalé par l'ajout d'une guanosine, dans un processus qui s'appelle « édition de l'ARNm » (mRNA editing). Un codon stop dans ce nouveau cadre de lecture met fin à la transcription. Ainsi la protéine V, plus petite que la phosphoprotéine P, partage les 231 mêmes premiers acides aminés, suite à quoi il y a une séquence de 68 acides aminés en C-terminal qui n'ont aucune homologie avec P. Ce domaine en C-terminale porte beaucoup de résidus cystéine et peut lier le zinc (Cattaneo et al., 1989; Liston and Briedis, 1994).

La protéine C est quant à elle une petite protéine de 186 aa. Son cadre de lecture commence 22 nucléotides après celui de P et V, et par conséquent elle ne partage aucune homologie de séquence avec ces deux protéines (Bellini et al., 1985).

La présence de ces deux protéines et les manières dont elles sont codées est un bon exemple des mécanismes que les virus emploient pour coder un relativement grand nombre de protéines dans un petit génome.

II.3.2.a Rôle de la protéine V dans l'infection par le VR

Comme évoqué plus haut la protéine V participe à la virulence du VR, assurant ainsi une multiplication efficace. Des virus mutants possédant des mutations dans la région « d'édition » de P qui entraînent l'absence de V ou au contraire sa surproduction se multiplient dans de lignées cellulaires, démontrant le fait que V n'est pas indispensable pour la production virale (Schneider et al., 1997). En revanche, dans un modèle de souris SCID, greffées avec implants de thymus et foie humains, l'infection avec un VR déficient pour V a donné lieu à une multiplication virale retardée mais prolongée et à des titres viraux faibles. Un virus surexprimant V s'est multiplié plus rapidement et avec des titres très supérieurs au virus contrôle dans des cellules Vero (Valsamakis et al., 1998). Enfin, la réplication d'un virus déficient pour la protéine V ou C est fortement atténuée chez le macaque (Devaux et al., 2008). Ainsi l'expression de V favorise une multiplication virale efficace, qui peut s'expliquer par les différents effets que la protéine V exerce sur la cellule. En outre, la protéine V aurait un effet anti-apoptotique, puisque l'infection par un virus déficient pour cette protéine induit davantage la mort cellulaire comparé au virus sauvage (Toth et al., 2009).

II.3.2.a.i Inhibition de la réponse IFN-I

Un des rôles principaux des protéines V des virus appartenant à la famille *Paramyxoviridae*, est l'inhibition de la réponse IFN-I. Elles sont capables de bloquer la synthèse d'IFN-I de plusieurs manières, en ciblant différentes molécules qui participent aux cascades de signalisation pour l'induction d'IFN-I, tels que MDA-5 (melanoma differentiation associated factor 5), RIG-I (retinoic acid inducible gene I), IRF-3 (IFN-regulatory factor 3) ou encore STAT1 et STAT2 (signal transducers and activators of transcription). Brièvement, l'ARN viral peut être reconnu par les TLR3/7/8 et par les protéines cytosoliques MDA-5, RIG-I et LGP2 (*Figure 18*). Ces récepteurs enclenchent une série d'événements de signalisation qui résulte en la transcription d'IFN- β entre autres.

Concernant le virus de la rougeole, V est capable par exemple de se lier à STAT2, ce qui empêche sa phosphorylation et sa translocation vers le noyau (Palosaari et al., 2003) (*Figure 18*). V est aussi capable de se lier directement à MDA-5 (Childs et al., 2007; Nakatsu et al., 2008). Elle peut également empêcher la signalisation de RIG-I et MDA-5 en se liant à la phosphatase PP1, ce qui inhibe leur déphosphorylation et par conséquent la signalisation MAVS-dépendante et l'activation

d'IRF-3 (Davis et al., 2014; Wies et al., 2013). La protéine V inhibe également la signalisation de RIG-I en se liant à l'hélicase LGP2 (Laboratory of genetics and physiology 2), pour créer un complexe avec RIG-I et empêcher sa cascade de signalisation par un mécanisme pas encore clairement défini (Childs et al., 2012). Enfin, elle est capable de lier IRF-3 et d'empêcher son activation. (Irie et al., 2012).

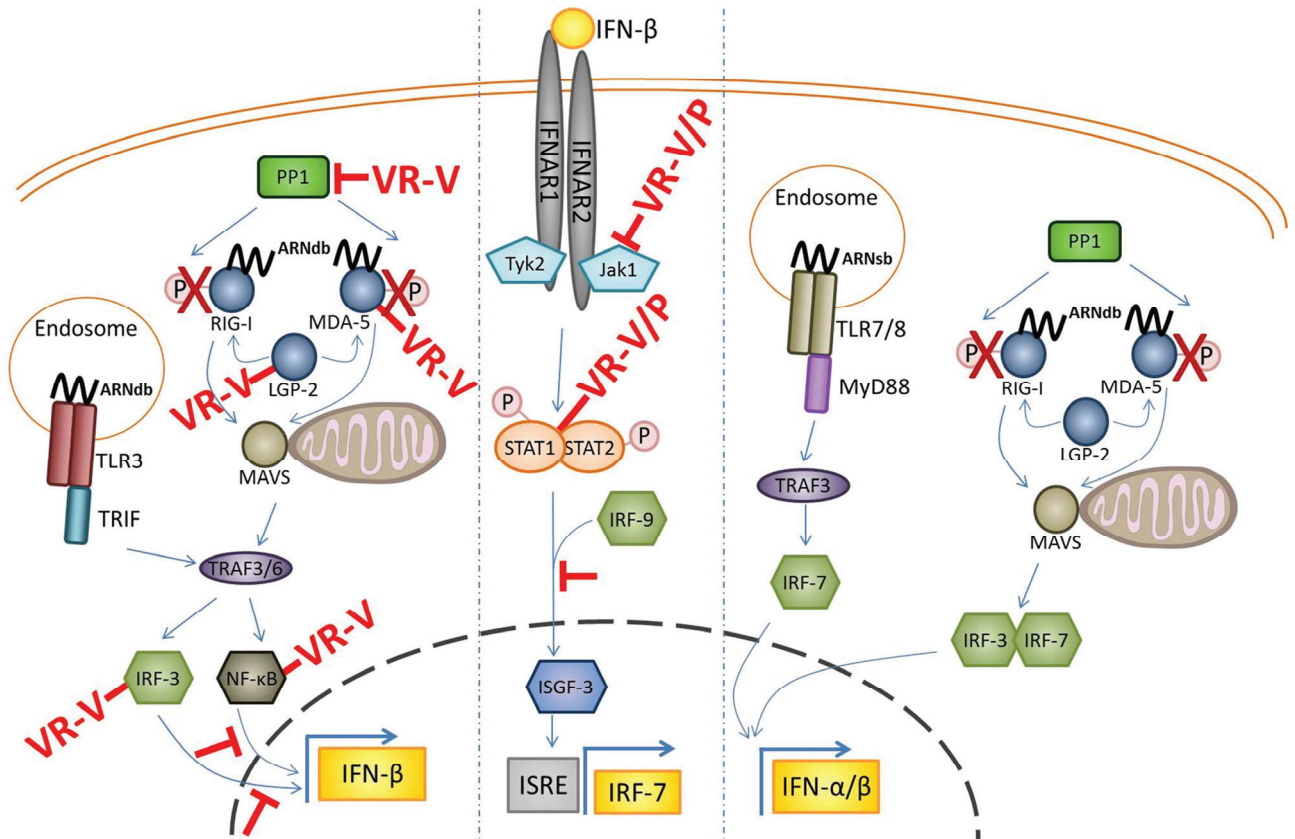


Figure 18 : Schéma simplifié de l'induction de la réponse IFN-I et le rôle antagoniste de protéines du VR

II.3.2.a.ii Autres fonctions de la protéine V

La protéine V inhibe la voie NF-κB qui est un acteur majeur dans les réponses antivirales, l'inflammation, le développement des cellules immunitaires, leur fonction et leur survie (Hayden et al., 2006). Ainsi ce facteur de transcription apparaît comme une cible intéressante pour les virus d'un point de vue stratégique. En effet il a été montré que la protéine V du VR se lie à la sous-unité p65, appelée encore RelA (Schuhmann et al., 2011). De manière intéressante V lie p65 par son domaine en C-ter constitué des 68 aa qui n'ont pas d'homologie de séquence avec la phosphoprotéine P. Ce domaine est également responsable de l'interaction de V avec STAT2, IRF-7 et MDA-5.

La protéine V inhibe aussi l'inflammasome. Son expression lors de l'infection par VR diminue la production d'IL-1β par interaction avec l'inflammasome NLRP3. A l'inverse, l'infection par un virus de la rougeole déficient pour V induit une plus forte production d'IL-1β (Komune et al., 2011).

La protéine V est également responsable de la diminution de la synthèse d'ARN messagers viraux. En effet l'infection avec un virus déficient pour la protéine V donne lieu à une accumulation d'ARNm ainsi que de protéines virales. Inversement, un virus qui surexprime V diminue drastiquement l'expression des gènes viraux (Tober et al., 1998). Cette activité régulatrice ne semble pas être le résultat d'une interaction protéique entre V et la nucléoprotéine N comme initialement suggéré (Witko et al., 2006). Cependant, il semble probable que ce contrôle de l'expression de gènes viraux est important pour une multiplication virale optimale car un déséquilibre entre la synthèse de protéines virales et la réplication du génome viral nuirait à l'assemblage et à la dissémination du virus.

Enfin il a été montré que V interagit avec p53 et p73, impliquées dans l'homéostasie cellulaire, la mort par apoptose et le développement de tumeurs. En outre, l'interaction de V avec p73 inhibe son activité transcriptionnelle et par conséquent inhibe l'expression du facteur pro-apoptotique PUMA (Cruz et al., 2006). Ce résultat, en concert avec l'observation qu'un virus déficient pour la protéine V a un effet cytopathique plus prononcé que le virus sauvage, indiquent que la protéine V serait un inhibiteur de la mortalité cellulaire.

II.3.2.b Rôle de la protéine C dans l'infection par le VR

La protéine C du virus de la rougeole est aussi un facteur de virulence. En effet elle n'est pas nécessaire pour la multiplication du virus dans des lignées cellulaires, comme le montrent les expériences faites avec un virus déficient pour cette protéine (VRΔC) (Radecke and Billeter, 1996). Cependant, dans des cellules primaires humaines et plus précisément des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), VRΔC se multiplie nettement moins bien, tandis que l'efficacité de multiplication du VRΔC dans les cellules Vero est comparable à celle du virus sauvage (Escoffier et al., 1999). Ceci indique que la protéine C est tout de même importante pour la multiplication virale dans les PBMC, qui sont des cibles privilégiées de l'infection par le VR.

II.3.2.b.i Inhibition de la réponse IFN-I

Comme la protéine V, la protéine C du VR semblerait inhiber aussi la synthèse d'IFN-I. Cependant, ces données sont bien plus contradictoires que celles concernant la protéine V. L'infection de PBMC ou de cellules HeLa avec VRΔC induit des titres viraux bien inférieurs à ceux obtenus avec un virus contrôle. De plus l'utilisation d'anticorps neutralisants l'IFN α/β restaure un phénotype proche de celui obtenu avec le virus contrôle (Shaffer et al., 2003), illustrant l'importance de l'inhibition de la réponse IFN pour la multiplication virale. L'inhibition de la réponse IFN-I par la

protéine C a été également montrée par des expériences d'infection avec VRΔC au moyen d'une lignée cellulaire humaine qui possède un système de synthèse d'IFN-I pleinement fonctionnel (Nakatsu et al., 2006). Dans la lignée compétente pour la synthèse d'IFN-I, le virus VRΔC se multipliait beaucoup moins bien. Cette baisse a été associée à une augmentation de la production d'IFN-I d'une part, mais aussi à une baisse de la traduction de protéines virales et de la réplication du génome, d'autre part. Les diminutions de la traduction et de la réplication ont été accompagnées de la phosphorylation du facteur eIF2 α (alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2). Cependant, dans une étude ultérieure, les auteurs concluent que la protéine C n'inhibe pas directement la réponse IFN-I mais agit plutôt comme un régulateur de la synthèse d'ARN viral (Nakatsu et al., 2008). De plus, en l'absence de la protéine C, des ARN viraux double brin s'accumulent dans la cellule, ce qui induit l'activation de la PKR kinase, entraînant une réponse de stress, notamment l'arrêt de la traduction de protéines qui dépend de eIF2 α (Pfaller et al., 2014). Ainsi, la protéine C agirait comme régulatrice de la synthèse de substrats qui induisent une réponse IFN-I. Elle agirait donc en concert avec la protéine V qui elle a la capacité d'inhiber directement la réponse IFN-I. Les deux protéines sont donc importantes pour contourner le système immunitaire.

En revanche, dans les stades précoces de l'infection, la protéine C augmente la transcription d'ARNm car davantage de transcrits sont détectés lors de l'infection avec le virus sauvage qu'avec le virus VRΔC (Nishie and Nagata, 2015). De plus, en absence de la protéine C, une plus grande quantité de nucléoprotéine N interagit avec l'ARN viral. Ainsi, C pourrait avoir un rôle dans la régulation de la formation de la capsid virale grâce à son interaction avec celle-ci. C aurait aussi un rôle dans la synthèse de l'ARN viral à des moments précoces de l'infection. Aussi, le rôle de C dans le contrôle de la réponse IFN-I reste encore à être compris.

II.3.2.b.ii La protéine C et la mort cellulaire

Il a été montré que le virus VRΔC induit plus fortement la mort cellulaire que le virus sauvage (Takeuchi et al., 2005). Cette observation a été confirmée par d'autres travaux où l'infection par un virus déficient pour la protéine C ou la protéine V induit davantage la mort cellulaire (Toth et al., 2009). Dans cette étude le virus VRΔC présentait aussi un défaut de multiplication. Ce défaut s'explique par une activité exacerbée de la PKR kinase. En effet, l'infection de cellules qui ont une faible expression de PKR restaure la croissance du virus VRΔC. La diminution de l'expression de PKR induit moins de mort cellulaire que ce soit avec le VRΔC, le virus qui n'exprime pas la protéine V ou le virus sauvage. Cependant dans le cas du VRΔC la multiplication virale est toujours moins efficace bien

que l'apoptose soit réduite. Ainsi, la protéine C jouerait un rôle anti-apoptotique, permettant aux cellules infectées de produire davantage de virions infectieux.

II.3.2.b.iii La protéine C induit l'autophagie

Des études récentes conduites au sein de mon équipe ont démontré un rôle de la protéine C dans l'induction de l'autophagie. En effet le VR induit une seconde vague d'autophagie (indépendamment de la première, décrite dans le paragraphe II.3.1.a.ii et qui dépend du récepteur CD46). Le VRΔC est quant à lui incapable d'induire cette vague d'autophagie (Grégoire et al., 2011; Richetta et al., 2013). Dans ces travaux un partenaire cellulaire de la protéine C a été mis en avant. Il s'agit de la protéine IRGM (Immunity-related GTPase family M protein). L'inhibition de l'expression d'IRGM conduit à une baisse de la réplication du VR. En outre, l'inhibition de l'autophagie conduit aussi à une baisse de la réplication virale. Ainsi, l'équipe a émis l'hypothèse que l'interaction entre VR-C et IRGM induit l'autophagie grâce aux interactions d'IRGM avec des protéines autophagiques (ATG5, ATG10, Bif-1, LC3C), décrites par l'équipe (Grégoire et al., 2011). Une partie initiale de mon travail de thèse a consisté en l'étude du rôle moléculaire d'IRGM dans l'infection par le VR et dans l'induction de l'autophagie (cf chapitre **Error! Reference source not found.**).

II.3.3 La formation de syncytia induit l'autophagie

Nous avons déjà évoqué que lors de l'infection par le VR, l'un des mécanismes de propagation virale est la formation de cellules géantes multinucléées, appelées syncytia. Leur formation est due à l'expression des protéines virales H et F à la surface de la cellule infectée et sa fusion avec des cellules voisines infectées ou non. Notre équipe a montré que l'autophagie est induite dans les syncytia (Richetta et al., 2013). Ces travaux montrent de plus que l'autophagie induite dans les syncytia ne dépend pas de la cascade de signalisation de CD46 (impliquant la protéine d'échafaudage GOPC). De plus l'infection par une souche virulente utilisant uniquement CD150 comme récepteur d'entrée (dont l'engagement n'induit pas l'autophagie), résulte aussi en la formation de syncytia dans lesquelles le flux autophagique est induit. Enfin, la surexpression de H et F à la surface d'une cellule non infectée permet la formation de syncytia et l'induction de l'autophagie. Ces observations suggèrent que l'autophagie induite dans les syncytia pourrait résulter des réarrangements membranaires qui s'opèrent lors de la fusion entre deux cellules. Une augmentation du taux d'autophagie a également été décrite dans des syncytia formés lors d'infection par le VIH-1. En effet les protéines virales Env (gp41 et gp120) exprimées à la surface d'un lymphocyte T CD4+ infecté est capable d'induire l'autophagie suite à l'interaction avec les récepteurs

CD4+ et CXCR4 d'un lymphocyte T non infecté (Espert et al., 2006). De plus, cette induction requiert l'activité fusogénique de gp41 (Denizot et al., 2008).

Il a été aussi proposé que l'autophagie promeut la formation de syncytia lors de l'infection par des *Morbillivirus* puisque la fusion entre des cellules infectées avec des cellules saines mais incapables de faire de l'autophagie conduit à une formation diminuée de syncytia (Delpeut et al., 2012). De la même manière les données de notre équipe montrent que lors de l'infection avec un VR déficient pour la protéine C, et donc incapable d'induire l'autophagie par cette voie, donne lieu à moins de syncytia qui et de taille plus petite comparé au virus sauvage.

Ainsi il existe un lien très étroit entre l'autophagie et la formation de syncytia. Dans le cas de l'infection par le VR, l'autophagie induite par la protéine C semble être soutenue mais aussi facilitée par la formation des syncytia d'après les données de l'équipe (Richetta et al., 2013).

B. Résultats

I Contexte scientifique et objectifs de la thèse

L'équipe étudie les interactions entre différents pathogènes et l'autophagie et les conséquences fonctionnelles qui en découlent. En particulier, elle s'intéresse aux interactions entre les constituants du virus de la rougeole et les facteurs autophagiques et aux conséquences de ces interactions sur, d'une part le statut autophagique des cellules infectées, et d'autre part sur le cycle du virus.

Nous avons déjà évoqué que la souche atténuée du virus de la rougeole (VR) est capable d'induire l'autophagie en utilisant trois mécanismes distincts mais complémentaires. Tout d'abord l'engagement du récepteur CD46 par l'hémagglutinine des souches atténuées induit l'autophagie. Suite à cet engagement, l'isoforme CD46-Cyt-1 recrute la protéine d'échafaudage GOPC qui à son tour est capable d'interagir avec le complexe d'initiation de l'autophagie (Joubert et al., 2009; Meiffren et al., 2010). Cette induction survient très tôt dans l'infection et est transitoire. En effet des données récentes de l'équipe ont décrit cette induction comme une « première vague » d'autophagie dont l'activité revient à un niveau basal au bout de 3h post infection (Richetta et al., 2013). Ce retour de l'activité autophagique au niveau basal serait lié à l'internalisation des récepteurs CD46 après l'engagement, plutôt qu'à un processus actif d'inhibition de l'autophagie. De manière intéressante, les souches sauvages sont incapables de lier CD46 et sont incapables d'induire cette première vague. Cette caractéristique pourrait contribuer au caractère atténué des souches capables d'induire l'autophagie CD46-dépendante. Une hypothèse intéressante serait que l'autophagie CD46-dépendante aurait un rôle dans la présentation antigénique. En effet il a été montré que, chez les souris transgéniques pour CD46, cette molécule facilite la présentation de peptides issus du VR sur le CMH-II et active des lymphocytes T CD4+ spécifiques efficacement (les souris n'expriment pas CD46 de manière naturelle) (Rivailler et al., 1998). Tout comme les souches atténuées, les souches sauvages induisent chez l'homme une réponse immunitaire permettant d'éliminer le virus et de protéger l'organisme à vie. Cependant, il est possible que les souches atténuées induisent une réponse supplémentaire par rapport aux souches sauvages, due à une efficacité de présentation d'antigènes augmentée.

L'équipe a également montré qu'après le retour à l'état basal, une seconde vague d'autophagie est induite à partir de 9h post infection et perdure dans le temps (Richetta et al., 2013). Cette induction d'autophagie est indépendante de la protéine GOPC, en revanche elle est ATG5-dépendante, suggérant un mécanisme d'induction classique. De plus cette vague d'autophagie est également induite par les souches virulentes. Au cours de l'infection, le virus de la rougeole interagit avec IRGM par le biais de la protéine non structurale C (cf paragraphe I.4.1.e) (Grégoire et al., 2011),

ce qui concourt à l'induction de la seconde vague d'autophagie (Richetta et al., 2013). Un virus incapable de se répliquer ou un virus déficient pour la protéine C ne sont pas capables d'induire l'autophagie (Richetta et al., 2013). En outre, au cours de l'infection, l'autophagie permet au virus de se répliquer avec une meilleure efficacité, ce qui suggère que le virus de la rougeole a élaboré un mécanisme de détournement de l'autophagie. De façon intéressante IRGM a le potentiel d'interagir également avec plusieurs protéines régulatrices de l'autophagie : ATG5, ATG10, Bif-1 et LC3C (Grégoire et al., 2011). Ces interactions pourraient contribuer à l'induction de l'autophagie dépendante d'IRGM.

Enfin l'équipe a montré que la formation de syncytia, suite à l'infection par le VR induit l'autophagie indépendamment de la protéine C (Richetta et al., 2013). En effet la surexpression des protéines d'enveloppe du VR conduit à la formation de syncytia par le biais de la liaison avec CD46 mais aussi avec CD150 et suffit à induire l'autophagie, indépendamment de la protéine GOPC également. En revanche, l'inhibition de la fusion entre les membranes cellulaires limite l'induction de l'autophagie. Ceci indique que la formation de syncytia induit l'autophagie *via* les réarrangements qui résultent de la fusion de membranes. De façon intéressante la mise en co-culture de cellules infectées compétentes pour l'autophagie avec des cellules non infectées et incapables de faire de l'autophagie diminue la formation des syncytia (Delpeut et al., 2012). Ces données suggèrent une boucle de contrôle positif de l'induction de l'autophagie par la formation de syncytia, qui serait exploitée par le virus, afin d'optimiser sa réplication. En effet, l'inhibition de l'autophagie diminue la viabilité des syncytia induits par le VR, et par conséquent la réplication de ce virus.

Une partie initiale de mon travail de thèse a concerné l'étude de la régulation moléculaire de l'autophagie par IRGM lors de l'infection par le virus de la rougeole. Ces travaux ont été ralentis par des difficultés expérimentales et la concurrence internationale. Cependant l'étude de la régulation moléculaire de l'autophagie par IRGM reste essentielle pour la compréhension du cycle viral du VR.

Par ailleurs, suite aux difficultés qui ont compromis l'avancement du projet IRGM, je me suis pleinement investie dans une autre étude à laquelle nous nous intéressons en parallèle. Une étude du laboratoire à laquelle j'ai participé a identifié un nouvel rôle pour le récepteur autophagique NDP52 impliqué dans la xénophagie : en plus de sa fonction de récepteur, NDP52 fonctionne comme régulateur de la maturation des autophagosomes contenant des bactéries (Verlhac et al., 2015, Annexe 1). En outre, le ciblage des bactéries vers les autophagosomes et la maturation dépendent de deux domaines distincts de NDP52. Ainsi la protéine NDP52 agit à deux niveaux. Premièrement elle détecte la bactérie et la relie à la machinerie autophagique grâce à son interaction avec LC3C. Deuxièmement, NDP52 favorise la dégradation de ces bactéries en assurant une maturation efficace des autophagosomes qui les séquestrent.

M'étant posée la question du(es) rôle(s) du facteur NDP52 dans un autre contexte xénophagique, à savoir, l'infection par le virus de la rougeole, je me suis également intéressée au facteur T6BP qui lui est apparenté, et plus généralement, aux récepteurs autophagiques au sens large car le rôle de ces récepteurs autophagiques lors de l'infection par le virus de la rougeole n'était pas documenté.

Ainsi, j'ai travaillé sur les récepteurs autophagiques T6BP, NDP52, Optineurine et p62 avec pour objectif de déterminer leur rôles respectifs lors de l'infection par le virus de la rougeole, analyser si l'autophagie contribue à ce rôle, examiner l'influence possible des récepteurs sur la maturation des autophagosomes et l'influence de cette dernière sur la réplication du virus. Nous avons aussi utilisé ce modèle d'infection virale pour essayer de mieux comprendre la régulation de l'autophagie basale.

II Manuscrit

(En préparation)

La (macro)autophagie est un processus de dégradation lysosomale qui assure l'homéostasie cellulaire. Elle est aussi un acteur important dans l'immunité puisqu'elle participe à la régulation des réponses innées et adaptatives d'une part, mais aussi car elle permet l'élimination d'agents pathogènes intracellulaires tels que des bactéries d'autre part. Les infections virales sont également capables d'induire une réponse autophagique, cependant de nombreux virus ont développé des stratégies d'échappement, voire de détournement de cette voie. Parmi ces virus nous retrouvons le virus de la rougeole. Ce virus enveloppé à ARN simple brin de polarité négative est extrêmement contagieux et emploie plusieurs mécanismes qui perturbent différentes fonctions cellulaires.

Les données de l'équipe indiquent que ce virus est capable d'induire l'autophagie par plusieurs voies différentes. De plus il induit un flux complet (depuis les étapes initiales jusqu'à la dégradation). Enfin, de manière contre-intuitive, cette autophagie est bénéfique pour le virus car elle lui permet de se répliquer plus efficacement.

L'équipe a récemment publié que les récepteurs autophagiques NDP52 et Optineurine sont impliqués dans la maturation des autophagosomes. Ces protéines ont initialement été décrites comme capables de reconnaître des bactéries intracellulaires et de contrôler leur prolifération en les ciblant vers une dégradation autophagique. L'observation que le virus de la rougeole requiert un flux autophagique complet pour sa réplication nous a poussés à investiguer le rôle de ces récepteurs dans la réplication virale. Nous avons également inclus dans notre étude le paralogue de NDP52, le récepteur T6BP.

J'ai ainsi pu mettre en évidence un rôle différentiel de ces trois protéines dans la réplication virale. En effet j'ai montré pour la première fois que T6BP est également impliquée dans la maturation des autophagosomes, tout comme NDP52 et Optineurine. Cependant uniquement T6BP et NDP52 mais pas Optineurine sont nécessaires à la réplication du virus, d'après mes résultats. De manière intéressante ce rôle dans la réplication virale s'effectue bien au travers de la régulation de la maturation par T6BP et NDP52. En outre, j'ai montré que le blocage de la maturation avec deux drogues différentes en concert avec l'inhibition de l'expression soit de T6BP, soit de NDP52, inhibe encore plus fortement la réplication du virus de la rougeole. De plus, l'inhibition simultanée de l'expression de ces deux protéines empêche davantage la production de particules virales comparé

au cas où l'expression de seulement une de ces protéines est inhibée. Ainsi mes données suggèrent d'une part que ces protéines régulatrices seraient responsables de la maturation d'autophagosomes différents. D'autre part, le virus de la rougeole serait à même de « reconnaître » ces autophagosomes et exploiterait les autophagosomes dont la maturation dépend de T6BP et/ou NDP52 pour se répliquer. En outre, nous avons montré que T6BP et NDP52 interagissent avec des protéines du VR. Ainsi, le virus de la rougeole pourrait reconnaître les autophagosomes dont la maturation dépend de T6BP et NDP52 grâce à ces interactions.

Nos travaux ont permis de mieux appréhender la régulation de l'autophagie et d'identifier un nouvel acteur de la maturation. En outre, nous avons approfondi les connaissances concernant les interactions entre le virus de la rougeole et la machinerie autophagique, ainsi que de la régulation de l'autophagie en contexte infectieux.

Distinct contribution of autophagy receptors in MeV replication

Denitsa S. Petkova^{1,2,3,4,5}, Pauline Verlhac^{1,2,3,4,5}, Joël Baguet^{1,2,3,4,5}, Aurore Rozières^{1,2,3,4,5}, Carole Kretz-Rémy, Renaud Mahieux^{1,2,3,4,5}, Christophe Viret^{1,2,3,4,5} and Mathias Faure^{1,2,3,4,5,7*}

¹ CIRI, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, Lyon, France.

² Inserm, U1111, Lyon, France.

³ CNRS, UMR5308, Lyon, France.

⁴ Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France.

⁵ Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France.

⁶ CGphiMC, CNRS UMR 5534, Claude Bernard University Lyon 1, Villeurbanne, France

⁷ Institut Universitaire de France.

* Correspondence: mathias.faure@inserm.fr, CIRI, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, ENL-L, UCBL1 - 21, Avenue Tony Garnier 69365 Lyon Cedex 07, France. Phone: +33 4 37 28 23 42. Fax: +33 4 37 28 23 41.

RUNNING TITLE : Individual autophagosome maturation for MeV replication

ABSTRACT

Autophagy is a potent cell autonomous defense mechanism to fight intracellular pathogens through the lysosomal pathway. Several autophagy receptors can recognize invading pathogens in order to target them towards autophagy for their degradation after fusion of pathogen-containing autophagosomes with lysosomes. However, numerous intracellular pathogens can avoid or exploit autophagy, among which measles virus. This virus induces a complete autophagy flux, which is required to improve viral replication. We therefore asked how measles virus interferes with autophagy receptors in the course of infection. We report that in addition to NDP52 and OPTINEURIN, a third autophagy receptor, T6BP, is also independently involved in the maturation of autophagosomes by promoting their fusion with lysosomes. However, surprisingly, only two of these receptors impacted measles virus replication, although independently, and possibly through physical interaction with MeV proteins. Thus, unexpectedly our results suggest that only certain autophagosomes are selectively exploited by MeV to replicate in the course of infection.

INTRODUCTION

To maintain their integrity cells are equipped with autophagy, a lysosomal-related catabolic process, which allows degradation of deleterious cytoplasmic components [1]. Macroautophagy, thereafter referred to as autophagy, is particularly efficient in this function as this form of autophagy is the only one that permits the recycling of very large portions of the cytoplasm after their sequestration within *de novo* forming autophagosomal vesicles. Thus, among intracellular substrates, autophagosomes can surround invading intracellular pathogens, to target them to the lysosomal pathway; the degradation of pathogens through the autophagy pathway is known as xenophagy [2]. However, most infectious pathogens have evolved strategies to escape autophagy or even to use certain properties of this cellular mechanism to optimize their intracellular life cycle, such as measles virus (MeV) [3, 4].

MeV, which is responsible for Measles, is among the most contagious human pathogens [5]. This virus first affects the respiratory tract before disseminating within the whole body. Among Measles clinical symptoms are fever, cough and generalized maculopapular rash. Moreover, one to two weeks after MeV infection a profound immunosuppression state is established which, although transient, can lead to the establishment of secondary opportunistic infections responsible for most of MeV infection-induced complications [6]. Despite the existence of an efficient vaccine, MeV is still responsible for an important mortality worldwide, especially in developing countries, and recent outbreaks highlighted the importance to better understand how the virus deals with the human host cell to establish productive infection [5].

MeV is an enveloped virus with a negative-stranded RNA genome [7]. After entering within a cell, 8 viral proteins are encoded, 6 structural which ensure viral genome replication and new particles formation (MeV-N, MeV-P, MeV-L, MeV-M and MeV-H and MeV-F), and 2 non-structural proteins, which counteract or hijack cellular pathways to optimize intracellular replication (MeV-V and MeV-C). Replication and virus assembly take place within the cytosol, and newly formed infectious particles bud from the plasma membrane before secondary infections. Eventually, infected cells can fuse with uninfected cells to form syncytia, allowing the virus to spread from one cell to another without virus exposition outside of infected cells.

Our group reported that upon infection, MeV can induce autophagy through three independent pathways [3, 4, 8-10]. First, the engagement of CD46, one of the MeV cell surface receptors of MeV, induces autophagy upon virus entry [9]: this pathway only concerns attenuated/vaccinal strains of MeV, which use CD46 to infect cells [4, 11]. Few hours post infection, a second signaling pathway leads to autophagy following the expression of MeV-C and its interaction with the autophagy-regulating protein IRGM [3]. Finally, cell-cell fusion can also lead to autophagy contributing to sustain both infected-syncytia viability and MeV replication [4]. Thus, MeV has a very intricate relationship with autophagy and benefits from this process, only if completed, in order to efficiently produce new infectious particles. It remains however obscure how MeV escapes from autophagy degradation, especially in regards to its putative detection by autophagy receptors, whose function is to target pathogens to the autophagy machinery for degradation.

Autophagy receptors have the ability to bind intracellular pathogens or components of these pathogens on one hand and growing phagophores on the other, which are the initial membrane of autophagosomes. To this end, autophagy receptors contain in their primary sequence LC3 interacting regions (LIR) to bind a member of the ATG8 family (LC3 and GABARAP family members in mammals), which are essential factors anchored to the membrane of phagophores in order to drive autophagosome formation [12]. Among autophagy receptors NDP52, OPTN and T6BP were recently concomitantly associated with the biogenesis of phagophores and with the fusion of autophagosomes with lysosomes, a process referred to as autophagosome maturation [13]: we indeed reported that NDP52 and OPTN can ensure by themselves the maturation of autophagosomes [14, 15]. Thus, during xenophagy NDP52 and OPTN can play a dual function: the one of autophagy receptors to target pathogens to autophagy, and the one of autophagy adaptors to regulate autophagosome-lysosome fusion in order to degrade entrapped pathogens. Other autophagy receptors could play such a dual role, especially T6BP [16].

The role and regulation of autophagosome maturation during infections remains poorly understood. Moreover, although the role of autophagy receptors has been widely studied in the context of bacterial infection, little is known on their functions upon viral infections. Since a complete autophagy flux is necessary for efficient MeV replication, we

investigated the question of the requirement of autophagy receptors in autophagosome maturation and Measles virus replication.

RESULTS

T6BP promotes autophagosome maturation

We recently reported that NDP52 and OPTN can regulate the maturation of autophagosomes, which can contribute to control intracellular bacterial growth [14]. Since T6BP, together with NDP52 and OPTN, was proposed to contribute to autophagosome biogenesis and autophagosome maturation and was recently shown to contribute to the efficient autophagy-mediated clearance of bacteria [13, 16], we started by asking for a potential individual role of T6BP in autophagosome maturation. To this end, we first used GFP-LC3-HeLa cells allowing for the quantification of autophagosomes by confocal microscopy through the visualization of GFP+ dots [17]. Interestingly, we found that the reduced expression of T6BP using specific short interfering (si)RNA (Fig. 1A) led to an increased number of GFP+ dots (Fig. 1B). These structures were indeed autophagosomes since their accumulation was prevented by the concomitant reduction of expression of the autophagy essential protein ATG5 (Fig. 1A and 1B).

An increased number of autophagosomes can either result from an induction of *de novo* autophagosome formation, or from the prevention of the recycling of autophagosomes due to a block of the fusion between autophagosomes and lysosomes. To determine the role of T6BP in the autophagy flux, we used mRFP-GFP-LC3-HeLa cells. In these cells, the mRFP-GFP-LC3 probe allows indeed for the discrimination between autophagosomes, which express both fluorochromes GFP and RFP and are therefore detected as yellow dots by confocal microscopy, and autolysosomes in which only RFP fluoresces due to the high sensitivity of GFP to acidic compartments [17]. Strikingly, when compared to control cells, we found a strong increase of autophagosome number in siT6BP-treated cells, similarly to what we found, as expected, in siNDP52-treated cells (Fig. 1A and 1C) or in chloroquine-treated cells, a drug which prevents the acidification of autolysosomes and leads to the accumulation of non-degradative autophagic vesicles (Fig. 1C). Thus, when we analyzed the autophagosomes/autolysosomes ratio we observed that the reduced expression of T6BP led to a significantly increased percentage of autophagosomes over autolysosomes, when compared

to control cells (Fig. 1D). We further confirmed the role of T6BP in autophagosome maturation by looking at the level of p62/SQSTM1 expression, an endogenous substrate of autophagy, which accumulates in cells defective for an efficient autophagy-dependent catabolic activity. As expected, we found that p62/SQSTM1 has a strong tendency to accumulate in cells with a reduced expression of either ATG5 (Fig. 1A) (due to an inhibition of the autophagy process) or NDP52 (due to an inhibition of the autophagy flux), but also in cells with a reduced expression of T6BP (Fig. 1E). Thus, altogether these results indicate that as NDP52 and OPTN [14, 15], the autophagy receptor T6BP plays a dual role in the maturation of autophagosomes.

T6BP and NDP52, but not OPTN, are required for MeV replication.

We previously reported that MeV infection induces a complete autophagy flux, and that a full autophagosome maturation is required for an efficient MeV intracellular replication [4]. Since T6BP, NDP52 and OPTN are all individually involved in autophagosome maturation, we thought that their respective reduced expression would compromise MeV infectious particle production. To test this hypothesis, we treated cells with specific siRNAs to reduce the expression of each autophagy receptor (Fig 1A), and we measured the production of MeV particles after two days of infection. First, as control we treated cells with siATG5 which, as expected, compromised the replication of MeV (Fig. 2A). Interestingly, the absence of either T6BP or NDP52 also strongly reduced the ability of MeV to produce infectious particles in infected cells. However, surprisingly not every autophagy receptor involved in autophagosome maturation impacted viral replication: we found indeed that the extinction of OPTN did not prevent MeV efficient replication (Fig. 2A). We further confirmed the importance of the expression of T6BP or NDP52 on MeV replication, by showing that the reduced expression of any of these proteins significantly prevented the replication of MeV from 1 to 3 days of infection (Fig. 2B). Nevertheless, similarly to what we previously observed in autophagy defective or autophagosome maturation defective MeV-infected cells [4], the level of expression of two viral structural proteins, MeV-N and MeV-P, were not significantly affected by the reduced expression of either T6BP or NDP52 (Fig. 2C/2D), suggesting that autophagy intervenes in MeV replication in a step post viral protein synthesis. Together, these results suggest a differential use of the autophagy receptors role in autophagosome maturation by MeV to efficiently replicate.

NF-kB independent role of T6BP in MeV replication.

By interacting with the deubiquitinase A20, T6BP has been reported to serve as an intermediate in order to dampen the activation of the NF-kB signaling pathway [18]. Since the activation of the NF-kB signaling pathway could lead to the control of MeV infections [19], we thought that the decreased MeV replication observed in siT6BP-treated cells could result from an upregulation of the NF-kB activity, independently of its function in autophagosome maturation. To exclude this possibility we used HeLa cells stably expressing shRNA targeting the NF-kB essential component p65/RelA (Fig. 3A); we already reported that these cells have a strongly compromised NF-kB activity [20, 21]. We selected two shp65/RelA-expressing clones and found that both expressed equivalent amounts of ATG5, T6BP or NDP52 than shControl-expressing clones (Fig. 3A). Nevertheless, as shown in Figure 3B, we found that the two HeLa clones displaying a defective NF-kB pathway were much more efficient in supporting MeV infectious particle production by two days of infection, than shControl-expressing HeLa cells (Fig. 3B). We confirmed this observation by looking at the level of expression of two MeV proteins in the course of infection, MeV-N and MeV-P, which were both more expressed in shp65/RelA-expressing infected cells than in control infected cells (Fig. 3C/D). The ability of shp65/RelA-expressing HeLa cells to sustain an efficient MeV replication was not due to a better infection of these cells since we observed an equivalent level of expression of the MeV cell surface receptor CD46 on shp65/RelA- and shControl-expressing cells (Fig. 3E). Thus, together these results suggest indeed that the NF-kB signaling pathway in HeLa cells could contribute to partially control intracellular MeV replication, possibly by limiting replication events prior to viral protein translation.

To determine then whether T6BP (or NDP52) have an NF-kB independent role on MeV replication, we infected shp65/RelA-expressing cells, in which we further reduced the expression of either T6BP or NDP52 using specific siRNAs (Fig. 3F). Interestingly, the absence of any of these proteins in cells defective for the NF-kB signaling pathway, both negatively impacted the production of infectious MeV particles (Fig. 3G). Moreover, the levels of expression of both MeV-N and MeV-P were also reduced in shp65/RelA-expressing cells having a reduced expression of T6BP or NDP52 (Fig. 3H/I). Therefore, altogether these results indicate that the absence of T6BP, or NDP52, can negatively impact the replication of MeV, independently of its potential role on the NF-kB signaling pathway.

T6BP and NDP52 can both interact with MeV proteins

To further depict the role of T6BP and NDP52 in MeV replication, we then asked whether the reduced expression of T6BP or NDP52 impacted MeV-induced autophagy. To this end we looked at the conversion of LC3-I into LC3-II by western blot, which is a hallmark of autophagy modulation by indicating an increase of autophagosomal vesicles [17]. As expected, MeV infection led to an increased level of expression of LC3-II in control cells, that was not detected in siATG5-treated MeV-infected cells (Fig. 4A). However, in cells with a reduced expression of either T6BP or NDP52, the MeV infection still led to an increase of the LC3-II expression, suggesting that autophagy was still modulated in these cells (Fig. 4A). This increase of LC3-II could however result from the impact of the absence of the autophagy receptors on the autophagy flux as described above, independently of MeV infection. Furthermore, as expected when autophagy was completely prevented by using siATG5, MeV infection led to the accumulation of p62/SQSTM1 (Fig. 4B) and similar results were observed upon the reduced expression of T6BP or NDP52.

We further thought that in infected cells, T6BP and NDP52 could contribute to the exploitation of autophagy by MeV through physical interactions of MeV proteins with these autophagy receptors. To test this possibility, we used a yeast two-hybrid approach, which allowed us to show that T6BP and NDP52 have both the potency to interact with several MeV proteins including MeV-C, MeV-N, MeV-P and MeV-V (Fig. 4C). Together, these results suggest that T6BP and NDP52 could be targeted by MeV proteins in the course of infection to facilitate autophagosome maturation in order to optimize viral replication.

Independent contribution of T6BP and NDP52 in MeV replication.

To determine whether the autophagy receptors T6BP and NDP52 functions in autophagosome maturation are independently used during MeV infection, we first looked at the impact of these receptors on MeV replication in the context of partial autophagosome-fusion inhibition. To this end, we used non-saturating concentrations of chloroquine to prevent only partially the autophagy flux in order to limit the prevention of MeV replication. Indeed, whereas 50 μ M of Chloroquine completely abolished MeV replication, 25 μ M and 12,5 μ M of this drug inhibited MeV replication by 90% and 70%, respectively (Fig. 5A and not shown). Interestingly, we found that in such a condition of chloroquine usage, the reduced

expression of either T6BP or NDP52 prevented significantly further the replication of MeV, compared to chloroquine only-treated cells (Fig. 5A). Similar results were found when during infection we used another inhibitor of the autophagy flux at a non-saturating concentration, Bafilomycin A1 (25nM, inhibition of MeV replication by 60%, Fig. 5B). Thus these results indicated that the maturation of autophagosomes by either T6BP or NDP52 can further prevent MeV replication imposed by drugs which block randomly the maturation of all cellular autophagosomes. Importantly, we also found that the concomitant reduced expression of T6BP and NDP52 has a significant stronger inhibitory potential on MeV replication, than the individually reduced expression of these proteins (Fig. 5C). These results strongly suggest that T6BP and NDP52 could regulate the maturation of distinct autophagosomes, which are however both required for an optimal MeV replication.

DISCUSSION

Viruses can be detected by autophagy receptors and degraded through the lysosomal pathway to fight viral infection. However, MeV infection, although inducing a complete and productive autophagy flux, meaning from the formation of an isolated phagophore to the degradation and recycling of autophagy substrates by autolysosomes, is not sensitive to autophagy but instead uses this process for an optimal replication [4]. Here we report that autophagy receptors, which also play an important role in the maturation process of autophagosome-lysosome fusion, are not used equivalently by MeV in the course of infection.

Autophagy receptors ensure the recognition of cytosolic substrates to target them to the autophagy machinery [22]. We recently reported that the two autophagy receptors NDP52 and OPTN also regulate the fusion between autophagosomes and lysosomes, and therefore play a dual role of autophagy receptors and autophagy adaptors, for efficient autophagy degradation [14]. Here we extend this discovery to T6BP, which also regulates the maturation of autophagosomes since the reduced expression of this protein led to an accumulation of autophagosomes. T6BP (also called CALCOCO3) has several homologies with NDP52 (also called CALCOCO2), which might explain how this protein contributes to autophagy maturation. NDP52 has a MYOSIN VI binding domain and a LIR motif, which interact with the MYOSIN VI and LC3B, respectively [14, 23]. These two binding sites were shown to be essential for the NDP52-mediated autophagosome maturation [14]. Indeed, MYOSIN VI interacts with the endosomal protein TOM-1 [13], and LC3B is anchored in the

autophagosomal membrane: by interacting with MYOSIN VI and LC3B, NDP52 ligates the autophagosome with the endosomal pathway. Similarly to NDP52, T6BP was also reported for its potency to physically bind MYOSIN VI via two essential residues contained in its sequence, C688 and C715 [23]. T6BP also contains a LIR domain allowing its colocalisation and interaction with LC3B [16, 24]. Thus, through the concomitant interaction with MYOSIN VI and LC3-B, T6BP could govern the maturation of autophagosomes, similarly to NDP52. Indeed, a recent work described the essential role for both T6BP and MYOSIN VI in the late phase of autophagy to efficiently clear intracellular infection by *Salmonella typhimurium* [16]

T6BP is involved in a negative loop of regulation of the NF- κ B signaling pathway through its association with the deubiquitinase A20 [19]. Since viral infections can be regulated by the NF- κ B pathway, the impact of the reduced expression of T6BP on MeV replication could have been due to its role in an autophagy-independent mechanism. However, the use of cells with a defective NF- κ B signaling pathway allowed us to demonstrate that the absence of T6BP impacted MeV replication independently of the activation of this transcription factor. Thus, although we cannot exclude that a T6BP-dependent regulation of NF- κ B could contribute to the partial control of MeV replication, the role of this autophagy receptor in the maturation of autophagosomes appears to be predominant and to be required for an efficient MeV replication. OPTN has also been reported to either positively or negatively regulate the NF- κ B signaling pathway [25]. The fact that siOPTN did not affect MeV replication at all also suggests that the potential role of T6BP and OPTN in NF- κ B signaling has no significant role in the course of MeV infection in HeLa cells [26].

In our work, several evidences suggest that autophagosome maturation could be regulated independently by each autophagy receptor/adaptor and that they could be exploited individually by MeV to replicate. As described, beyond their function as autophagy receptors, NDP52, T6BP and OPTN have a role in the maturation of autophagosomes and a complete maturation of autophagosomes is required for an efficient MeV replication. However, strikingly the reduced expression of OPTN did not impact the production of infectious MeV particles, contrarily to the reduced expression of T6BP or NDP52. Thus, not all matured autophagosomes seem involved in MeV replication such as the one regulated by OPTN, but only some of them, as those regulated by NDP52 or T6BP. How MeV makes the distinction between individual autophagosomes remains to be fully depicted. This could pass through the

physical interaction of viral proteins with either NDP52 or T6BP, which could potentiate the maturation of autophagosomes matured by these two proteins. Indeed we found that several MeV proteins have the potency to interact with either NDP52 or T6BP but whether such interactions happens in the course of infection and drives autophagosome maturation remains to be fully investigated. Alternatively, T6BP and NDP52, but not OPTN, could target selective substrates to autophagy whose recycling is required for MeV replication, what would have to be also analyzed.

Another evidence suggesting a distinct usage of individual NDP52-mediated and T6BP-mediated autophagosome maturation for MeV replication is the fact that the co-reduced expression of NDP52 and T6BP impacted MeV replication further than their individual reduction, respectively. If NDP52 or T6BP were both co-engaged in the maturation process of all not yet degradative autophagosomes, their single reduction would have impacted function of both receptors on MeV replication. We cannot exclude that siRNA treatments, although used at saturating concentrations, are not completely efficient at reducing the expression of individual proteins. Thus, siT6BP (or siNDP52) could supply for some NDP52/T6BP-dependent autophagosome maturation, which would have not been impacted due to residual endogenous NDP52 upon siNDP52 treatment (or T6BP upon siT6BP treatment). However, if all autophagy receptors were engaged in the regulation of each individual autophagosome, we would have expected that the reduced expression of OPTN, which impacts autophagosome maturation as well, decreases MeV replication. Thus, although we cannot exclude that a unique molecular machinery involving NDP52, T6BP and OPTN is required for the maturation of autophagosomes, our results suggest a very fine tuned molecular regulation of autophagosome maturation, which could be exploited by MeV to replicate (Fig. 5D).

In the course of infection, the interplay of MeV with the autophagy process is very intricate, as we already reported that several signaling pathways are involved. The deeper study of this specific host-pathogen interaction allowed us to reveal here a potential individual regulation of autophagosome maturation by individual autophagy receptors. Our study offers interesting perspectives in regards to both the understanding of autophagy molecular regulation, a cellular process whose deregulation is associated with several human pathologies, and the potential development of strategies to fight MeV infection, one of the most contagious pathogens in human, possibly by targeting individual molecules involved

into the specific maturation of autophagosomes, without altering the complete autophagy process.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies and Reagents

Antibodies used were: anti-T6BP (HPA024432) anti-NDP52 (HPA023195), anti-LC3B (L7543), anti-actin (A2066) and anti-ATG5 (A0856) all from Sigma-Aldrich, anti-OPTINEURIN (Abcam, ab23666), anti-SQSTM1/p62 (Santa Cruz, sc-28359), anti-p65/RelA (Millipore #06-418). Anti-MeV-N (mouse monoclonal, clone 120) and anti-MeV-P (rabbit polyclonal J37171) were used. Anti-CD46 conjugated to PE antibody (8E2 clone) was from eBioscience (12-0469-42). Secondary antibodies used were: anti-Mouse conjugated to Peroxydase (A2304) from Sigma-Aldrich and anti-Rabbit conjugated to HRP (NA9340). Pharmacological agents used were Bafilomycin A1 (25nM) (InvivoGen #tlrl-baf1) and Chloroquine (25 μ M or 12.5 μ M) (C6628, Sigma).

Cell culture

HeLa, GFP-LC3-HeLa, mRFP-GFP-LC3-HeLa, shp65-HeLa and Vero cells were maintained in DMEM medium, supplemented with 10%FBS, 0.1% Gentamicin. Additional 500 μ g/mL of Geneticin/G418 was added for GFP-LC3-HeLa, mRFP-GFP-LC3-HeLa, shp65-HeLa cells cultures. The shCtrl, shp65#1 and shp65#2 HeLa cell lines used in this study are the HeLa-cont#1, HeLa-p65 KD#1 and HeLa-p65 KD#2 cell lines used in [21], respectively

siRNA transfection

The day before transfection with siRNA, the cells were seeded in 6-well plates with 1×10^5 cells per well in OPTIMEM complemented with 10% FBS, 2 mM of L-glutamine, 50 mg/ml of Gentamycin, 0.1 mM non-essential amino acid, 0.1 mM pyruvate sodium, and 0.1 g/L bicarbonate sodium. The cells were transfected with 100 pmol of total siRNA using Lipofectamine RNAiMAX from Invitrogen according to the manufacturer's instructions. Protein expression level was assessed by western-blot four days post transfection (lysis buffer: PBS 1X, 0.5% Nonidet P40 and protease inhibitor (Complete Mini EDTA free, Roche Applied Science # 04693159001)).

For titration experiments, the cells were transferred 48h after siRNA transfection to a 24-well plate at 2×10^4 cells per well. Five hours after the transfer, cells were infected with MeV.

MeV strains and titration by plaque assay

Measles Virus Edmonston strain (MeV) was obtained from ATCC. HeLa cells were infected with MeV at the indicated MOI. After the indicated period of infection, cells were submitted to 5 freeze (-80°C)-thaw cycles (ambient temperature) and infectious viral particles were quantified by limiting dilution on confluent Vero cells.

Molecular Cloning

For yeast expression: cDNAs were transferred by in vitro recombination with a Gateway recombination cloning system (Invitrogen) from a pDONR into both pGBKT7 (viral proteins) and pACT2 (autophagy receptors).

Yeast-two-hybrid assay

The non-selective and selective yeast media (respectively YAPD and SD) were described except that adenine hemisulfate (100 mg/l) was added in YAPD and yeast cells were transformed by the TE/LiAC/PEG method [27]. The pACT2 constructs were first transformed in yeast strain Y2H Gold (Clontech) and subsequently plated on a selective medium lacking leucine to select the pACT2 transformed cells. Then, the selected cells were transformed with pGBKT7 constructs and subsequently plated on a selective medium lacking tryptophan to select the pGBKT7 transformed cells. To test the interaction-dependent transactivation of the HIS3 reporter gene, double-transformed cells were plated on a selective medium lacking leucine, tryptophan and histidine.

Confocal microscopy

All images were taken on a confocal Zeiss LSM 710 with a plan apochromat 40X objective. The quantification of fluorescent vesicles was carried out using ImageJ. The cells were cultured in 24 well-plates with a sterile coverslip in each well. The cells were fixed in ice cold acetone. At least 100 cells per individual experiment were numerated.

Immunofluorescence-coupled Flow Cytometry

For CD46 staining, $0.25-0.5 \times 10^6$ cells were incubated in microtiter U-bottom plates with saturating concentrations of labeled monoclonal antibody (mAb) in 20 μ l PBS 2% FCS/0.1% NaN₃ for 30 min on ice. Cells were washed twice and analyzed immediately without fixation. The anti-human CD46 mAb used was the phycoerythrin (PE)-conjugated 8E2 clone (mouse

IgG1κ) from eBioscience. A LSRII flow cytometer (Becton Dickinson) and the FlowJo software (Tristar) were used to collect and analyze the data. Nonviable cells were excluded using forward and side scatter electronic gating. In some experiments, results were confirmed by using the fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human CD46 E4.3 mAb (mouse IgG2ακ) from BD Biosciences.

Statistical Analysis

All p values were calculated using a two-tailed Welch t test (Student's t test assuming non-equal variances of the samples), except for the results of Figures 1E and 4B, for which a one-tailed Welch t test was applied; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr D.C. Rubinsztein for providing us with mRFP-GFP-LC3-Hela cells. We acknowledge the framework of the LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0042) of Université de Lyon operated by the French National Research Agency (ANR-11-IDEX-0007). We thank the flow cytometry and confocal microscopy facilities of the SFR Biosciences Gerland. This work was supported by la Ligue Contre le Cancer, Institut Universitaire de France (IUF), ANR and Association François Aupetit. DSP is recipient of a fellowship from La Ligue Contre le Cancer.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 T6BP function in autophagosome maturation.

(A) HeLa cells transfected with the indicated siRNAs for 48 hr, were lysed, and expression of relevant proteins was probed by western blot. (B) GFP-LC3 HeLa cells were transfected or co-transfected with the indicated siRNAs for 48 hr and fixed for analysis by confocal microscopy. Representative profiles are shown along with a graph expressing the relative fold induction of dot number compared with control cells. (C) mRFP-GFP-LC3 HeLa cells were transfected with the indicated siRNAs for 48 hr and eventually treated the last 2 hr of culture with chloroquine. Representative profiles of autophagosomes (RFP⁺GFP⁺ dots) and autolysosomes (RFP⁺GFP⁻ dots) per cell section assessed by confocal microscopy are shown and were quantified. Results are expressed as absolute numbers of individual vesicles (total autophagic vesicles = all RFP⁺ dots). (D) Results in (C) are shown as the percentage of total

autophagic vesicles. (E) HeLa cells were transfected with the indicated siRNAs for 48 hr, were lysed, and anti-p62 and anti-Actin western blots were performed. Representative results are shown along with a graph representing the intensity of p62/Actin bands normalized to the control condition. For (A, E), means \pm SD of at least three independent experiments. (B) and (C) were each carried out in duplicates.

Fig. 2 Involvement of autophagy receptors in MeV replication

(A) HeLa cells were transfected with the indicated siRNAs for 48hr, then infected with MeV (MOI 0.1). 48h post infection infectious virus particles were titrated by plaque assay. (B) HeLa cells were transfected with the indicated siRNA for 48hr, then infected with MeV (MOI 1). One, two or three days post infection infectious virus particles were titrated by plaque assay. (C, D): Cells were treated as in (A). Expression of measles virus N and P proteins was assessed by Western blotting. Representative results are shown and are accompanied by a graph representing the intensity of MeV-N (D) and MeV-P (E) expression over Actin normalized to Control condition. For each experiment, error bars, mean \pm SD of three independent experiments. (A) and (B) were carried out in duplicates.

Fig. 3 NF- κ B-independent role of T6BP in MeV replication

(A) p65/RelA-expressing HeLa cells and shControl-expressing HeLa cells were transfected with the indicated siRNAs for 48 hr, were lysed, and expression of relevant proteins was probed by western blot. (B) p65/RelA-expressing HeLa cells and shControl-expressing cells were infected with MeV (MOI 0.1). 48h post infection infectious virus particles were titrated by plaque assay. For each shp65/RelA-expressing cell line, means \pm SD of two independent experiments carried out in duplicates are represented. (C, D): Cells from (B) were lysed 48hr post infection. Expression of measles virus N and P proteins were assessed by Western blotting. Representative results are shown and are accompanied by a graph representing the intensity of MeV-N (C) and MeV-P (D) expression over Actin normalized to shControl-expressing cells condition. Means \pm SD of four independent experiments are represented. (E) p65/RelA-expressing HeLa cells and shControl-expressing HeLa cells were stained for CD46 expression and analyzed by flow cytometry. (F-I) p65/RelA-expressing HeLa cells were treated with indicated siRNAs for 48hr. (F) Cells were lysed and expression of relevant proteins was probed by western blot. Results regarding cell line shp65 #1 are represented. Similar results were obtained with shp65 #2. Cells were infected with MeV (MOI 0.1) and 48hr post infection, infectious virus particles were titrated by plaque assay (G) or lysed.

Expression of measles virus N (H) and P (I) proteins was assessed by Western blotting. Representative results are shown and are accompanied by a graph representing the intensity of measles proteins expression over Actin normalized to control siRNA condition. (G) Means \pm SD of two independent experiments carried out in duplicates are represented. (H) and (I) Means \pm SD of four independent are represented.

Fig. 4 MeV proteins interactions with NDP52 and T6BP

(A) HeLa cells were transfected with the indicated siRNAs for 48 hr, and infected or not with MeV (MOI 0.1). 48h post infection cells were lysed, and anti-LC3 and anti-Actin western blots were performed. Representative results are shown along with a graph representing the intensity of LC3 II/LC3 I bands normalized to the uninfected control condition. (B) HeLa cells were transfected with the indicated siRNAs for 48 hr, and infected with MeV (MOI 0.1). 48h post infection cells were lysed, and anti-p62 and anti-Actin western blots were performed. Representative results are shown along with a graph representing the intensity of p62/Actin bands normalized to the control condition. (A) and (B) Means \pm SD of three independent experiments are represented. (C) Yeast 2-hybrid assays were performed as indicated in the experimental procedure to test for putative interactions between MeV proteins and T6BP or NDP52. Representative photos of two independent experiments are shown.

Fig. 5 Autophagosome maturation and MeV replication

(A) and (B) HeLa cells were transfected with the indicated siRNAs for 48h. Cells were then simultaneously infected with MeV (MOI 0.1) and treated or not with 25 μ M or 12.5 μ M of Chloroquine [17] (A) or 25nM of Bafilomycin A1 (Baf A1) (B). 48h post infection and drug treatment, infectious virus particles were titrated by plaque assay. Means \pm SD of four independent experiments performed in duplicates are represented. (C) HeLa cells were transfected or co-transfected with the indicated siRNAs for 48 hr. Cells were infected with MeV (MOI 0.1) and 48hr post infection, infectious virus particles were titrated by plaque assay. Means \pm SD of three independent experiments performed in duplicates are represented. (D) Model of individual autophagosome maturation regulation by T6BP, NDP52 and OPTINEURIN.

REFERENCES

1. Boya, P., F. Reggiori, and P. Codogno, *Emerging regulation and functions of autophagy*. Nat Cell Biol, 2013. 15(7): p. 713-20.
2. Gomes, L.C. and I. Dikic, *Autophagy in antimicrobial immunity*. Mol Cell, 2014. 54(2): p. 224-33.
3. Gregoire, I.P., et al., *IRGM is a common target of RNA viruses that subvert the autophagy network*. PLoS Pathog, 2011. 7(12): p. e1002422.
4. Richetta, C., et al., *Sustained autophagy contributes to measles virus infectivity*. PLoS Pathog, 2013. 9(9): p. e1003599.
5. Moss, W.J. and D.E. Griffin, *Measles*. Lancet, 2012. 379(9811): p. 153-64.
6. Griffin, D.E., *Measles virus-induced suppression of immune responses*. Immunol Rev, 2010. 236: p. 176-89.
7. Moss, W.J. and D.E. Griffin, *Global measles elimination*. Nat Rev Microbiol, 2006. 4(12): p. 900-8.
8. Gregoire, I.P., C. Rabourdin-Combe, and M. Faure, *Autophagy and RNA virus interactomes reveal IRGM as a common target*. Autophagy, 2012. 8(7).
9. Joubert, P.E., et al., *Autophagy induction by the pathogen receptor CD46*. Cell Host Microbe, 2009. 6(4): p. 354-66.
10. Meiffren, G., et al., *Pathogen recognition by the cell surface receptor CD46 induces autophagy*. Autophagy, 2010. 6(2): p. 299-300.
11. Nanche, D., et al., *Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus*. J Virol, 1993. 67(10): p. 6025-32.
12. Stolz, A., A. Ernst, and I. Dikic, *Cargo recognition and trafficking in selective autophagy*. Nat Cell Biol, 2014. 16(6): p. 495-501.
13. Tumbarello, D.A., et al., *Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome*. Nat Cell Biol, 2012. 14(10): p. 1024-35.
14. Verlhac, P., et al., *Autophagy receptor NDP52 regulates pathogen-containing autophagosome maturation*. Cell Host Microbe, 2015. 17(4): p. 515-25.
15. Verlhac, P., C. Viret, and M. Faure, *Dual function of CALCOCO2/NDP52 during xenophagy*. Autophagy, 2015. 11(6): p. 965-6.
16. Tumbarello, D.A., et al., *The Autophagy Receptor TAX1BP1 and the Molecular Motor Myosin VI Are Required for Clearance of Salmonella Typhimurium by Autophagy*. PLoS Pathog, 2015. 11(10): p. e1005174.
17. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy*. Autophagy, 2012. 8(4): p. 445-544.
18. Shembade, N., et al., *The kinase IKKalpha inhibits activation of the transcription factor NF-kappaB by phosphorylating the regulatory molecule TAX1BP1*. Nat Immunol, 2011. 12(9): p. 834-43.
19. Schuhmann, K.M., C.K. Pfaller, and K.K. Conzelmann, *The measles virus V protein binds to p65 (RelA) to suppress NF-kappaB activity*. J Virol, 2011. 85(7): p. 3162-71.
20. Nivon, M., et al., *NF-kappaB regulates protein quality control after heat stress through modulation of the BAG3-HspB8 complex*. J Cell Sci, 2012. 125(Pt 5): p. 1141-51.
21. Nivon, M., et al., *Autophagy activation by NFkappaB is essential for cell survival after heat shock*. Autophagy, 2009. 5(6): p. 766-83.
22. Randow, F. and R.J. Youle, *Self and Nonsel: How Autophagy Targets Mitochondria and Bacteria*. Cell Host Microbe, 2014. 15(4): p. 403-411.

23. Morriswood, B., et al., *T6BP and NDP52 are myosin VI binding partners with potential roles in cytokine signalling and cell adhesion*. *J Cell Sci*, 2007. 120(Pt 15): p. 2574-85.
24. Newman, A.C., et al., *TBK1 kinase addiction in lung cancer cells is mediated via autophagy of Tax1bp1/Ndp52 and non-canonical NF-kappaB signalling*. *PLoS One*, 2012. 7(11): p. e50672.
25. Kachaner, D., et al., *Toward an integrative view of Optineurin functions*. *Cell Cycle*, 2012. 11(15): p. 2808-18.
26. Journo, C., et al., *NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF-kappaB by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein*. *PLoS Pathog*, 2009. 5(7): p. e1000521.
27. Walhout, A.J. and M. Vidal, *High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping*. *Methods*, 2001. 24(3): p. 297-306.

Figure 1

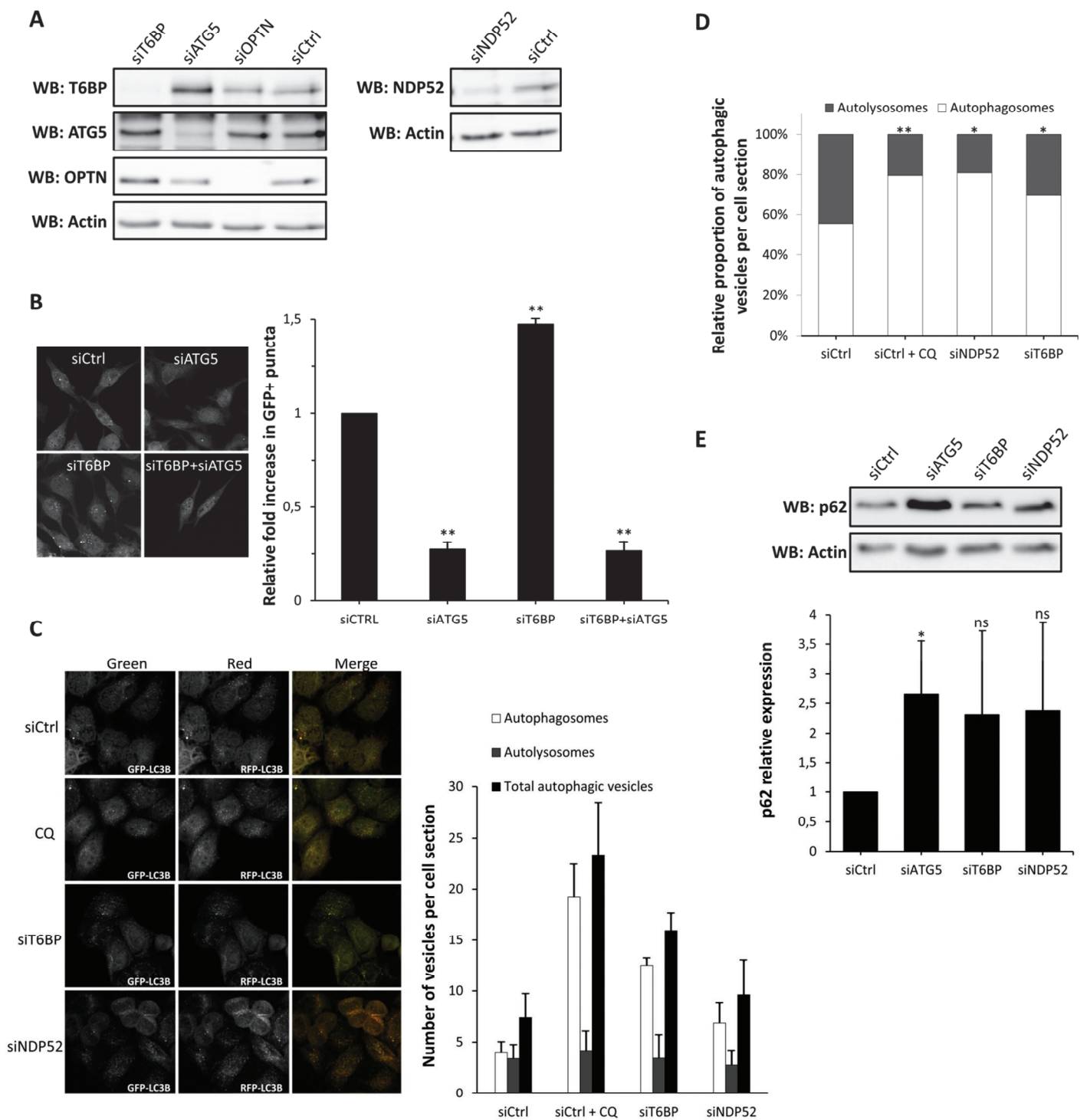


Figure 2

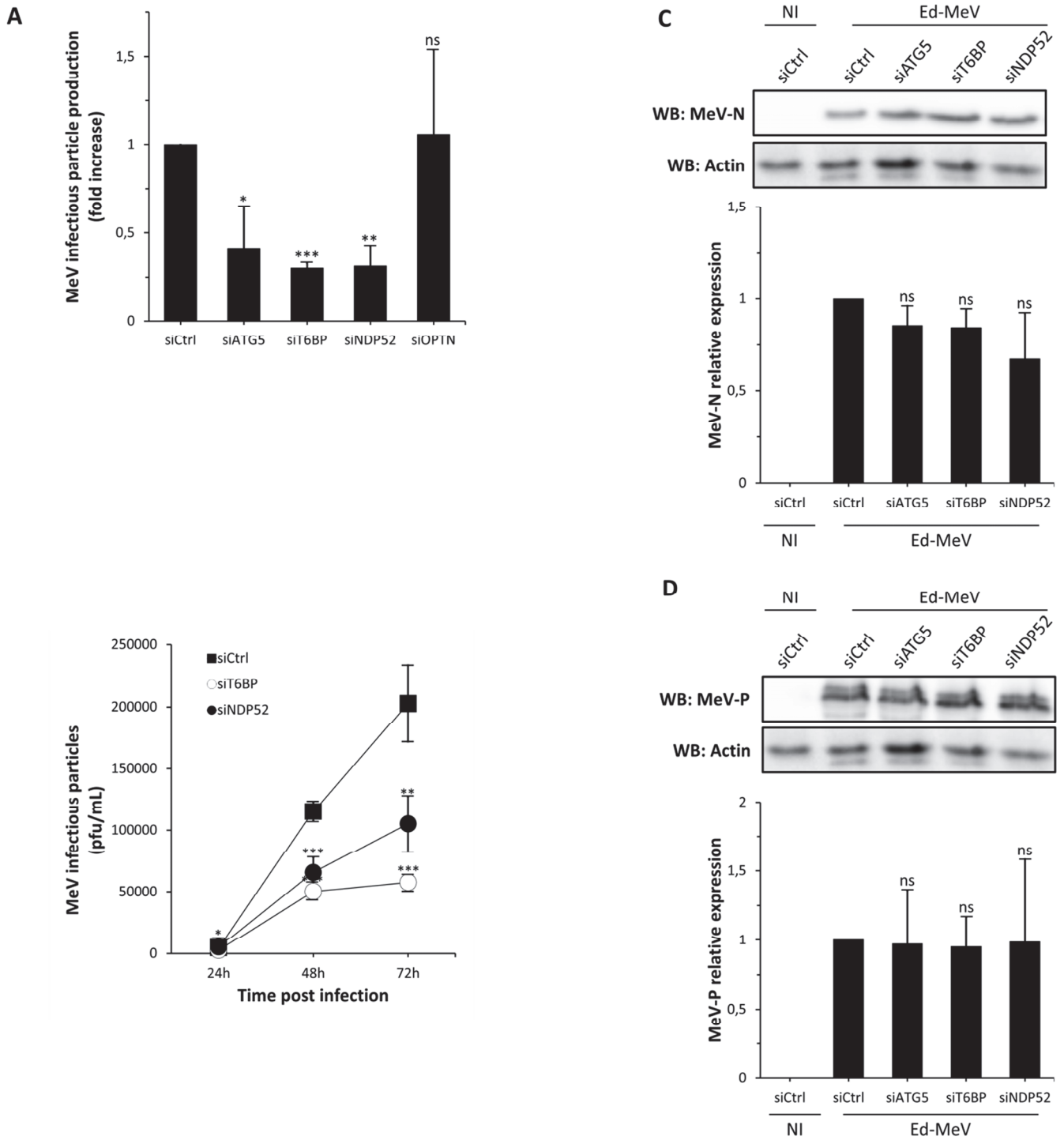


Figure 3

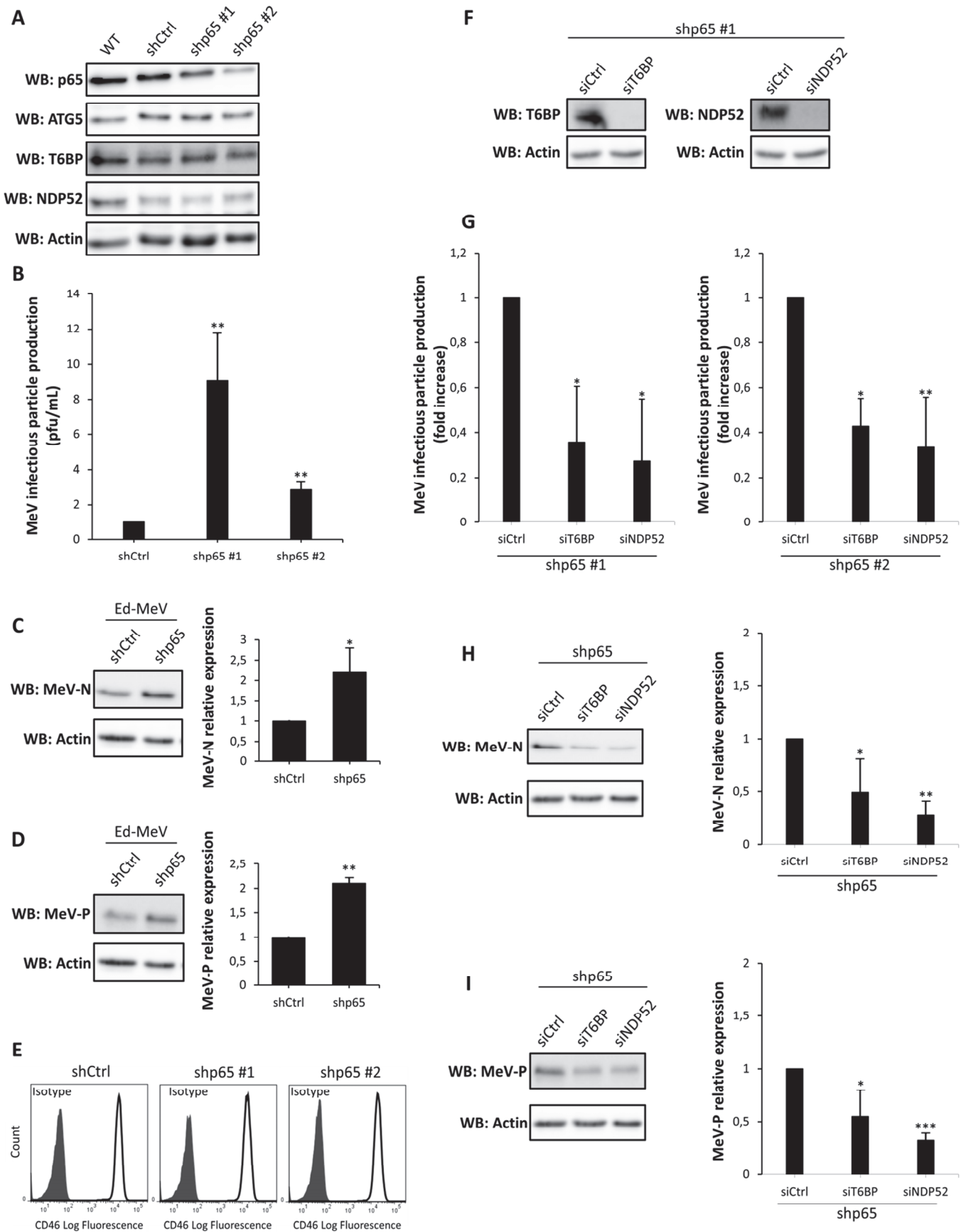


Figure 4

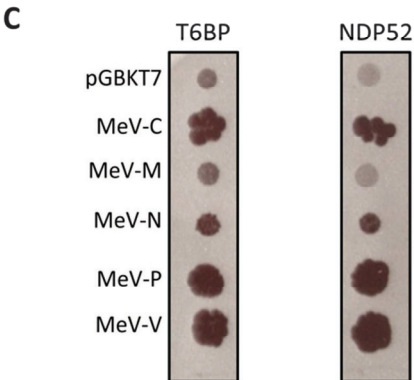
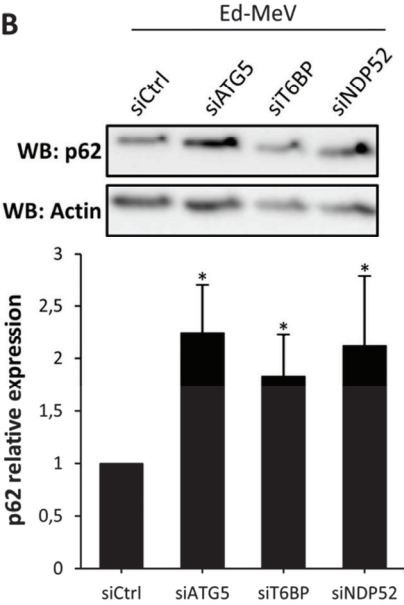
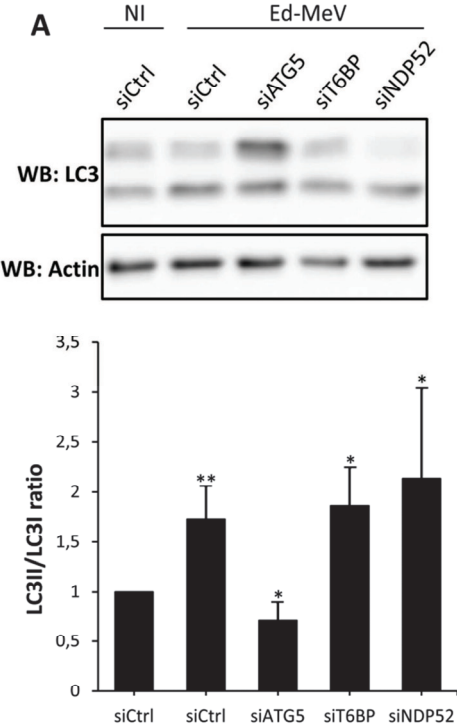


Figure 5



III Résultats complémentaires

III.1 Rôle d'IRGM dans l'autophagie viro-induite

Au début de ma thèse j'ai continué les recherches initiées au sein de l'équipe concernant la régulation de l'autophagie par la protéine IRGM en contexte infectieux. En effet des travaux de l'équipe avaient identifié la protéine IRGM comme cible de nombreux virus à ARN appartenant à des familles virales différentes (Grégoire et al., 2011). Dans ces travaux, l'équipe a décrit que certains de ces virus, et notamment le virus de la rougeole (VR), induisent l'autophagie *via* les interactions de protéines virales avec IRGM. De manière intéressante, dans le cas du virus de la rougeole cette induction conduit en plus à une meilleure réplication virale. En outre, ces travaux montraient qu'IRGM est capable d'interagir avec des protéines impliquées dans les stades d'initiation (Bif-1) et d'élongation (ATG5, ATG10 et LC3C) du phagophore, révélant l'importance de cette protéine. IRGM avait surtout été décrite comme jouant un rôle en situation d'infections bactériennes. En effet, comme nous l'avons vu, IRGM semble contrôler l'infection par *M. tuberculosis* par xénophagie (Singh et al., 2006). De plus la dérégulation de l'expression d'IRGM induit une prolifération non contrôlée de la souche bactérienne pathogénique, associée à la maladie de Crohn, AIEC (Brest et al., 2011; Lapaquette et al., 2010, 2012). Cependant le rôle précis d'IRGM dans l'autophagie induite dans le cas de l'infection par le virus de la rougeole n'est pas encore élucidé.

Une hypothèse possible serait qu'IRGM, qui localise en partie dans les mitochondries, régule la réponse IFN-I à l'instar de la protéine TUFM qui inhibe la production d'IFN-I d'une part et est impliquée dans l'induction de l'autophagie d'autre part comme nous l'avons décrit dans le paragraphe I.4.4.f. Nous avons développé cette hypothèse dans la revue que nous avons rédigée au début de ma thèse (Petkova et al., 2012, Annexe 2), (*Figure 19*).

Dans la mesure où la protéine C est décrite comme un facteur de virulence, capable d'inhiber la réponse IFN-I (cf paragraphe II.3.2.b.i), le rôle de l'autophagie dépendante d'IRGM pourrait en effet être l'inhibition de cette réponse. Cette hypothèse a en partie été montrée par une étude récente montrant que le virus de la rougeole induit l'autophagie dans des cellules de cancer de poumon non à petite cellules (NSCLC : non-small cell lung cancer) et que cette induction perturbe la signalisation par RIG-I et notamment la production d'IFN- β (Xia et al., 2014).

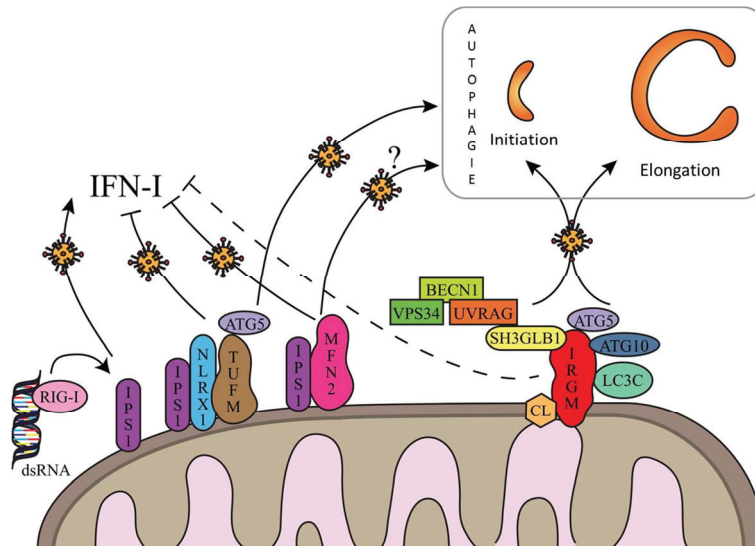


Figure 19 : Rôle possible d'IRGM dans la régulation de la réponse IFN-I et l'autophagie lors de l'infection par le VR. Extrait de (Petkova et al., 2012, Annexe 2)

Mon objectif fût de déterminer le mécanisme moléculaire par lequel IRGM régule l'autophagie dans le cadre de l'infection par le VR. La séquence en acides aminés, d'IRGM est présentée sur la *Figure 20 A*.

J'ai ainsi confirmé les interactions décrites entre IRGM et les partenaires cellulaires (ATG5, ATG10, Bif-1 et LC3C), ainsi qu'entre IRGM et la protéine C du virus de la rougeole (VR-C) par une approche de GST purification par co-affinité (*Figure 20 B*). Puisque des domaines d'activité biologique ou d'interactions protéiques n'ont pas encore été identifiés sur IRGM, j'ai réalisé trois premières constructions de délétion aléatoire (*Figure 20 C*), et j'ai testé leurs interactions avec VR-C et les protéines cellulaires. Ainsi j'ai pu identifier que la zone des 120 premières acides aminés (aa) (1-120) d'IRGM interagit avec les partenaires cellulaires et la protéine virale VR-C. De plus, LC3C interagit avec le segment IRGM 124-181 (*Figure 20 D*). Il est à noter d'après des similitudes de séquence, dans ces régions contiennent des domaines GTP-ase potentiels (positions 41-48, 66-70, 147-149), (UniProt : A1A4Y4). Nous avons également identifié des domaines LIR potentiels sur la base d'homologie avec la séquence canonique des domaines LIR (positions 86-89, 101-104, 115-118 et 141-145 qui remplit toutes les conditions pour être un domaine LIR sauf celle concernant la présence d'acide aminé acide) (Johansen and Lamark, 2011). Dans un second temps j'ai généré une deuxième série de mutants d'IRGM afin de détailler le(s) site(s) d'interaction(s) d'IRGM avec ses partenaires (*Figure 20 E*). Cette fois-ci les fragments IRGM ont été fusionnés à la GST et les partenaires d'interaction à l'étiquette Flag. De manière surprenante, j'ai montré que les protéines ATG5, ATG10, Bif-1 et LC3C interagissent toutes avec les mêmes constructions d'IRGM : IRGM 1-120, 1-90, 82-120, 60-120 et 30-120. Au contraire aucune de ces protéines n'interagit avec les constructions 1-30, 1-60,

et 1-81 (Figure 20 F, G). Concernant la protéine VR-C, les expériences utilisant les constructions d'IRGM fusionnées à la GST n'ont pas donné de résultats probants.

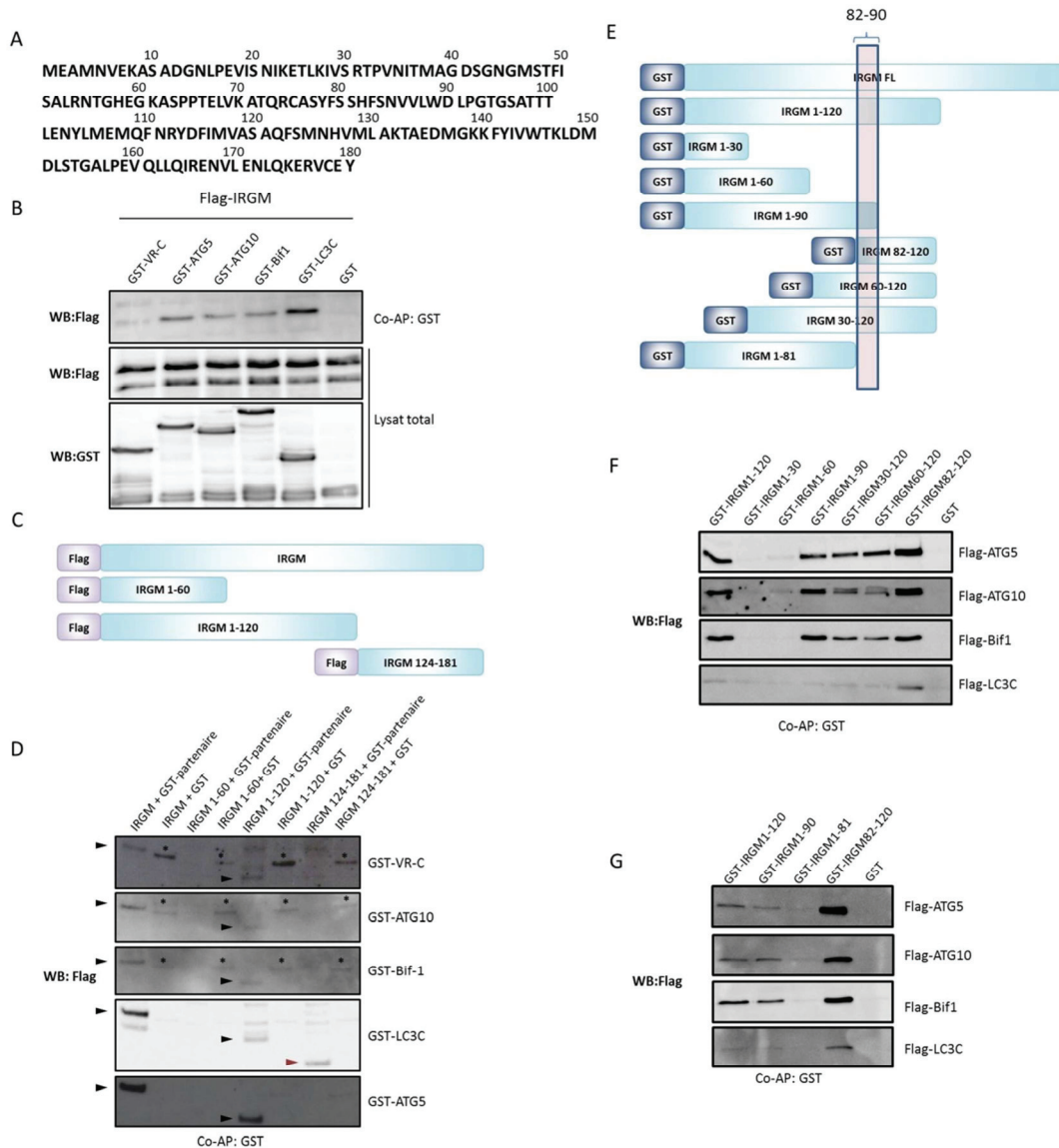


Figure 20 : Interactions entre IRGM et ses partenaires. **A** : Séquence primaire d'IRGM **B** : Mise en évidence de l'interaction entre IRGM, fusionnée au Flag, et une protéine virale et quatre protéines autophagiques fusionnées à la GST. Les partenaires (VR-C, ATG5, ATG10, Bif-1 et LC3C) sont fusionnés avec la GST. VR-C : protéine C du virus de la Rougeole. Ces dernières ont été purifiées à l'aide de billes Glutathion-Sépharose (GST-purification par co-affinité) et la co-précipitation d'IRGM a été déterminée par WB à l'aide d'un anticorps anti-Flag. Les contrôles de charge et d'expression des partenaires (blots anti-Flag et anti-GST sur la membrane du lysat total) sont aussi représentés. Ces contrôles ne seront plus représentés dans les autres panels de la figure. **C** : Représentation schématique des constructions utilisées. **D** : Recherche de site d'interaction d'IRGM avec ses partenaires (GST-purification par co-affinité). La stratégie expérimentale est la même que dans **B**. Tous les partenaires interagissent avec le fragment englobant les 120 premiers acides aminés (IRGM1-120), comme indiqué par la flèche noire. La protéine LC3C interagit aussi avec la région IRGM124-181, comme indiqué par la flèche rouge. Les bandes marquées par un astérisque sont non-spécifiques. **E** : Représentation schématique des constructions IRGM fusionnées à la GST, utilisées dans la deuxième série d'expériences. **F, G** : Mise en évidence de l'interaction entre les différents mutants de délétion IRGM, fusionnés à la GST et les partenaires cellulaires fusionnés au Flag. La même approche que dans C a été utilisée.

J'ai ainsi déterminé que la région 82-90 est la région minimale nécessaire à l'interaction d'IRGM et ses quatre partenaires cellulaires (ATG5, ATG10, Bif-1, LC3C) (*Figure 20 E*). La séquence de cette région est HFSNVVLWD et pourrait porter une des régions LIR potentiels comme indiqué plus haut.

J'ai émis l'hypothèse de l'existence d'une protéine intermédiaire interagissant avec IRGM au niveau de la région 82-90 et un de ses partenaires cellulaires, afin d'expliquer que toutes ces protéines interagissent avec IRGM au niveau d'une région aussi restreinte. Comme IRGM a le potentiel d'interagir avec des protéines impliquées dans l'initiation de l'autophagie (Grégoire et al., 2011), je me suis intéressée à son interaction potentielle avec Beclin-1, qui est aussi impliqué dans cette étape. Je me suis aussi intéressée à une interaction possible entre IRGM et le récepteur autophagique p62, consommé lors de l'infection par le VR (Richetta et al., 2013). Ainsi j'ai pu identifier qu'IRGM interagit potentiellement avec Beclin-1 et p62 (*Figure 21 A*). Ces deux partenaires n'avaient pas encore été documentés à ce moment-là. De plus j'ai également détecté une interaction d'IRGM avec NDP52. Concernant l'interaction avec p62 il est possible qu'elle soit indirecte, *via* l'interaction d'IRGM avec LC3C, dans la mesure où p62 est connu pour lier LC3C également. En effet lorsque GST-LC3C et Flag-IRGM sont surexprimés, Flag-IRGM et p62 endogène co-précipitent avec GST-LC3C (*Figure 21 B*), alors qu'aucune co-précipitation de p62 endogène n'est observée lors de la surexpression de Flag-IRGM et GST-Bif-1 ou GST-ATG5 (*Figure 21 B et C*). En outre, l'inhibition de l'expression de p62 n'empêche pas l'interaction d'IRGM ni avec LC3C, ni avec Bif-1 ou encore ATG5 (*Figure 21 B et C*). Pour commencer à clarifier ce point, une GST purification par co-affinité en éteignant l'expression de LC3C devra être réalisée.

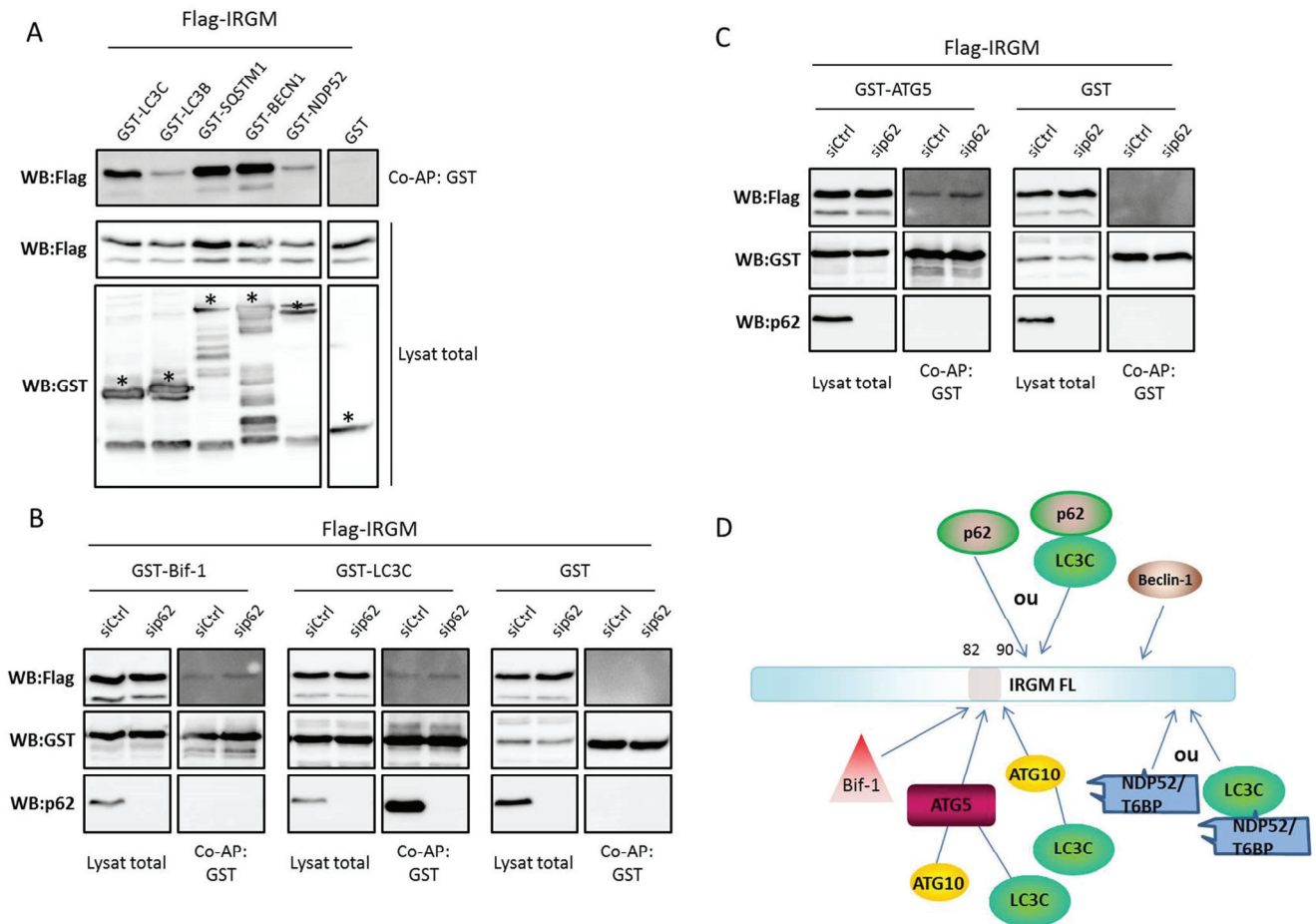


Figure 21 : Recherche d'intermédiaires d'interactions entre IRGM et ses partenaires. **A** : Mise en évidence de l'interaction entre IRGM, fusionnée au Flag, et cinq protéines autophagiques fusionnées à la GST. Ces dernières ont été purifiées à l'aide de billes Glutathion-Sépharose (GST-purification par co-affinité) et la co-précipitation d'IRGM a été déterminée par WB à l'aide d'un anticorps anti-Flag. Les contrôles de charge et d'expression des partenaires (blots anti-Flag et anti-GST sur la membrane du lysat total) sont aussi représentés. Les protéines autophagiques fusionnées à la GST sont marquées par de astérisques. **B**, **C** : p62 n'est pas responsable de l'interaction entre IRGM et Bif-1, LC3C et ATG5. Les cellules ont été d'abord traitées avec sip62 ou non pendant 48h avant de procéder à la même stratégie expérimentale décrite dans A. L'extension de p62 a été visualisée avec un anticorps spécifique sur les membranes de lysat total. La co-précipitation de p62 endogène a été recherchée avec un anticorps spécifique sur la membrane de la Co-AP. Les photos des membranes sont coupées car des données non pertinentes n'ont pas été représentées ici. Pour chaque panel les charges de lysats totaux ont été effectuées sur un même gel. Les charges des Co-AP ont été effectuées sur un même gel également. **D** : Modèle des interactions possibles entre IRGM et ses partenaires.

De la même manière, il est possible que l'interaction d'IRGM observée avec NDP52 (Figure 21 A) soit établie *via* un partenaire intermédiaire, LC3C, dans la mesure où l'interaction entre NDP52 et LC3C est bien documentée dans la littérature (von Muhlinen et al., 2012; Verlhac et al., 2015, Annexe 1). En effet des expériences de GST purification par co-affinité entre IRGM et NDP52, en éteignant préalablement l'expression de LC3C devront être réalisées afin d'étudier cette possibilité. Le schéma

de la Figure 21 D représente un modèle dans lequel certaines des interactions d'IRGM avec ses partenaires ont lieu par le biais d'intermédiaire(s) moléculaire(s).

Concernant l'interaction entre IRGM et Beclin-1, que j'ai pu mettre en évidence, une étude du groupe de V. Deretic l'a démontrée également et caractérisée dans le cadre de l'induction de l'autophagie lors d'infections (Chauhan et al., 2015). Ce travail très complet montre qu'au-delà d'interagir avec Beclin-1, IRGM interagit avec plusieurs autres protéines dont ULK1 et NOD2. En outre les interactions d'IRGM avec Beclin-1 et ULK1 activent ces protéines et promeuvent l'autophagie.

Enfin, en parallèle des expériences décrites ci-dessus nous avons généré un mutant d'IRGM, où nous avons remplacé les neuf acides aminés de la région 82-90 par des alanines afin de valider définitivement cette zone comme la zone d'interaction avec ATG5, ATG10, Bif-1 et LC3C. De manière très surprenante ce mutant a conservé l'interaction avec ces protéines (données non représentées). Une hypothèse possible pour expliquer ce résultat serait que certains des mutants de délétion décrits ci-dessus (*Figure 20 E*) ont induit un changement de la structure tertiaire d'IRGM et a donc masqué le(s) véritable(s) site d'interaction d'IRGM avec ses partenaires qui se trouverait donc ailleurs que sur la région 82-90.

Compte tenu de ce dernier résultat très surprenant et de la publication récente et très complète du groupe de V. Deretic, décrivant l'intégration moléculaire d'IRGM dans l'induction de l'autophagie lors d'infection, nous avons décidé d'orienter mon projet de thèse sur d'autres cibles moléculaires autophagiques du VR. Ainsi, j'ai étudié le rôle de récepteurs autophagiques lors de l'infection par le virus de la rougeole et les conséquences sur la réplication du virus.

III.2 Rôle de p62 dans l'infection par le virus de la rougeole

Le criblage en double hybride chez la levure, effectué par l'équipe, a révélé que le récepteur autophagique p62 a également le potentiel d'interagir avec la nucléoprotéine du virus de la rougeole (VR-N). Lors d'expériences d'infection de cellules HeLa-FP-LC3, j'ai pu observer de rares événements de colocalisation entre p62 et VR-N par une approche de microscopie confocale (*Figure 22 A*), alors que, comme attendu, p62 et LC3B colocalisent fréquemment (*Figure 22 B*).

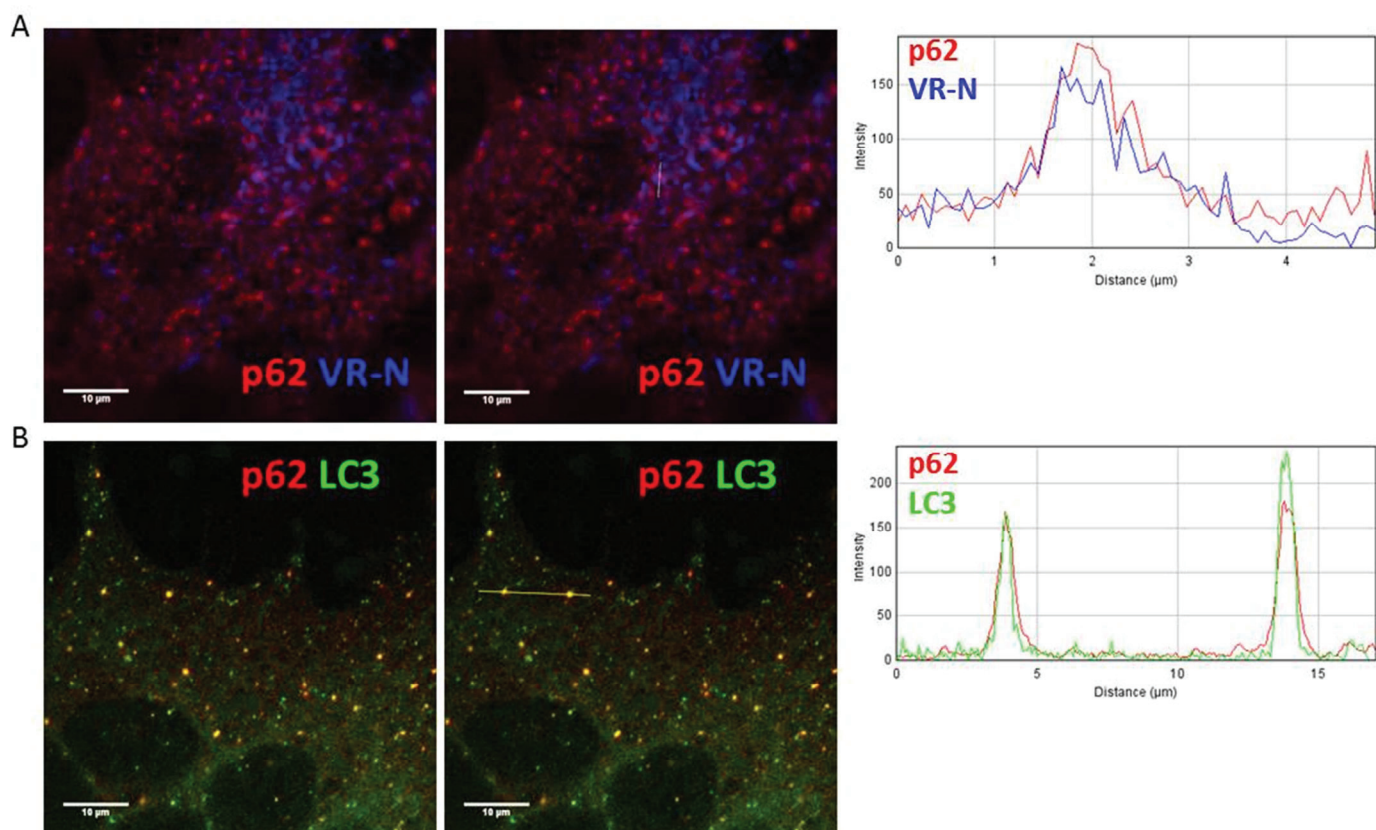


Figure 22 : Colocalisation entre p62 endogène et LC3 ou VR-N. Des cellules HeLa exprimant stablement GFP-LC3B ont été infectées avec la souche Edmonston du virus de la rougeole (MOI 0.1). Les cellules ont été fixées 24h post infection et marquées pour l'expression de p62 endogène (en rouge) et VR-N (en bleu). Les superpositions entre les canaux de p62 et VR-N (**A**) et de p62 et LC3B (**B**) des zones marquées par un trait (pannels de droite) sont représentées.

J'ai ensuite étudié l'effet de p62 sur la réplication du virus de la rougeole. De manière claire, l'absence de p62 promeut fortement la réplication du virus de la rougeole (*Figure 23*). Ce résultat est en fort contraste avec les observations faites sur T6BP et NDP52, dont l'absence induit une baisse de la réplication virale (cf Manuscrit). De manière intéressante, les travaux de l'équipe ont montré que p62 n'est pas impliqué dans la maturation des autophagosomes, contrairement à T6BP et NDP52 (Verlhac et al., 2015, Annexe 1). Le quatrième récepteur autophagique que j'ai étudié, Optineurine

participe quant à lui à la maturation des autophagosomes mais n'a pas de rôle dans la réplication du virus de la rougeole (cf Manuscrit). Ces résultats montrent que les différents récepteurs autophagiques ont des rôles différents dans la réplication du virus de la rougeole et révèlent potentiellement une complexité au niveau de la population des autophagosomes. En effet, T6BP et NDP52 ont un rôle pro-viral tout en promouvant la maturation des autophagosomes. Optineurine promeut également la maturation des autophagosomes mais n'influence pas la réplication du VR. Enfin, p62 qui n'a pas de rôle dans la maturation, semble avoir un effet antiviral.

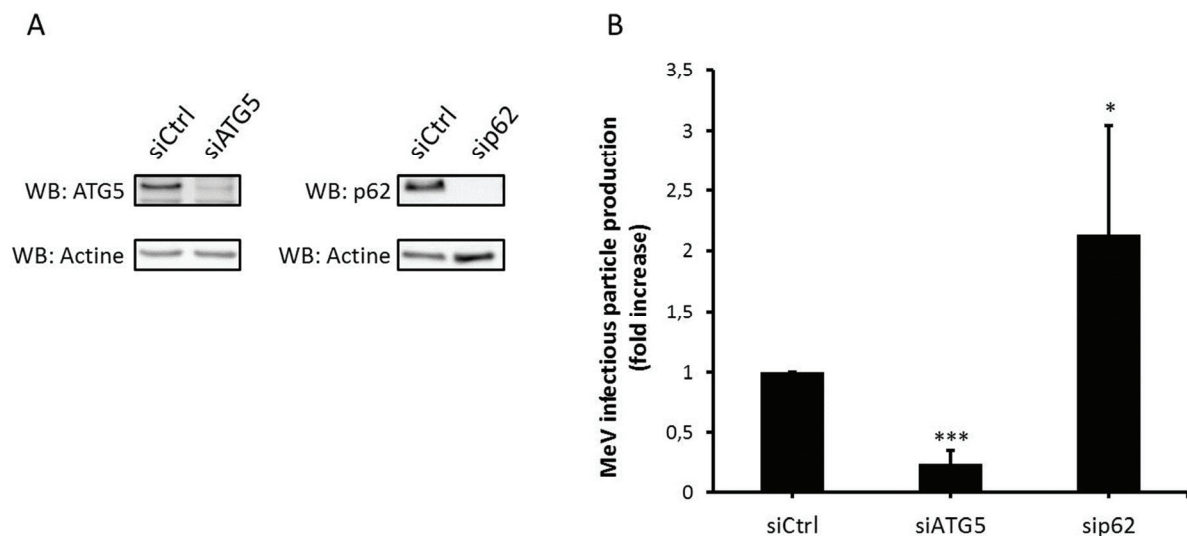


Figure 23 : Rôle de p62 dans la réplication du virus de la rougeole. **A** : Des cellules HeLa ont été traitées avec les siRNA indiqués pendant 48h et l'efficacité d'extinction de l'expression protéique a été analysée par western blot. **B** : Les cellules ont été infectées avec le VR (MOI 0.1). Deux jours après l'infection la production de particules virales infectieuses a été mesurée par titration sur cellules Vero. Sur le graphique sont présentés les moyennes des valeurs indexées par rapport à la condition contrôle \pm l'écartype de 3 expériences indépendantes effectuées en duplicat. Un test de Welch bi-latéral a été effectué. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Il serait donc possible que seulement une partie du pool total d'autophagosomes présents dans la cellule soit utilisée par le VR pour sa réplication. Si cette hypothèse s'avère valide, nos travaux offriront des perspectives intéressantes pour l'étude des différentes populations d'autophagosomes, ainsi que de leurs rôles respectifs dans l'autophagie basale et dans l'autophagie mobilisée contre des agents pathogènes. De plus, nos travaux viennent à compléter la liste des virus pour lesquels le récepteur p62 aurait un rôle antiviral. En effet, les capsides ubiquitinées du virus du Chikungunya (Judith et al., 2013) et du virus Sindbis (Orvedahl et al., 2010) ainsi que la protéine Tat du VIH-1 (Sagnier et al., 2015) sont dégradées par l'autophagie. Cette dégradation a pour but de protéger les cellules infectées d'une accumulation de capsides virales trop importantes qui a un effet cytopathique. Cependant, dans nos travaux, nous observons très rarement une colocalisation entre

p62 et VR-N ou encore entre VR-N et GFP-LC3 (qui permet la visualisation des autophagosomes). Il serait peut être intéressant de refaire ces expériences dans des cellules exprimant la sonde GFP-LC3 et dans lesquelles la maturation est bloquée par l'utilisation de drogues. De même, nous pouvons effectuer ce type d'expériences dans des cellules où aucun gène n'est transfecté stablement mais dans lesquelles nous marquons LC3 endogène. En effet la protéine GFP, étant sensible au pH, sa fluorescence diminue fortement quand elle se trouve dans un environnement acide. Ainsi si le virus de la rougeole induit un flux autophagique trop rapide il y a un risque que nous n'ayons pas visualisé une colocalisation entre VR-N et des amphisomes ou des autolysosomes.

Nous pouvons aussi supposer qu'une autre protéine du VR, essentielle à sa réplication ou à la formation de particules virales infectieuses soit dégradée par l'autophagie dans la mesure où l'inhibition de l'autophagie n'induit pas une accumulation des protéines VR-N ou VR-P. Une telle observation pourrait expliquer à la fois la forte production de particules virales en l'absence de p62 et la colocalisation très rare entre LC3 et VR-N. Le mécanisme par lequel p62 opère son rôle antiviral, ainsi que les effets que l'absence de p62 a sur les cellules devront être élucidés, afin de mieux comprendre l'infection par le VR ainsi que la régulation de l'autophagie en contexte infectieux.

C. Discussion et perspectives

Mes travaux de thèse ont pour but de mieux comprendre les mécanismes qui régulent l'autophagie en particulier dans le contexte d'infection par le virus de la rougeole. Grâce à l'observation des perturbations induites par l'infection par le VR et de leurs conséquences, nous avons pu identifier un nouveau régulateur de la maturation des autophagosomes, le récepteur autophagique T6BP. Nous avons observé en effet que l'extinction de son expression compromet la réplication du VR mais aussi la maturation des autophagosomes. Nous avons fait la même observation lors de l'inhibition de l'expression de NDP52, un autre récepteur autophagique, déjà décrit par notre équipe comme impliqué dans la régulation de la maturation des autophagosomes (Verlhac et al., 2015, Annexe 1). Ainsi, nous proposons un modèle de travail dans lequel la maturation des autophagosomes serait régie par ces différentes protéines individuellement. Nous proposons également que ces autophagosomes sont exploités par le VR dans son cycle viral. Ces idées sont développées dans la suite de cette discussion. Le figure ci-dessous réappelle les connaissances sur les liens entre l'autophagie et le virus de la rougeole, ainsi que sur l'implication des récepteurs T6BP et NDP52 dans la xénophagie de *Salmonella typhimurium*.

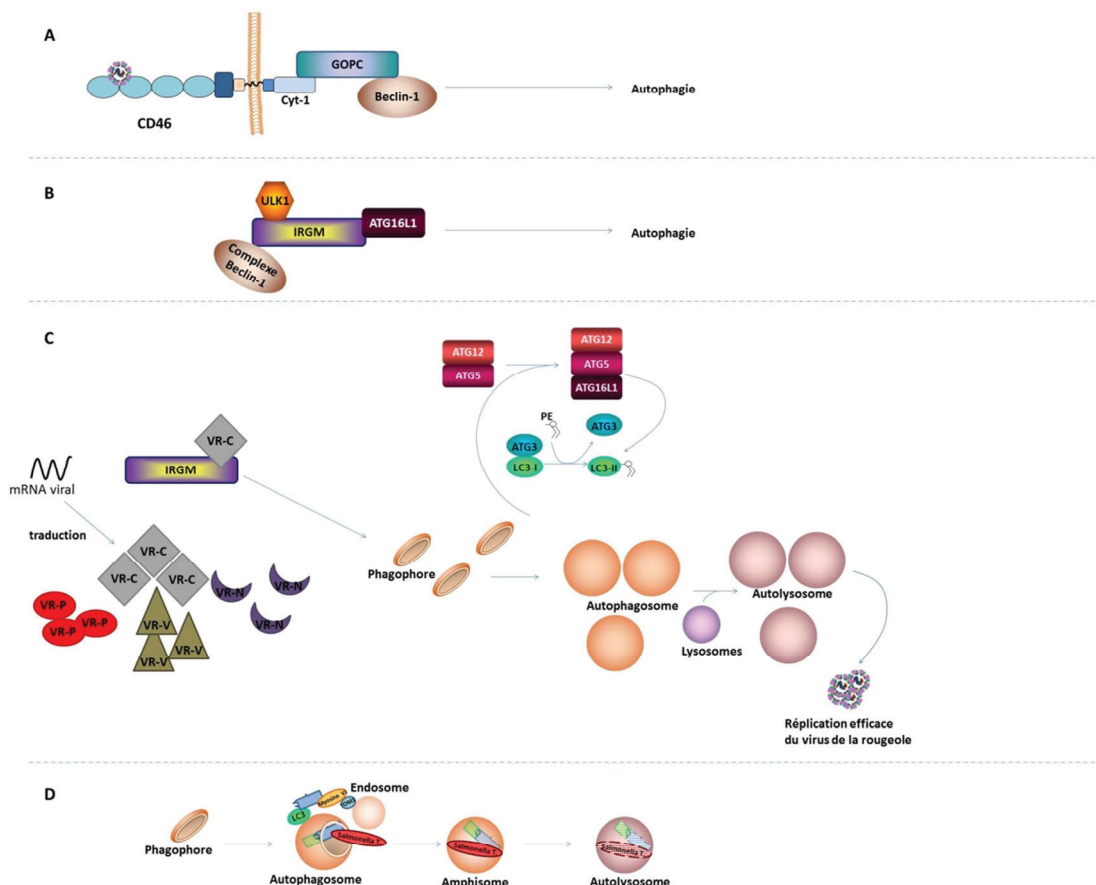


Figure 24 : Rappels sur les liens autophagie-virus de la rougeole et sur la xénophagie de *S. Typhimurium*

A : Induction de l'autophagie par l'attachement du VR au récepteur CD46. **B :** Rôle d'IRGM dans l'induction de l'autophagie. **C :** Le VR induit un flux autophagique complet par un mécanisme IRGM-dépendant. **D :** T6BP et NDP52 assurent la capture de *S. Typhimurium* et la maturation des autophagosomes qui la contiennent.

I Rôle antiviral de l'autophagie sur le VR

I.1 Autophagie CD46-dépendante

Nous avons déjà évoqué les travaux de l'équipe décrivant une première vague d'autophagie très tôt après l'infection par les souches atténuées du virus de la rougeole (au bout de 1.5h) (Richetta et al., 2013). A ce jour le rôle précis de cette induction n'est pas encore clairement défini. Cependant l'équipe a montré que les souches virulentes (qui n'utilisent pas cette protéine comme récepteur d'entrée) n'induisent pas l'autophagie par ce biais. Ainsi une hypothèse possible serait que cette autophagie contribuerait au caractère atténué des souches utilisant le récepteur CD46 lors de l'infection. En effet il serait possible que l'autophagie CD46-dépendante dégrade des protéines virales rapidement après le début de l'infection afin de combattre cette infection. Une autre possibilité serait que l'autophagie induite par l'engagement de CD46 contribue à la sécrétion d'IFN-I afin d'établir un état antiviral et de limiter la dissémination du virus. Il serait donc intéressant d'analyser l'induction de l'autophagie lors de l'infection de cellules capables de sécréter des quantités détectables d'IFN-I et de doser cette cytokine lors d'infection de cellules qui ne sont pas compétentes pour l'autophagie. Enfin, cette première vague d'autophagie pourrait aussi contribuer à la présentation antigénique et à l'établissement d'une réponse adaptative plus efficace comparée au virus sauvage. Il serait donc intéressant d'étudier par exemple la sécrétion d'IL-2 lors de co-cultures de lymphocytes T CD4+ spécifiques d'antigènes du VR et des cellules dendritiques dérivées de monocytes autologues, compétents ou non pour l'autophagie et infectées avec le virus de la rougeole. Afin de s'assurer qu'uniquement l'autophagie dépendante de CD46 soit induite, il faudrait infecter les cellules dendritiques avec le virus déficient pour la protéine C. Nous pourrions également comparer les résultats obtenus avec un virus atténué et un virus sauvage (incapable d'induire l'autophagie CD46-dépendante).

I.2 Le récepteur autophagique p62 et le VR

Nous avons étudié le rôle de certains récepteurs autophagiques dans l'infection par le virus de la rougeole. Parmi eux, nous avons analysé l'effet de la protéine p62 sur la réplication du virus (partie **Error! Reference source not found.**). De manière intéressante, p62 n'a pas de rôle dans la maturation des autophagosomes (Verlhac et al., 2015, Annexe 1). Comme les récepteurs T6BP et NDP52 semblent être impliqués dans la maturation, nous aurions pu supposer que p62 ne joue aucun rôle dans la réplication virale. Toutefois, l'extinction de l'expression de p62 conduit à une

augmentation de plus de deux fois de la production de particules virales infectieuses. Ainsi, p62 contribuerait à contrôler la réplication du virus de la rougeole. La première hypothèse pour expliquer cette observation serait qu'un ou plusieurs éléments viraux, essentiels à la réplication virale, sont dégradés par autophagie à l'instar du virus du Chikungunya ou le virus Sindbis dont les protéines de capsidie respectives sont dégradées par l'autophagie, grâce à la reconnaissance par p62 (Judith et al., 2013; Orvedahl et al., 2010). Cependant mes données, qui corroborent avec celles déjà publiées par l'équipe (Richetta et al., 2013), montrent que l'inhibition de l'autophagie n'induit pas l'accumulation de VR-N ou VR-P. L'inhibition de la maturation des autophagosomes, que ce soit par des inhibiteurs pharmacologiques ou par l'extinction des gènes qui y jouent un rôle n'a également pas d'effets majeurs sur les niveaux d'expression de ces deux protéines virales. En accord avec ces résultats, je n'ai observé une colocalisation entre VR-N et LC3 qu'à de très rares occasions. En revanche il serait intéressant d'étudier les niveaux d'expression des autres protéines virales lors de l'inhibition de l'autophagie. En outre nous pourrions aussi étudier la colocalisation des protéines virales (y compris de VR-N et VR-P) avec LC3 endogène qui serait marqué par des anticorps spécifiques. Nous pourrions également étudier si une éventuelle colocalisation entre LC3 et une ou des protéines virales est perturbée par l'absence de p62.

II Rôle pro-viral de l'autophagie sur le VR

II.1 VR et induction de l'autophagie

Nous avons déjà indiqué que la protéine non structurale VR-C est capable d'interagir avec IRGM afin d'induire l'autophagie et de faciliter la réplication virale, comme des travaux de l'équipe l'ont récemment montré (Grégoire et al., 2011). De plus, la simple surexpression de VR-C est capable d'induire l'autophagie. En outre, dans les mêmes travaux, le criblage en double hybride chez la levure a révélé une interaction possible entre p62 et VR-N d'une part et entre IRGM et VR-N d'autre part. Ainsi il serait possible que l'expression de VR-N soit également capable d'induire l'autophagie mais que cette induction soit limitée par l'interaction entre p62 et VR-N qui empêcherait l'interaction entre VR-N et IRGM. Comme il est impossible de générer un virus déficient pour une protéine structurale, telle que la nucléoprotéine VR-N, une autre stratégie devrait être employée. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant d'observer l'activité autophagique et la réplication virale lors de l'infection de cellules n'exprimant ou pas p62 avec un virus déficient pour la protéine VR-C au moment où l'autophagie IRGM-dépendante (seconde vague de l'autophagie (Richetta et al., 2013))

est induite. Dans ce cas de figure, une éventuelle induction de l'autophagie ne mettrait pas en jeu la protéine C, et la protéine p62 n'interférerait pas avec une induction qui serait opérée par VR-N.

Mes travaux sur la protéine IRGM suggèrent également une interaction possible entre IRGM et p62 (partie **Error! Reference source not found.**). Cette interaction peut être directe ou indirecte et pourrait s'effectuer par l'intermédiaire de LC3C (qui est capable d'interagir avec les deux protéines). Ainsi, dans le même ordre d'idée que celui du paragraphe précédent, il serait envisageable que p62 séquestre IRGM et le rende moins disponible pour l'interaction avec VR-C et donc pour l'induction de l'autophagie, limitant par conséquent la réplication virale. L'absence de p62 libérerait IRGM, le rendant entièrement accessible et disponible pour l'interaction avec VR-C et l'induction de l'autophagie qui promeut la réplication virale (*Figure 26*). Ainsi il serait intéressant de comparer les activités autophagiques dans des cellules infectées par le virus de la rougeole qui expriment ou pas la protéine p62 par des approches de western blot (conversion de LC3-I en LC3-II) et de microscopie confocale (quantité de structures ponctiformes GFP-LC3 dans des cellules exprimant cette construction de façon stable). Une autre approche permettant d'explorer l'une ou l'autre de ces hypothèses serait d'étudier la localisation subcellulaire respective de VR-C et IRGM lorsque p62 est exprimé ou non.

En conclusion les hypothèses que p62 empêche une éventuelle induction de l'autophagie par VR-N *via* son interaction avec cette protéine et l'hypothèse que p62 séquestre IRGM, l'empêchant ainsi d'interagir avec VR-C, pourraient expliquer le rôle antiviral de p62 que nous avons observé.

II.2 VR et maturation autophagique

II.2.1 T6BP : un nouveau régulateur de la maturation

Mes travaux ont permis d'identifier le récepteur autophagique T6BP en tant que régulateur de la maturation des autophagosomes (cf Manuscrit, Figure 1). En effet, l'extinction de son expression induit une augmentation du nombre d'autophagosomes et une baisse du nombre d'autolysosomes. Des travaux antérieurs de l'équipe ont identifié les protéines NDP52 et Optineurine comme étant impliquées dans la maturation des autophagosomes (Verlhac et al., 2015, Annexe 1). NDP52, qui est structurellement très proche de T6BP possède un domaine de liaison à la protéine moteur Myosine VI, associée à l'actine qui lie la protéine endosomale Tom1 (Morriswood et al., 2007). NDP52 porte aussi un domaine de liaison à LC3 (domaine LIR) qui lui permet de s'associer aux autophagosomes. Ainsi NDP52 sert d'intermédiaire entre les autophagosomes et les endosomes et contribue à la maturation des autophagosomes.

T6BP possède également un domaine de liaison à la Myosine VI et des domaines LIR (Morriswood et al., 2007; Newman et al., 2012). Ces deux caractéristiques pourraient expliquer le mécanisme par lequel T6BP joue également un rôle dans la maturation des autophagosomes. En effet le(s) domaine(s) LIR pourraient lier les autophagosomes grâce à des liaisons avec au moins une des protéines LC3 présentes au niveau de la membrane autophagosomale, par exemple LC3B. Les rôles respectifs de ces domaines LIR ne sont pas encore détaillés, mais leur mutation individuelle compromet la formation de structures ponctiformes correspondant à des autophagosomes (Newman et al., 2012). Par ailleurs, la liaison de T6BP à la Myosine VI pourrait avoir les mêmes conséquences que celle de NDP52. Il serait donc intéressant d'analyser si T6BP colocalise avec Tom1 et d'autres marqueurs endosomaux. Ainsi, T6BP pourrait être impliqué dans le rapprochement entre les autophagosomes et les endosomes, à l'instar de NDP52. Il serait donc intéressant de détailler le mécanisme par lequel T6BP régule la maturation en identifiant avec précision les domaines de T6BP qui sont impliqués.

II.2.2 Rôle de la maturation dans la réplication du VR

Nous avons démontré que T6BP et NDP52 sont intrinsèquement nécessaires pour la réplication du virus de la rougeole, puisque la réduction de leur expression induit une baisse drastique de la production de particules virales infectieuses (cf Manuscrit, Figure 2 A et B). Ce résultat est en accord avec des données publiées de l'équipe concernant la nécessité d'un flux autophagique complet pour une réplication virale efficace. En effet, le blocage de la maturation des autophagosomes par des inhibiteurs pharmacologiques induit une baisse de la réplication virale (Richetta et al., 2013). Ainsi nous pouvons suggérer que le rôle de T6BP et NDP52 dans la réplication virale serait lié à leur rôle dans la maturation.

Des travaux récents de l'équipe, ont montré que Optineurine régule aussi positivement la maturation (Verlhac et al., 2015, Annexe 1). Cependant lors de mes travaux, j'ai montré que l'absence de cette protéine n'influence pas la réplication virale. En outre Optineurine, étant un récepteur autophagique, possède également un domaine LIR et il est aussi capable de lier la Myosine VI (Sahlender et al., 2005). Ainsi ces deux caractéristiques qui sont communes aux trois récepteurs sont probablement fortement impliquées dans la maturation des autophagosomes mais ne sont pas décisives pour le rôle d'un récepteur donné dans la réplication virale. Il est donc important de s'assurer que le rôle de T6BP et NDP52 dans la réplication du VR s'opère bien grâce à leur capacité de réguler la maturation des autophagosomes, dans la mesure où Optineurine pourrait réguler la maturation par le même mécanisme que NDP52 (ce qui est très probablement le cas pour T6BP également).

Afin de confirmer le rôle de la maturation des autophagosomes dépendante de T6BP et de NDP52 dans l'efficacité de la réplication virale, nous avons traité des cellules déficientes pour l'expression de l'un ou l'autre de ces récepteurs autophagiques avec des inhibiteurs pharmacologiques de la maturation. Nous avons utilisé la Chloroquine ou la Bafilomycine A1 qui inhibent l'acidification des lysosomes (cf Manuscrit, Figure 5 A et B). Nous avons traité les cellules avec des concentrations non-saturantes de l'un ou l'autre, de ces inhibiteurs et nous avons observé une forte inhibition de la réplication virale, un résultat déjà publié par l'équipe. Cependant, nous avons observé que dans ces conditions, l'extinction de l'expression de T6BP ou NDP52 induit une chute de la production virale encore plus spectaculaire comparée aux cellules traitées uniquement avec la Chloroquine ou la Bafilomycine A1. Ainsi l'inhibition de la maturation due à une réduction de l'expression de T6BP et NDP52 exacerbe le défaut de réplication du VR imposé par la Chloroquine ou la Bafilomycine A1. Ceci suggère qu'en effet le rôle pro-viral de ces deux récepteurs autophagiques s'opère grâce à leur capacité à promouvoir la maturation des autophagosomes. De manière intéressante, ce résultat suggère également l'existence possible de sous-populations d'autophagosomes, dont certains seraient utilisés par le VR pour sa réplication tandis que d'autres non. En effet les inhibiteurs pharmacologiques de la maturation ne sont pas spécifiques : ils bloquent la maturation du pool total des autophagosomes. Cependant, nous avons utilisé des concentrations non saturantes, ce qui signifie qu'il persiste des autophagosomes capables d'achever leur maturation. L'inhibition de l'expression de l'un ou l'autre de ces récepteurs autophagiques est capable d'inhiber davantage la maturation et de compromettre encore plus la réplication virale.

L'hypothèse de l'existence d'autophagosomes dont la maturation serait régulée par l'un ou l'autre de ces récepteurs est soutenue aussi par l'observation que l'inhibition simultanée de l'expression de T6BP et de NDP52 conduit à une plus faible réplication du virus de la rougeole comparée au cas où seulement un des deux gènes est inhibé (cf Manuscrit, Figure 5 C). Ainsi nous pouvons imaginer que lorsque T6BP est inhibé, le virus de la rougeole se réplique grâce aux autophagosomes utilisant NDP52 pour leur maturation et inversement.

Cette hypothèse est très attrayante et il serait intéressant de la confirmer car elle ouvrirait d'importants champs d'investigation non seulement concernant l'autophagie viro-induite et la biologie du VR, mais également concernant les mécanismes de régulation de l'autophagie basale. En effet, il est actuellement admis que les autophagosomes mûrent sous l'action de plusieurs protéines y compris T6BP, NDP52 et Optineurine. Nous proposons ici une idée nouvelle selon laquelle la maturation d'autophagosomes distincts serait régie par des protéines différentes. Une première approche pour le faire serait le marquage des formes endogènes T6BP, NDP52, Optineurine dans des cellules exprimant GFP-LC3 de façon stable et traitées à la Chloroquine ou à la Bafilomycine

A1 afin de bloquer la maturation des autophagosomes et d'amplifier ainsi les signaux. En effet, il serait possible de visualiser les autophagosomes portant le ou les différents récepteurs autophagiques colocalisant avec LC3 (donc avec les autophagosomes) et nous pourrions observer si certains des récepteurs colocalisent sur un même autophagosome ou bien si leur présence au niveau d'un même autophagosome est entièrement ou partiellement exclusive.

Il serait intéressant de détailler le mécanisme par lequel T6BP et NDP52 contribuent à la maturation bénéfique au VR. Notre équipe a déjà déterminé l'importance du domaine de la liaison à la Myosine VI sur NDP52 dans la maturation des autophagosomes lors de l'infection par *Salmonella Typhimurium* (Verlhac et al., 2015, Annexe 1). T6BP possède probablement la capacité de réguler la maturation des autophagosomes de la même manière que NDP52 puisque les deux protéines lient le même segment de la Myosine VI (Morriswood et al., 2007). Il est à noter que récemment il a été montré que le récepteur T6BP, ainsi que la Myosine VI sont essentiels pour l'élimination de *Salmonella Typhimurium*. En effet en absence de T6BP la bactérie s'accumule dans des cellules infectées. L'absence de la Myosine VI entraîne l'accumulation de la bactérie dans des autophagosomes positifs pour LC3. De plus le domaine LIR atypique ayant la séquence LVV (cf paragraphe 1.2.5.d) a été montré comme étant responsable de la liaison entre T6BP et LC3B (Tumbarello et al., 2015). Ces observations soutiennent notre hypothèse que T6BP régule la maturation des autophagosomes par le même mécanisme que NDP52.

Nous pourrions générer des mutants pour les domaines Myosine VI de T6BP, NDP52 et Optineurine et d'observer les effets de ces mutants sur la maturation d'une part et sur la réplication du virus de la rougeole d'autre part dans des expériences de complémentation. Nous nous attendrions à ce que la liaison de T6BP ou Optineurine à la Myosine VI soit requise pour la maturation des autophagosomes. Si l'expression de T6BP ou NDP52 mutants pour ce domaine ne restaure pas une efficacité de réplication virale proche de celles où les protéines sauvages respectives ont été re-exprimées, nous pourrions alors conclure que les effets de ces deux récepteurs autophagiques sur la réplication du virus de la rougeole dépendent de la maturation autophagosomale assurée par la fusion entre les autophagosomes et les endosomes par un mécanisme dépendant de la Myosine VI. Une attention particulière devra être portée à l'effet du mutant d'Optineurine déficient pour son domaine de liaison à la Myosine VI sur la réplication du VR. Enfin pour confirmer le rôle de la maturation des autophagosomes dans la réplication du VR nous pourrions observer la production de particules virales infectieuses dans des cellules dans lesquelles l'expression de la Myosine VI a été inhibée.

Si la maturation des autophagosomes seule s'avère définitivement être un mécanisme majeur qui soutient l'activité pro-virale de T6BP et NDP52, il serait primordial de comprendre ce qui

différentie sur le plan biologique, et notamment vis-à-vis du virus de la rougeole, les autophagosomes dont la maturation dépend des différents récepteurs en jeu. En effet, comme nous l'avons déjà signalé, Optineurine est également responsable de la maturation des autophagosomes, mais curieusement n'a pas de rôle dans la réplication virale, ce qui nous incite à envisager l'existence de plusieurs types d'autophagosomes dans la cellule qui se distinguent entre eux par le type de récepteurs mobilisés (cf Manuscrit, Figure 5 D).

Enfin, comme nous l'avons déjà décrit, le virus de la rougeole induit la formation de syncytia, lui permettant de se répliquer et notre équipe a montré que la formation de syncytia induit l'autophagie également (Richetta et al., 2013). De plus, les cellules incapables de faire de l'autophagie, forment des syncytia qui sont plus petits et moins nombreux (Delpeut et al., 2012). Ainsi nous pourrions déterminer si la maturation des autophagosomes régulée par T6BP et NDP52 joue un rôle dans la formation de syncytia. De même il serait intéressant d'analyser un rôle éventuel d'Optineurine dans la formation de syncytia. Si l'absence de ce récepteur ne perturbe pas de manière significative la formation de syncytia par les cellules infectées, ceci pourrait donner un élément de réponse quant au rôle différentiel des récepteurs T6BP, NDP52 et Optineurine dans l'infection par le VR.

III La voie NF- κ B et la réplication du VR

Il est possible que le rôle pro-viral de T6BP et NDP52 implique l'inhibition de la voie NF- κ B qui active la transcription de nombreux gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires et qui conduit à une réponse antivirale. En effet, plusieurs études ont montré un rôle de T6BP et NDP52 dans la modulation de la voie NF- κ B. Il a été par exemple montré que T6BP inhibe l'activation de cette voie *via* son interaction avec l'adaptateur TRAF6 et la déubiquitine A20 dans la lignée épithéliale HEK 293T et des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) (Morriswood et al., 2007; Shembade et al., 2011). Par ailleurs, NDP52 est responsable de la dégradation sélective de TRAF6 et TRIF par un mécanisme autophagique indépendant de Beclin-1 (Inomata et al., 2012). Dans le cas de la dégradation de TRIF, le domaine C-terminal de NDP52, contenant la zone d'interaction avec Myosine VI est indispensable à cette dégradation. TRAF6 quant à lui est agrégé par l'action de NDP52 puis dégradé par autophagie. Ainsi NDP52 a un rôle inhibiteur de l'activation de la voie NF- κ B. Nous pouvons donc supposer que les rôles pro-viraux de T6BP et NDP52 vis-à-vis du virus de la rougeole impliquent leurs actions inhibitrices sur la voie NF- κ B qui pourraient être potentialisées par le virus lui-même. Cependant dans notre modèle expérimental, nous avons utilisé des cellules HeLa, qui répondent très faiblement à une stimulation des TLRs en raison de leur faible expression. Il serait

donc intéressant d'étudier la réplication du virus dans des cellules déficientes pour T6BP ou NDP52 mais compétentes pour les étapes précoces d'activation de la voie NF- κ B.

Il existe aussi une voie non-canonique de la signalisation NF- κ B, comme d'écrit dans le paragraphe I.3.2.b. La dégradation de T6BP et NDP52 par autophagie active cette voie NF- κ B non canonique dans des cellules A549 (cellules épithéliales humaines issues de carcinome pulmonaire), comme l'atteste la translocation du membre de la famille NF- κ B RelB dans le noyau (Newman et al., 2012). Cependant une dégradation de ces deux récepteurs par l'autophagie induite par le virus de la rougeole serait vraisemblablement délétère pour le virus, ainsi nous devrions supposer soit une absence complète d'une implication de cette voie NF- κ B non-canonique dans notre modèle, soit - une inhibition de la dégradation des récepteurs par l'autophagie qui serait opérée activement par le virus.

Un élément de réponse concernant le lien potentiel entre le rôle pro-viral de T6BP et NDP52 et la voie NF- κ B vient de nos expériences effectuées sur des cellules déficientes pour cette voie. En effet nous avons utilisé des cellules dans lesquelles l'expression du membre de la famille NF- κ B p65 (RelA) a été réprimée par l'expression stable de shRNA dont l'efficacité d'inhibition de la voie NF- κ B a déjà été démontrée (Nivon et al., 2009). Dans ces cellules, l'inhibition de la voie NF- κ B se fait en aval de la stimulation des PRR, et des effets éventuels de la dégradation de TRAF6 et TRIF par l'autophagie et sous l'action de T6BP ou NDP52 ne sont donc certainement pas impliqués dans la régulation de l'infection par le VR. En outre certains virus comme le Cytomégalovirus humain dégradent NEMO, qui est nécessaire à l'activation de la voie NF- κ B (cf paragraphe I.3.2.b). Il serait donc intéressant d'explorer une telle possibilité. Nous avons montré qu'en effet les cellules déficientes pour la voie NF- κ B soutiennent une plus forte production de particules virales infectieuses que des lignées de cellules shContrôle (une exprimant un shRNA ne ciblant à priori aucun ARN messager cellulaire et l'autre exprimant un shRNA seulement partiellement complémentaire à l'ARNm de p65), indiquant un rôle probable de la voie NF- κ B dans le contrôle de l'infection par le VR (cf *Manuscrit, Figure 3 B*). Il est intéressant de noter que le virus de la rougeole a déjà été décrit comme sensible à l'activation de la voie NF- κ B et qu'il est capable d'inhiber cette voie par l'interaction de la protéine VR-V avec p65 dans des cellules HEK293T (Schuhmann et al., 2011). Cependant, l'inhibition de l'expression de T6BP ou NDP52 dans les cellules déficientes pour la voie NF- κ B a révélé une baisse de la réplication virale, suggérant un rôle de ces deux récepteurs dans l'infection par le virus de la rougeole, qui serait indépendant de la voie NF- κ B (cf *Manuscrit, Figure 3 G*).

Il est important de noter qu'Optineurine est également capable de moduler, selon les modèles, soit positivement soit négativement, la voie NF- κ B (Kachaner et al., 2012). Cependant,

comme nous l'avons déjà évoqué, nous n'avons pas observé d'impact de l'absence de ce récepteur sur la réplication virale. Ainsi il apparait probable que le rôle pro-viral de T6BP et NDP52 soit principalement dû à leur rôle de la régulation de la maturation des autophagosomes. Si nous ne pouvons pas à ce stade exclure une implication de la voie NF- κ B, contrôlée par T6BP/NDP52, dans la réplication du VR, elle semble toutefois marginale.

IV Modèles

IV.1 Des substrats ciblés par les différents récepteurs sont bénéfiques ou non au VR

Des travaux récents de notre équipe ont montré que NDP52 régule la maturation d'autophagosomes contenant *S typhimurium* en plus de son rôle de récepteur pour cette bactérie. Dans le modèle proposé par l'équipe, le ciblage de la bactérie vers l'autophagosome serait couplé à sa fusion avec un endosome, ce qui permet une dégradation rapide par xénophagie. Nous pouvons ainsi supposer que des autophagosomes distincts renfermeraient sélectivement des substrats particuliers dont la dégradation serait cruciale pour la réplication virale. Par exemple, il a été récemment montré que NDP52 et Optineurine, en plus de leur rôle de récepteurs à pathogènes initialement décrit, sont les récepteurs principaux de la mitophagie (Lazarou et al., 2015). La protéine T6BP a également été décrite par la même équipe comme un récepteur pour la mitophagie, bien que dans une moindre mesure, comparé aux deux autres récepteurs. En outre ces trois protéines ont chacune été décrites comme requise pour l'élimination de *Salmonella Typhimurium* par xénophagie (Thurston et al., 2009; Tumbarello et al., 2015; Wild et al., 2011). Ainsi ces récepteurs ont clairement des rôles multiples (sélection et ciblage vers la machinerie autophagique d'agents pathogènes intracellulaires mais également des substrats cellulaires, ainsi que maturation des autophagosomes). Dans notre cas particulier, la mitophagie ne pourrait pas expliquer le rôle pro-viral de T6BP et NDP52 puisque le défaut d'expression du récepteur Optineurine n'a pas eu d'effet sur la réplication virale. Cependant, l'existence d'un substrat commun à T6BP et NDP52 mais pas à Optineurine, et dont la dégradation contribue à la réplication virale, est tout-à-fait possible (*Figure 25*).

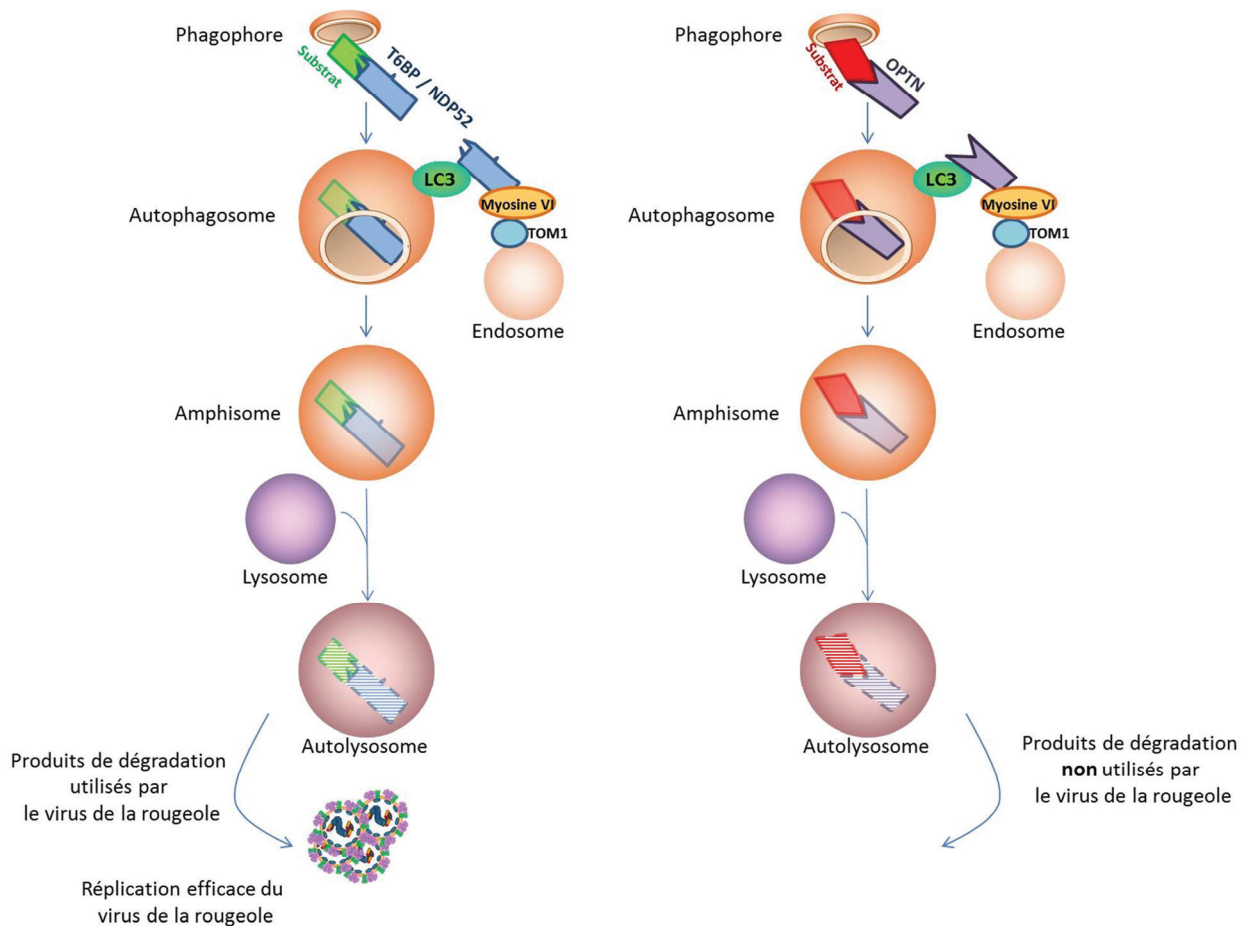


Figure 25 : Modèle : Les différents récepteurs autophagiques ciblent différents substrats.

Les différents récepteurs autophagiques détectent différents substrats et les ciblent vers l'autophagie pour dégradation. La maturation des autophagosomes les contenant est régulée par ces mêmes récepteurs autophagiques. La dégradation des substrats reconnus par T6BP ou NDP52 serait bénéfique pour la réplication virale, tandis que la dégradation de ceux reconnus par Optineurine n'aurait pas d'influence.

IV.2 Le VR pourrait entièrement contrôler l'autophagie à son bénéfice

Une autre possibilité que nous pouvons envisager serait que le VR soit capable d'induire activement la biogénèse d'autophagosomes qui lui seront utiles pour une réplication efficace et qui sont à priori ceux dont la maturation dépendra de T6BP et/ou de NDP52. En effet le virus de la rougeole interfère avec l'autophagie à tous les niveaux puisque comme nous l'avons décrit le VR induit l'autophagie d'une part (Grégoire et al., 2011; Richetta et al., 2013) et modulerait potentiellement la maturation des autophagosomes grâce à ses interactions avec T6BP et NDP52 d'autre part (cf Manuscrit, Figure 4 C et D). Ainsi il ne serait pas exclu que les autophagosomes induits lors de l'infection soit ceux qui contribuent à une réplication virale optimale et qui soient ceux

dont la maturation soit régie par T6BP et NDP52 (*Figure 26*). Afin de vérifier cette hypothèse nous pourrions dans un premier temps observer la morphologie du contenu d'autophagosomes qui localisent près de l'un ou l'autre de ces récepteurs dans des cellules infectées par le VR ou pas et traitées avec de la Chloroquine ou de la Bafilomycine A1 en microscopie électronique de transmission. Ainsi nous pourrions analyser si la fraction d'autophagosomes qui localisent avec ces récepteurs autophagiques est enrichie dans les cellules infectées par rapport aux cellules non infectées. Des différences éventuelles dans le contenu de ces autophagosomes pourraient nous indiquer une sélectivité envers des substrats cellulaires potentiellement contrôlée par le virus. Afin de mieux caractériser les substrats nous pourrions effectuer des marquages pour différents organites, tels que les gouttelettes lipidiques par exemple. En effet certains virus comme par exemple le virus de la dengue, induisent la lipophagie afin de profiter des acides gras qui seront utilisés pour la génération de l'ATP requis pour la réplication du virus (Heaton and Randall, 2010). Une autre approche serait d'isoler les autophagosomes de cellules infectées ou non par le virus de la rougeole et qui expriment ou pas chacun des trois récepteurs autophagiques et identifier les différents substrats qui peuvent y être renfermés par spectrométrie de masse.

Ainsi le VR pourrait induire la formation et la maturation d'autophagosomes qui sont bénéfiques pour sa réplication, et ce à travers différentes interactions de ses protéines avec des régulateurs de l'autophagie. En effet, l'interaction entre la protéine C du VR et IRGM induit l'autophagie comme nous l'avons déjà décrit. Par ailleurs, il a été récemment montré qu'IRGM occupe une place centrale dans l'initiation de l'autophagie grâce à ses interactions avec les protéines ULK1, ATG16L1 et Beclin-1 (Chauhan et al., 2015). D'après ces travaux, IRGM est également capable de dissocier les protéines Bcl-2 et Rubicon du complexe d'initiation, levant ainsi leur action inhibitrice. De plus, ces interactions sont renforcées lors de l'infection par la souche bactérienne associée à la maladie de Crohn, Adherent-invasive E coli. En outre, dans ces travaux, le groupe de Deretic a montré que le traitement avec le peptidoglycane bactérien muramyl dipeptide (MDP), qui est également un agoniste du récepteur NOD2, ou encore avec du LPS (agoniste de TLR4), induit l'expression d'IRGM et renforce les interactions entre IRGM et ULK1. Cette découverte pourrait contribuer à la compréhension du mécanisme par lequel le VR induit l'autophagie. En effet il serait intéressant de vérifier si l'infection par le VR ne serait pas capable d'induire l'expression d'IRGM et ainsi de favoriser l'autophagie.

L'équipe a montré qu'IRGM est capable d'interagir avec des composants de la machinerie impliquée dans l'élongation des membranes du phagophore : ATG5, ATG10 mais également LC3C. Comme cette protéine interagit aussi avec ATG16L1, il serait possible qu'elle fasse le lien entre les étapes d'initiation et d'élongation du phagophore nouvellement formé. Un tel cas de figure serait profitable au virus qui pourrait éventuellement renforcer ces interactions grâce à la protéine VR-C. Il

serait donc intéressant d'étudier la colocalisation entre IRGM et ses partenaires dans des cellules saines, ainsi que dans des cellules infectées par le VR. Enfin, mes travaux sur IRGM ont montré une interaction potentielle entre IRGM et NDP52 révélée dans des cellules saines dans un système de surexpression des deux protéines. Sachant que la protéine VR-C est capable d'interagir avec NDP52 et IRGM, nous pourrions imaginer que VR-C facilite l'ancrage du récepteur autophagique à la membrane de l'autophagosome en cours de formation, ce qui pourrait expliquer la « sélectivité » de la part du VR pour certains autophagosomes. De la même manière pour expliquer les effets de T6BP sur la réplication du VR nous pourrions vérifier si IRGM serait capable d'interagir avec T6BP également. Ainsi le VR pourrait « accompagner » certains autophagosomes depuis leur formation jusqu'à leur maturation afin d'exploiter pleinement le processus autophagique.

Enfin, puisque plusieurs protéines virales interagissent avec T6BP et NDP52, nous pourrions supposer que le flux autophagique complet serait capable de promouvoir l'assemblage de virions et ou l'adressage des protéines H et F à la membrane plasmique qui est nécessaire au bourgeonnement viral et à la formation de syncytia. En effet dans le cas des protéines VR-N et VR-P, le blocage de l'expression de T6BP ou de NDP52, n'induit pas l'accumulation de ces deux protéines virales (cf Manuscrit, Figure 2 C et D). Cependant, la production de particules virales infectieuses est fortement compromise. Afin de vérifier cette possibilité, nous pourrions évaluer l'expression des autres protéines virales ainsi que leurs localisations subcellulaires respectives. Bien que pour le moment nous ne connaissions pas le mécanisme détaillé par lequel le virus de la rougeole profite du flux autophagique, nos travaux montrent sa capacité d'utiliser certains récepteurs autophagique de manière différentielle. Ainsi ces travaux ouvrent un champ d'investigation intéressant qui pourrait contribuer à une meilleure compréhension du cycle infectieux du virus de la rougeole d'une part et des mécanismes moléculaires de l'autophagie d'autre part.

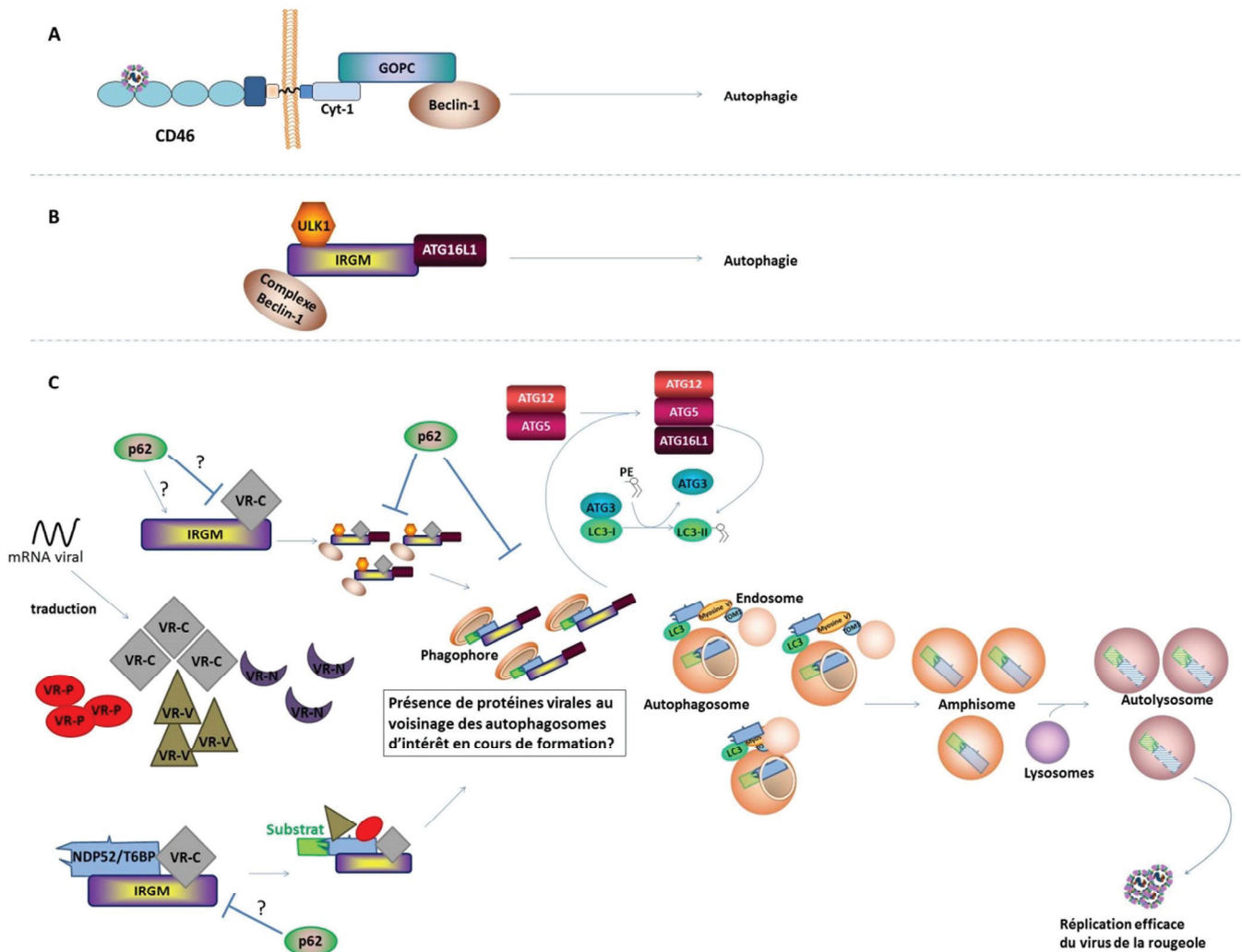


Figure 26 : Modèle : Le virus de la rougeole manipule toutes les étapes de l'autophagie qu'il induit

A : Induction de l'autophagie par l'attachement du VR au récepteur CD46. **B** : IRGM participe à l'induction de l'autophagie grâce à ses interactions avec ULK1, ATG16L1 et le complexe Beclin-1, d'après les travaux de *Deretic et al.* **C** : L'interaction entre IRGM et VR-C pourrait renforcer les interactions entre IRGM et ULK1, ATG16L1 et le complexe Beclin-1 afin d'induire la formation d'autophagosomes. IRGM VR-C et NDP52 (ou T6BP) pourraient former un complexe hétérotrimérique qui serait dirigé vers la machinerie autophagique sous l'action de NDP52 (ou T6BP) et qui emporterait d'éventuels substrats bénéfiques pour le virus à proximité du phagophore. Il pourrait s'allonger autour de ce complexe grâce aux interactions d'IRGM avec ATG16L1 et le rôle de ce dernier dans la formation du complexe ATG5/ATG12/ATG16L1 qui est crucial pour la conjugaison de LC3 à la PE. La maturation de ces autophagosomes est assurée par les mêmes récepteurs NDP52 (ou T6BP) et assure la production de produits de dégradation exploités par le VR pour sa réplication.

V Conclusion

Mon travail de thèse met en évidence une utilisation différentielle des récepteurs autophagiques par le virus de la rougeole et souligne l'importance d'un flux autophagique complet pour une réplication virale optimale. Bien que les mécanismes régissant les différents rôles de ces récepteurs autophagiques dans la réplication du VR, doivent être encore élucidés, mes travaux montrent que certains récepteurs autophagiques peuvent avoir des rôles opposés dans la réplication virale. Cette observation nous conduit à proposer un nouveau modèle de travail basé sur l'existence de plusieurs types d'autophagosomes différents entre eux par la nature des récepteurs mobilisés et dont la maturation serait dépendante de ces récepteurs (T6BP, NDP52 ou Optineurine). Ainsi l'utilisation du virus de la rougeole comme élément perturbateur de ce processus cellulaire, nous a permis de découvrir un nouveau régulateur de la maturation des autophagosomes d'une part, mais aussi d'ouvrir un nouveau champ d'investigation concernant les mécanismes de maturation et leurs implications d'autre part.

Annexes

Annexe I

Article dans Cell Host & Microbe :

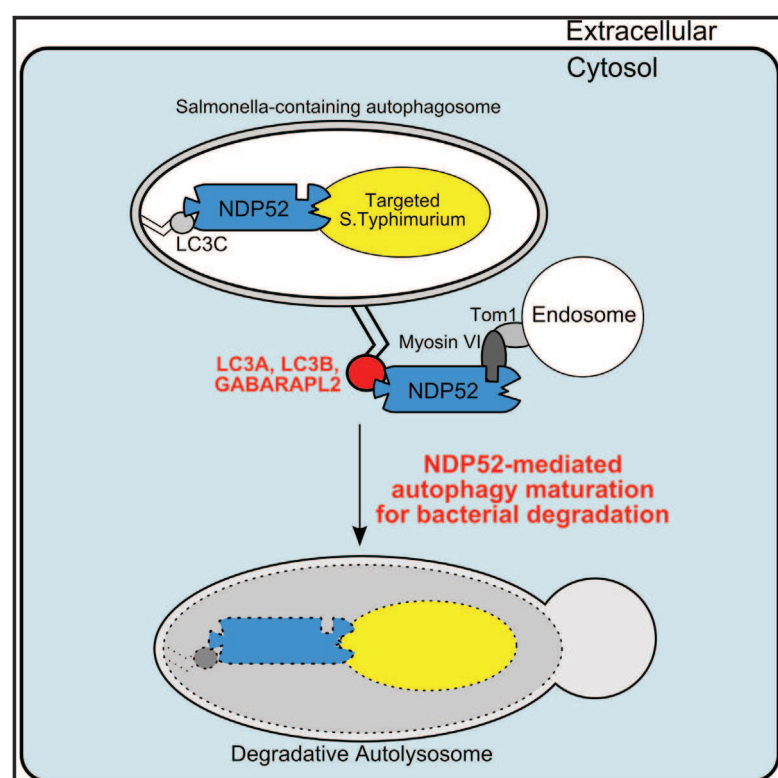
Autophagy Receptor NDP52 Regulates Pathogen-
Containing Autophagosome Maturation

Verlhac P, Grégoire IP, Azocar O, **Petkova DS**, Baguet J,
Viret C, Faure M.

Cell Host & Microbe

Autophagy Receptor NDP52 Regulates Pathogen-Containing Autophagosome Maturation

Graphical Abstract



Authors

Pauline Verlhac, Isabel P. Grégoire, ...,
Christophe Viret, Mathias Faure

Correspondence

mathias.faure@inserm.fr

In Brief

Xenophagy is the degradation of intracellular microorganisms by autophagy. Selective targeting of pathogens to autophagosomes is accomplished by specific autophagy receptors such as NDP52. Verlhac et al. show that, in addition, NDP52 ensures subsequent pathogen degradation by regulating maturation of the pathogen-containing autophagosome for efficient xenophagy.

Highlights

- The autophagy receptor NDP52 plays a dual function during xenophagy
- NDP52 also promotes pathogen-containing autophagosome maturation
- NDP52 independently regulates targeting of bacteria to autophagosomes and maturation
- NDP52 controls autophagy maturation by interacting with ATG8 orthologs and MYOSIN VI

Autophagy Receptor NDP52 Regulates Pathogen-Containing Autophagosome Maturation

Pauline Verlhac,^{1,2,3,4,5} Isabel P. Grégoire,^{1,2,3,4,5} Olga Azocar,^{1,2,3,4,5} Denitsa S. Petkova,^{1,2,3,4,5} Joël Baguet,^{1,2,3,4,5} Christophe Viret,^{1,2,3,4,5} and Mathias Faure^{1,2,3,4,5,*}

¹CIRI, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, 69007 Lyon, France

²Inserm, U1111, 69007 Lyon, France

³CNRS, UMR5308, 69007 Lyon, France

⁴Ecole Normale Supérieure de Lyon, 69007 Lyon, France

⁵Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, 69007 Lyon, France

*Correspondence: mathias.faure@inserm.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2015.02.008>

SUMMARY

Xenophagy, an essential anti-microbial cell-autonomous mechanism, relies on the ability of the autophagic process to selectively entrap intracellular pathogens within autophagosomes to degrade them in autolysosomes. This selective targeting is carried out by specialized autophagy receptors, such as NDP52, but it is unknown whether the fusion of pathogen-containing autophagosomes with lysosomes is also regulated by pathogen-specific cellular factors. Here, we show that NDP52 also promotes the maturation of autophagosomes via its interaction with LC3A, LC3B, and/or GABARAPL2 through a distinct LC3-interacting region, and with MYOSIN VI. During *Salmonella* Typhimurium infection, the regulatory function of NDP52 in autophagosome maturation is complementary but independent of its function in pathogen targeting to autophagosomes, which relies on the interaction with LC3C. Thus, complete xenophagy is selectively regulated by a single autophagy receptor, which initially orchestrates bacteria targeting to autophagosomes and subsequently ensures pathogen degradation by regulating pathogen-containing autophagosome maturation.

INTRODUCTION

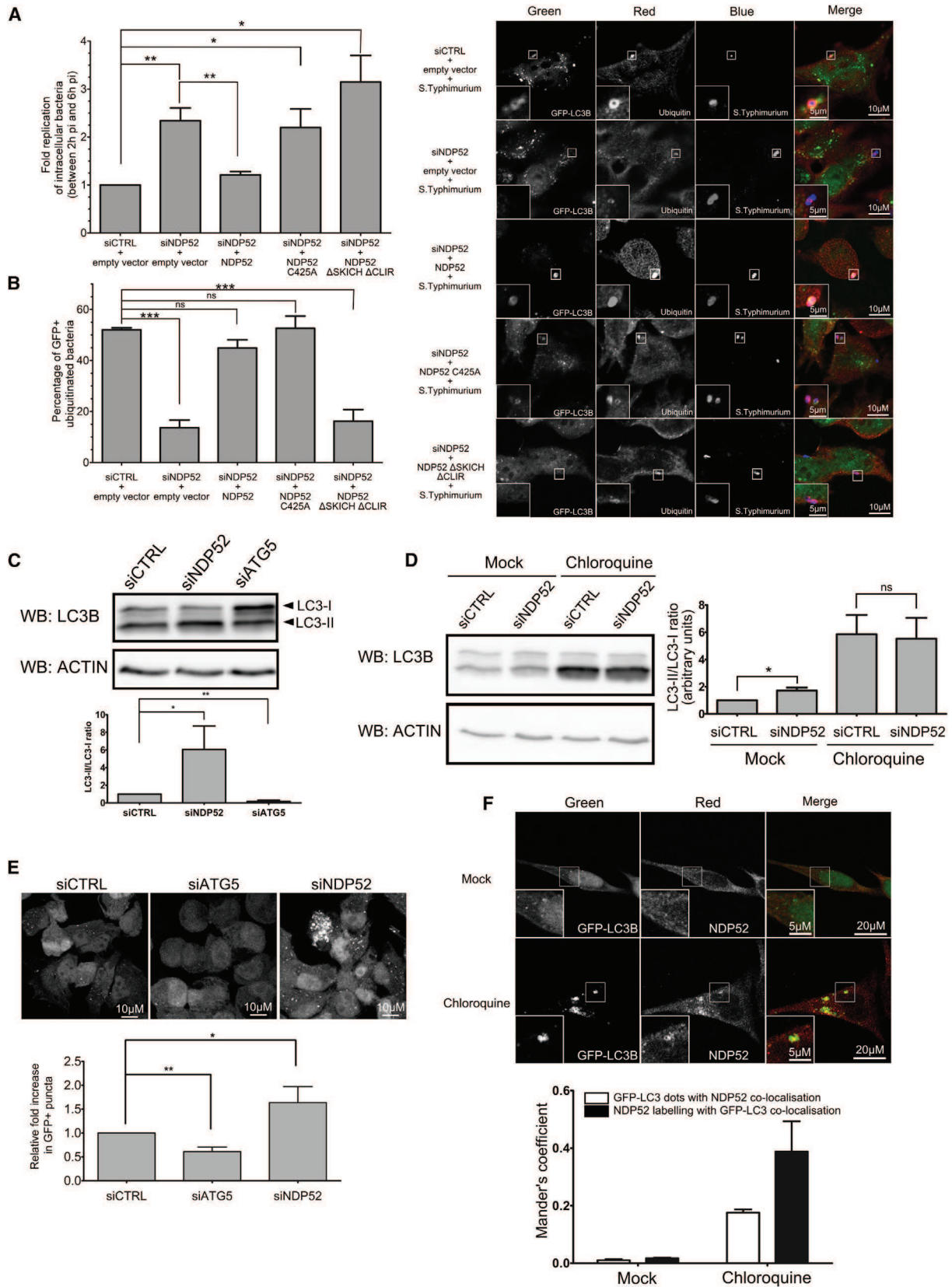
Macroautophagy, hereafter referred to as autophagy, is a lysosomal-related vesicular catabolic process essential for the maintenance of cell homeostasis, as it ensures the constant elimination of end-life or dysfunctional cellular contents. Autophagy is also a response to several sources of cellular stress to avoid accumulation of otherwise deleterious components. Among targets of autophagy are intracellular pathogens (Huang and Brummell, 2014; Levine et al., 2011). To avoid excessive endogenous bystander damage, cells express autophagy receptors, which can selectively detect intracellular pathogens and target them toward the autophagy machinery for degrada-

tion, a process known as xenophagy (Levine, 2005; Randow and Youle, 2014).

Three autophagy receptors for effective xenophagy are known: SQSTM1/p62, NDP52 (nuclear dot protein 52 kDa, also known as CALCOCO2), and OPTINEURIN (Thurston et al., 2009; Wild et al., 2011; Zheng et al., 2009). They bind to ubiquitinated intracellular bacteria via an ubiquitin (Ub)-binding domain and bring bacteria to nascent autophagosomes through their interaction with an autophagosomal membrane-anchored member of the ATG8 family (LC3 and GABARAP family members in mammals) via a so-called LC3 interaction region (LIR) (Randow and Youle, 2014). To mediate bacteria targeting to autophagosomes, NDP52 has the additional property to detect pathogens through the binding of GALECTIN 8, which is recruited on bacteria-containing damaged vacuoles (Thurston et al., 2012). Furthermore, among the LC3 family, NDP52 binds selectively to LC3C via a non-canonical LIR (CLIR) motif, with no or very weak affinity for other members of the LC3 family (von Muhlinen et al., 2012).

Once sequestered within a completed autophagosome, pathogens can be destroyed within the acidic environment produced subsequently to the fusion of the bacteria-containing autophagosome with a lysosome (Levine et al., 2011). The molecular regulation of this so-called autophagosome maturation step remains largely unknown, but the motor protein MYOSIN VI was recently shown to contribute to this process by docking TOM-1-expressing endosomes with autophagy receptor-linked autophagosomes. MYOSIN VI has the potency to interact with NDP52, OPTINEURIN, and T6BP, and either the individual depletion in MYOSIN VI or TOM-1, or the simultaneous extinction of the three autophagy receptors affected autophagosome maturation (Tumbarello et al., 2012). However, the individual contribution of these receptors to this process as well as the possible mechanisms involved remained totally unknown, especially in the context of bacterial infections.

We asked here whether, in addition to its activity in the targeting of bacteria to autophagy, NDP52 could regulate the maturation of bacteria-containing autophagosomes. We found an unexpected ability of this autophagy receptor to complete, via dual but independent mechanisms, the two essential steps for xenophagy, meaning the targeting of bacteria to nascent autophagosomes and the promotion of the degradative activity of these vesicles upon efficient maturation.



(legend on next page)

RESULTS

The MYOSIN VI Binding Domain of NDP52 Is Required for Autophagy-Mediated Intracellular Bacteria Degradation, but Not for Bacteria Targeting to Autophagosomes

Cellular depletion in MYOSIN VI, a non-conventional myosin motor that can travel toward the minus end of actin filaments, strongly compromises the maturation of autophagosomes and, therefore, autophagy substrate degradation (Tumbarello et al., 2012). Interestingly, NDP52 binds to MYOSIN VI, and the NDP52 C425 residue is instrumental in such an interaction (Morriswood et al., 2007). We therefore asked whether the interaction between NDP52 and MYOSIN VI was required for bacterial xenophagy. To this aim, we monitored the intracellular proliferation of *Salmonella* Typhimurium in HeLa cells treated with short interference RNA (siRNA) reducing NDP52 expression (Figure S1A). As previously shown, siNDP52 treatment facilitated *S. Typhimurium* intracellular proliferation (Thurston et al., 2009), what we found to be rescued by the ectopic expression of NDP52 (Figures 1A, S1B, and S1C). Interestingly, however, the ectopic expression of a NDP52 C425A mutant unable to bind to MYOSIN VI (Morriswood et al., 2007) did not rescue the ability of cells to restrict *S. Typhimurium* proliferation in the absence of NDP52 expression (Figures 1A, S1B, and S1C). Similarly, a NDP52 construct lacking the CLIR motif (NDP52 Δ SKICH Δ CLIR, see Figure 3A for all the constructs used in this study) was equally unable to control *S. Typhimurium* proliferation (Figures 1A and S1B). Thus, these results suggest that the interactions of NDP52 with MYOSIN VI and LC3C are both crucial for cells to fight intracellular *S. Typhimurium* growth.

Compromised restriction of intracellular bacteria through autophagy could result from either an inefficient targeting of pathogens to autophagosomes, an essential function known for NDP52, or a defective maturation of bacteria-containing autophagosomes, or a combination of both. We wondered whether the NDP52 C425A mutant impacted the targeting of *S. Typhimurium* to autophagosomes by looking at intracellular ubiquitinated bacteria co-localization with LC3⁺ autophagosomes in infected GFP-LC3-expressing HeLa cells. As expected, when compared with control cells, NDP52-deficient cells showed reduced GFP-LC3⁺ ubiquitinated bacteria, what was rescued by the ectopic

expression of NDP52 (Figure 1B). However, whereas the NDP52 C425A did not control *S. Typhimurium* proliferation, this mutant still allowed the targeting of ubiquitinated bacteria to autophagosomes (Figure 1B). As expected, the CLIR-lacking NDP52 construct with no potency at controlling *S. Typhimurium* proliferation (Figure 1A) was not able to address bacteria to autophagosomes (Figure 1B). Thus, these results indicate that NDP52 interaction with MYOSIN VI has no role in bacteria targeting to autophagosomes but suggest a potential role in completion of the autophagy process.

NDP52 Contributes to the Regulation of the Autophagy Process

In light of our results, we analyzed autophagy in siNDP52-treated HeLa cells and measured first the conversion of the cytosol-located LC3-I form into the autophagosome-anchored lipidated LC3-II form (Klionsky et al., 2012). In contrast to the silencing of the autophagy essential ATG5 gene (Figure S1A), which limits LC3-I conversion, we found that depletion in NDP52 led to an increased expression of LC3-II (Figure 1C). Furthermore, the reduced expression of NDP52 did not impair LC3-II accumulation upon treatment of the cells with chloroquine, a potent inhibitor of autophagosome recycling (Figure 1D). These results were confirmed when we analyzed autophagy through both confocal microscopy and flow cytometry-based assays (Klionsky et al., 2012) for the formation of GFP-LC3⁺ dots or for the intensity of GFP-LC3 expression upon saponin treatment in siNDP52-treated GFP-LC3 HeLa cells, respectively (Figures 1E and S1D). Similar results were observed in 293T cells (not shown). Moreover, as observed by others (Newman et al., 2012; Tumbarello et al., 2012), we found co-localization of NDP52 with GFP-LC3⁺ autophagosomes. However, such co-localization events were very rare in control healthy cells, whereas increased co-localization was observed in cells treated with chloroquine (Figure 1F). Together, these results indicate that NDP52 has an impact on the autophagy process, but not on autophagosome biogenesis, and that it could play a role in the maturation step of the autophagosomes.

NDP52 Promotes Autophagosome Maturation

Accumulation of LC3-II⁺ autophagosomes as observed in siNDP52-treated cells could result either from an increase in

Figure 1. NDP52 Activity in Xenophagy and Autophagy

(A and B) HeLa cells (A) or GFP-LC3 HeLa cells (B) were first transfected with control siRNA or siNDP52 for 48 hr before a second transfection with the indicated construct-encoding plasmid, and 24 hr later cells were infected. (A) For each condition, intracellular *S. Typhimurium* viability is presented as the ratio of alive intracellular bacteria at $t = 6$ hr/ $t = 2$ hr post infection (pi), compared to siRNA-control condition. (B) HeLa cells expressing GFP-LC3 (green) were infected for 1 hr, fixed, and labeled bacteria (blue) and ubiquitin (red) detection was performed by confocal microscopy. Representative infected cells are shown, and the percentage of labeled intracellular *S. Typhimurium* co-localized with GFP-LC3 vesicles and ubiquitin is represented on a graph.

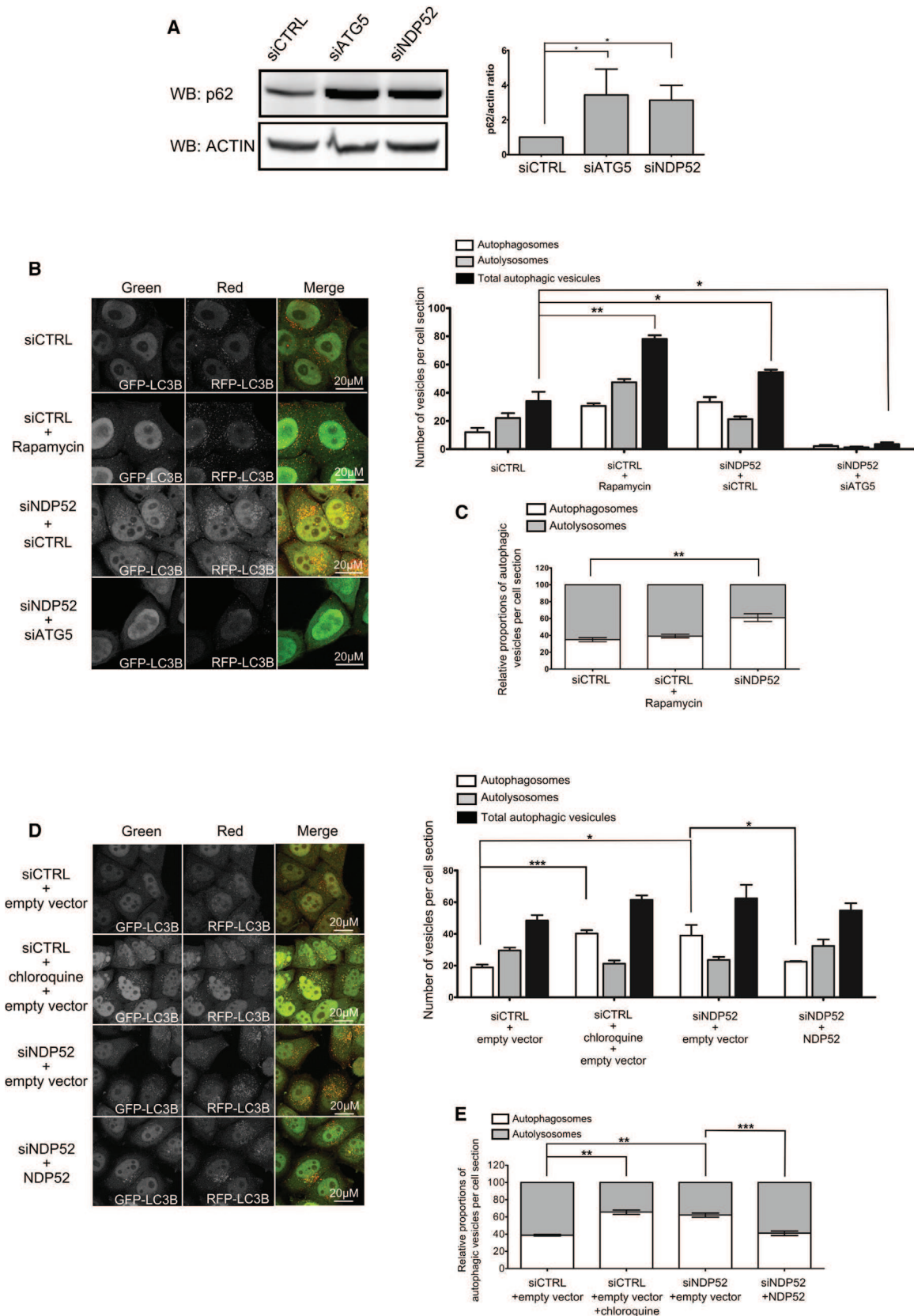
(C) HeLa cells transfected with the indicated siRNAs for 48 hr were lysed, and anti-LC3 or anti-ACTIN western blots were performed. Representative results are shown along with a graph representing the intensity of LC3-II/LC3-I bands normalized to the control condition.

(D) HeLa cells transfected with the indicated siRNAs for 48 hr were lysed and eventually treated the last 4 hr with chloroquine or kept with vehicle. Western blot and analysis were carried out as in (C).

(E) GFP-LC3 HeLa cells transfected with the indicated siRNAs for 48 hr were fixed for analysis. The number of GFP⁺ vesicles per cell section was assessed by confocal microscopy. Representative profiles are shown along with a graph expressing the relative fold induction of dot number compared with control cells.

(F) GFP-LC3 HeLa cells were treated with chloroquine for 4 hr, or kept with vehicle (Mock), and fixed for confocal microscopy. Endogenous NDP52 was stained (red), and co-localization with GFP-LC3 (green) was assessed using Mander's coefficient. Representative pictures of the results are shown along with a graph displaying the percentage of GFP-LC3 dots co-localized with NDP52 (white histograms), or the percentage of NDP52 labeling co-localized with GFP-LC3 dots (black histograms).

For (A)–(F), means \pm SD of three independent experiments (A, B, and F were each carried out in triplicates). See also Figure S1.



(legend on next page)

the de novo formation of autophagy vesicles or from the accumulation of autophagosomes due to impaired recycling (Klionsky et al., 2012). To investigate the role of NDP52 in the autophagy flux, we first looked at the expression level of SQSTM1/p62, a long-lived protein mainly degraded through autophagy catabolism; its accumulation in cells indicates an aborted autophagy flux. Interestingly, when compared to the control condition, the level of expression of SQSTM1/p62 was significantly higher in both siNDP52- and siATG5-treated HeLa cells or 293T cells (Figure 2A and data not shown). These results suggest that NDP52 is an active component of the autophagy process.

To further confirm a role of NDP52 in autophagosome maturation, we used mRFP-GFP-LC3-expressing HeLa cells, allowing for the discrimination of autophagosomes (expressing both RFP and GFP fluorochromes) from acidified autolysosomes (expressing only RFP due to rapid GFP quenching in autolysosomes) (Klionsky et al., 2012). Similarly to a treatment with chloroquine, an inhibitor of autolysosome acidification leading to the accumulation of non-degradative autophagic vesicles, the reduced expression of NDP52 significantly inverted the autophagosomes/autolysosomes ratio when compared to normal cells or cells treated with rapamycin, an inducer of the autophagy flux (Figures 2B–2E). This modulation of the autophagy flux was dependent on ATG5, as the co-silencing of ATG5 together with NDP52 abrogated the accumulation of autophagy vesicles (Figure 2B). Moreover, the ectopic expression of NDP52 in siNDP52-treated cells restored an autophagosomes/autolysosomes ratio similar to that of control cells, uncovering the specific function of NDP52 in the maturation of autophagosomes (Figures 2D and 2E). Thus, NDP52 seems involved in autophagosome maturation in uninfected cells since the absence of NDP52 leads to the accumulation of autophagosomes due to impaired recycling.

NDP52 Promotes Autophagosome Maturation via a LIR Motif

In order to determine how NDP52 regulates autophagosome maturation, we thought to delineate the portion(s) of NDP52 that could be involved in this activity. Human NDP52 consists of an NH₂-terminal skeletal muscle and kidney-enriched inositol phosphatase carboxyl homology (SKICH) domain (aa 1–127), a linker containing the so-called CLIR motif (aa 134–136), a coiled-coil (CC) domain (aa 145–350), and an intermediate region before a COOH-terminal Zinc finger (Zn) domain (aa 420–446) (Figure 3A). We first found that when we reconstituted siNDP52-treated cells with an NDP52 construct containing only the SKICH domain and the CLIR motif (NDP52 ΔCCΔZn),

a normal phenotype of autophagosome maturation could not be restored (Figures 3B and 3C). This indicated that the LC3C-binding motif was not sufficient for NDP52 to trigger maturation of autophagosomes. In contrast, an NDP52 construct lacking the SKICH domain and the CLIR motif (NDP52 ΔSKICHΔCLIR) did rescue autophagy maturation otherwise impaired in siNDP52-treated cells (Figures 3B and 3C). Thus, although providing a specific interaction with an autophagosomal membrane-linked protein, LC3C, and being essential to targeting pathogen to autophagosomes (von Muhlinen et al., 2012), the CLIR motif is dispensable for the NDP52-mediated autophagosome maturation.

Although the CLIR motif was not involved in the process, we thought that NDP52 could prompt autophagosome maturation via interaction with other LC3 family members. Supporting this hypothesis, we found that although NDP52 interacted strongly with LC3C, a weak interaction with LC3B was detected in co-affinity experiments (Figures 3D and S2A). Interestingly, the NDP52 ΔSKICHΔCLIR construct lacking the CLIR motif still interacted efficiently with LC3B, but only marginally with LC3C (Figure 3D). Looking at the sequence remaining in the NDP52 ΔSKICHΔCLIR construct, we identified a region at position 203–208 that differs from the canonical LIR motif only by the absence of an expected hydrophobic residue in position X₃ (T207 or E208 instead of an I/V/L) (Johansen and Lamark, 2011). Interestingly, the mutation of aa 203–206 to alanine totally abrogated the interaction of NDP52 with LC3B, without affecting the marginal interaction with LC3C (Figures 3E and S2A). Moreover, NDP52 interactions with LC3A, GABARAP, GABARAL1, and GABARAPL2 were also detected, but only LC3A and GABARAPL2 interactions with NDP52 were affected by the introduction of alanines within the LIR-like motif (Figures S2B and S2C). We therefore asked whether this LIR-like motif could intervene in the capacity of NDP52 to regulate autophagy maturation. Strikingly, a LIR-like mutant of NDP52 (NDP52 LIR-like null) was found defective in its ability to rescue autophagosome maturation in cells with silenced expression of NDP52 (Figures S3A–S3D). Furthermore, when we individually silenced each of the ATG8 orthologs using specific siRNA, a similar modulation of p62 expression was detected, suggesting redundancy between ATG8 orthologs in autophagy (Figures S3E and S3F). Thus, these data identify another LIR motif in NDP52, which is involved in an efficient completion of the autophagy process.

The LIR-like Motif and the MYOSIN VI-Binding Domain of NDP52 Are Instrumental for Xenophagy

On one hand, MYOSIN VI was reported to facilitate autophagosome maturation, and on the other hand, it can interact with

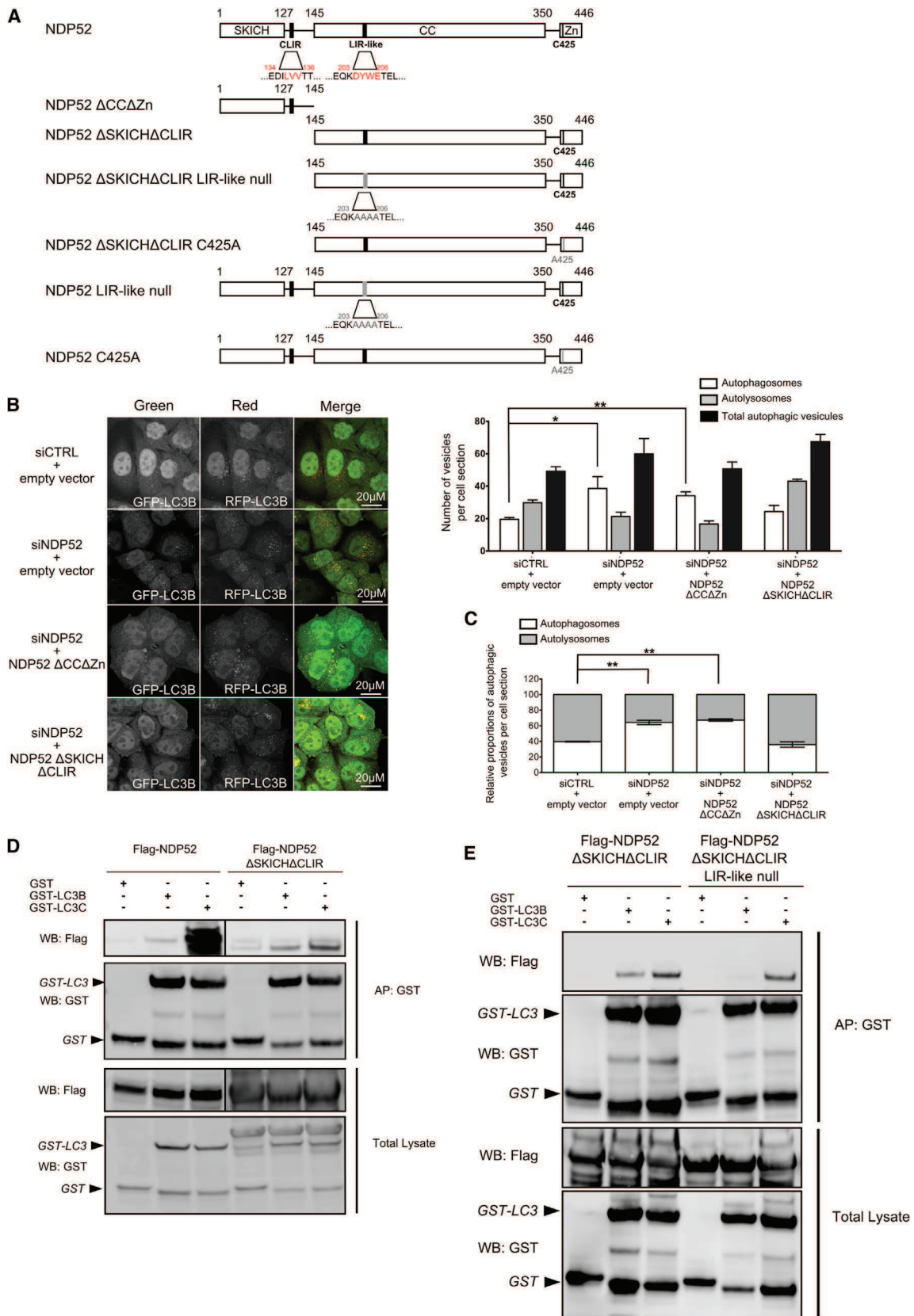
Figure 2. NDP52 Function in Autophagosome Maturation

(A) HeLa cells transfected with the indicated siRNAs for 48 hr were lysed, and anti-p62 or anti-ACTIN western blots were performed. Representative results are shown along with a graph representing the intensity of p62/actin bands normalized to the control condition.

(B and C) mRFP-GFP-LC3 HeLa cells were transfected or co-transfected with the indicated siRNA for 48 hr and eventually treated the last 4 hr of culture with rapamycin. Representative profiles of autophagosomes (RFP⁺GFP⁺ dots) and autolysosomes (RFP⁺GFP⁻ dots) per cell section assessed by confocal microscopy are shown and were quantified. Results are expressed as absolute numbers of individual vesicles (total autophagic vesicles = all RFP⁺ dots) (B) and as the percentage of total autophagic vesicles (C).

(D and E) mRFP-GFP-LC3 HeLa cells were first transfected with control siRNA or siNDP52 for 48 hr before a second transfection with the indicated construct-encoding plasmid and eventually treated the last 4 hr of culture with chloroquine. Results in (D) and (E) are expressed as in (B) and (C), respectively.

For (A)–(E), means ± SD of at least three independent experiments (B–E were each carried out in duplicates).



(legend on next page)

NDP52 (Tumbarello et al., 2012; Morriswood et al., 2007). Moreover, we found that the NDP52 C425A mutant, impaired in its capacity to bind MYOSIN VI, did not restrict *S. Typhimurium* intracellular growth (Figure 1A). These observations suggested that the NDP52 C425A mutant fails to promote maturation of autophagosomes. Indeed, we found that the NDP52 C425A mutant did not rescue a normal autophagy phenotype in *siNDP52*-treated cells (Figures S3A–S3D). Thus, we found that the MYOSIN VI binding site of NDP52 is essential for both *S. Typhimurium* clearance and autophagosome maturation (Figures 1A and S3A–S3D). We therefore asked whether the LIR-like motif, which is essential for the NDP52-mediated autophagosome maturation, is also crucial for xenophagy. Interestingly, reminiscent of what we observed for the NDP52 C425A mutant, we found that the NDP52 LIR-like null mutant did not restrict intracellular proliferation of *S. Typhimurium*, indicating that this NDP52 motif is essential for an efficient xenophagy (Figure 4A). However, the NDP52 LIR-like null mutant was still able to target bacteria to autophagosomes, as evaluated by confocal microscopy (Figure 4B), indicating that this motif is not involved in this function, which is reserved to the CLIR motif (Figure 1B; von Muhlinen et al., 2012).

To extend these results, we used mRFP-GFP-LC3-expressing HeLa cells to look for *S. Typhimurium* in autophagic vesicles (Figure 4C). Whereas bacteria were found in both autophagosomes and autolysosomes in control infected cells, as expected, the reduced expression of NDP52 restricted the number of intracellular bacteria addressed to autophagic vesicles. However, the complementation of *siNDP52*-treated cells with either the wild-type NDP52, the NDP52 C425A mutant, or the NDP52 LIR-like null mutant restored the targeting of bacteria to autophagic vesicles. Nevertheless, in cells reconstituted with either the NDP52 C425A mutant or the NDP52 LIR-like null mutant, bacteria were mainly found in non-matured autophagosomes as opposed to cells reconstituted with wild-type NDP52 in which bacteria were also found in acidic autolysosomes (Figure 4C). In support of these results, we also found that the reconstitution of *siNDP52*-treated cells with either the NDP52 C425A mutant or the NDP52 LIR-like null mutant did not rescue a normal level of *S. Typhimurium* co-localization with the lysosomal marker LAMP1, contrarily to the ectopic expression of wild-type NDP52 (Figure 4D). These results strongly support a contribution for NDP52 in the regulation of the fusion of bacteria-containing autophagosomes with lysosomes, which involves both the MYOSIN VI binding motif and the LIR-like domain of NDP52. Importantly, all NDP52 constructs that displayed default in bacterial xenophagy retained their ability to interact with GALECTIN

8 (Figure S4A), suggesting that the NDP52-GALECTIN 8 interaction has no role in autophagosome maturation.

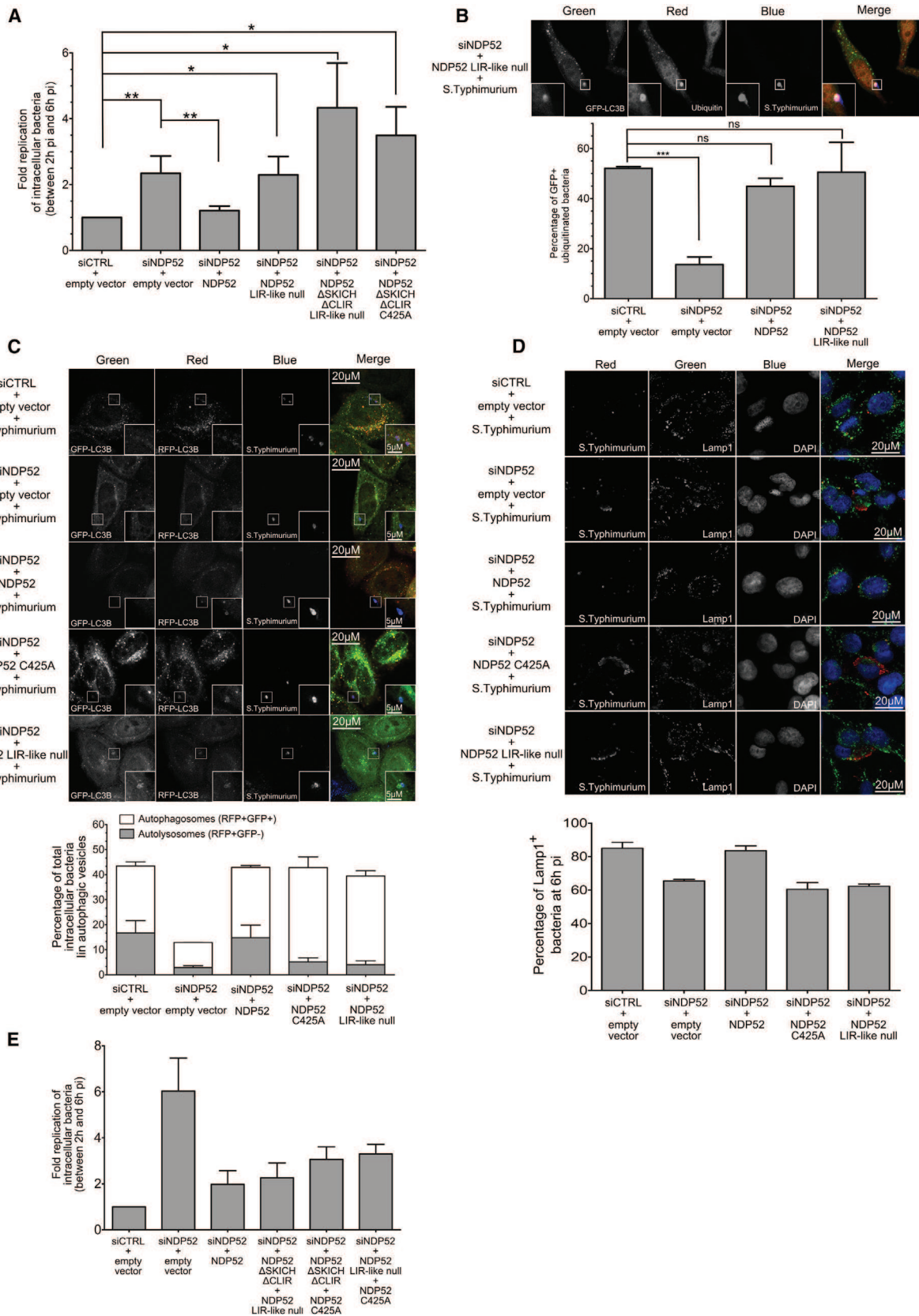
Interestingly, NDP52 constructs with no CLIR and no LIR-like motifs (NDP52 Δ SKICH Δ CLIR/LIR-like null) or no CLIR motif and no MYOSIN VI binding motif (NDP52 Δ SKICH Δ CLIR/C425A) were nonetheless unable to protect cells from *S. Typhimurium* proliferation, but seemed to facilitate even more the bacterial growth, possibly by competing for bacteria binding with residual endogenous NDP52 in *siNDP52*-treated cells (Figure 4A). To determine the respective contribution of NDP52 in pathogen targeting to autophagosome and in the subsequent degradation, we monitored the intracellular proliferation of *S. Typhimurium* in *siNDP52*-treated cells co-reconstituted with two distinct NDP52 mutants that were individually defective to restrict bacteria intracellular proliferation. The co-expression of the NDP52 construct defective for the bacteria targeting to autophagy (NDP52 Δ SKICH Δ CLIR) with a NDP52 mutant defective for an efficient bacteria-containing autophagosome maturation (NDP52 C425A or NDP52 LIR-like null) did reconstitute the “wild-type” function of NDP52, as it allowed for the control of intracellular proliferation of *S. Typhimurium* (Figures 4E and S4B). Similarly, the intracellular proliferation of *S. Typhimurium* was restricted in *siNDP52*-treated cells co-expressing the two NDP52 mutants, NDP52 C425A + NDP52 LIR-like null, which individually were able to target bacteria to autophagosome but unable to restrict the proliferation (Figures 4E and S4B). Thus, our results suggest that xenophagy is completed by NDP52, which is crucial for both bacterial targeting to autophagosomes and autophagosome maturation via independent interactions for efficient xenophagy. When we looked at the contribution of other autophagy receptors known for selective intracellular pathogen restriction via autophagy, we found that the reduced expression of OPTINEURIN, but not the one of SQSTM1/p62, partially blocked the autophagy flux, as observed for NDP52 (Figures S4C–S4E). Thus, other autophagy receptors might operate similarly to NDP52 in regulating xenophagy from the targeting of the pathogen to autophagy up to its degradation via independent but functionally complementary domains.

DISCUSSION

Xenophagy implies the recognition of pathogens, their targeting within nascent autophagosomal membranes, and finally the completion of autophagy to destroy sequestered microorganisms. Here, we report that the autophagy receptor NDP52 can also complete autophagosome maturation, which optimizes the anti-microbial activity of autophagy.

Figure 3. NDP52 Interaction with LC3B via a LIR-like Motif

- (A) Schematic representation of wild-type human NDP52 and NDP52 constructs/mutants used in this study.
(B) mRFP-GFP-LC3 HeLa cells were transfected with the indicated siRNA for 48 hr before a second transfection with the indicated construct-encoding plasmid. Representative profiles of autophagosomes (RFP⁺GFP⁺ dots) and autolysosomes (RFP⁺GFP⁻ dots) per cell section assessed by confocal microscopy are shown and were quantified. Results are expressed as absolute numbers of individual vesicles (total autophagic vesicles = all RFP⁺ dots).
(C) Results obtained in (B) are expressed as the percentage of total autophagic vesicles.
(D) HeLa cells were transfected with vectors encoding GST alone, GST-LC3B or GST-LC3C, and the indicated Flag-tagged NDP52 construct. The cells were lysed 48 hr later, and GST-tagged proteins were purified by co-affinity purification (AP) before western blotting the eluted complexes for revealing GST or Flag-tagged proteins (one experiment representative of at least three).
(E) HeLa cells were transfected and analysed as in (D).
See also Figures S2 and S3.



(legend on next page)

NDP52 is an essential autophagy receptor to fight infections (Huett et al., 2012; Shahnazari et al., 2010; Thurston et al., 2009, 2012; Watson et al., 2012). Strikingly, several pathogens evolved strategies to target NDP52, possibly to escape from autophagic degradation, which further highlights the importance of NDP52 in the control of intracellular pathogens (Barnett et al., 2013; Grégoire et al., 2011; Judith et al., 2013). By concomitantly silencing the expression of NDP52, T6BP, and OPTINEURIN, it was proposed that these receptors have a role in autophagosome biogenesis and maturation (Tumbarello et al., 2012). However, our results indicate that NDP52 does not play a major role in autophagosome biogenesis. It is however possible that cells with a deficiency for several autophagy receptors prevent autophagosome biogenesis due to limited targeting of cellular cargos toward autophagosomal membranes. Thus, the unique absence of NDP52 would be compensated by the activity of other autophagy receptors. Interestingly, we detected few LC3⁺ autophagosomes, which co-localized with NDP52, whereas most NDP52⁺ dots did co-localize with autophagosomes. Thus, NDP52 might bring specific substrates to only a fraction of nascent autophagosomal membranes and then complete the maturation of those specific autophagosomes. Our observation that OPTINEURIN also contributes to autophagosome maturation suggests that other autophagy receptors might share the dual function of NDP52 by targeting substrates to autophagosomes and by regulating autophagic degradation. This might be a selective advantage in the context of cellular immunity toward intracellular pathogens.

NDP52 could bring substrates to autophagosomal membranes via distinct molecular mechanisms, and the CLIR motif is essential to this achievement. The LIR-like motif in the coiled-coil region identified here is essential to promote autophagosome maturation, together with the MYOSIN VI-binding domain. In contrast to most canonical LIR motifs that allow interaction with all members of the LC3 family as well as LC3 homologs GABARAP, GABARAP1, and GABARAP2, the CLIR motif only binds to LC3C (Johansen and Lamark, 2011; von Muhlinen et al., 2012). This interaction gives NDP52 the unique property to potentially select LC3C-containing autophagosomal membranes for degradation of selective substrates. However, after being recruited to LC3C-associated autophagosomal membrane, other members of LC3 family and GABARAPs proteins are recruited to bacteria (von Muhlinen et al., 2012). Here, we identify another domain in NDP52, which supports the interaction with several ATG8 orthologs, LC3A,

LC3B, and GABARAP2, but not with LC3C. This motif does not fit perfectly with the canonical LIR motif (aromatic residue-X-X-hydrophobic residue), since a hydrophobic residue is missing (Johansen and Lamark, 2011). Thus, in addition to CLIR, NDP52 expresses another non-conventional LIR motif whose function is not to connect NDP52-linked substrates to phagophores, but to promote autophagosome maturation. It is possible that once bound to LC3C, NDP52 uncovers the LIR-like motif, otherwise masked within the coiled-coil domain, and therefore interacts with other members of LC3s or GABARAP2 to achieve autophagy maturation in order to degrade the entrapped bacteria. Alternatively, the LIR-like motif could be accessible independently of the NDP52-LC3C interaction but, due to low affinity for its interacting partners, only functional when NDP52 is stabilized within nascent autophagosomes. Finally, since NDP52 forms homodimers (Kim et al., 2013; Sternsdorf et al., 1997), it would be possible that bacteria-bound NDP52 recruits bacteria-free NDP52 whose function is the completion of the substrate degradation. We found that the co-expression of a NDP52 construct unable to target bacteria to autophagosomes together with a NDP52 mutant unable to regulate autophagosome maturation restored the bacterial restriction of wild-type NDP52, indicating that distinct proteins with single function contribute to functional xenophagy. The use of a unique molecule to complete pathogen targeting to autophagy and promotion of autophagy maturation could have the double advantage to concentrate the autophagy degradation on a selective substrate, which could limit the inappropriate degradation of cellular bystander contents, and also to shorten the delay of fusion of bacteria-containing autophagosomes with lysosomes (Figure S4F). A very rapid acidification of these vesicles could be instrumental to counteract the ability of intracellular bacteria to adapt within intra-autophagosomal environment in order to either escape or hijack autophagy to their own benefit (Deretic and Levine, 2009).

Thus, we revealed an unexpected role for human NDP52 in autophagosome maturation, which further highlights its function in cell-autonomous responses and innate immunity triggered against invading bacteria (Randow and Youle, 2014). Indeed, in addition to being a scaffold protein for innate response toward pathogens (Thurston et al., 2009), NDP52 plays two independent but complementary functions in anti-microbial autophagy: the targeting of pathogens to autophagy ensured by its selective autophagy receptor activity and the autophagosome-lysosome

Figure 4. NDP52 Involvement in Maturation of *S. Typhimurium*-Containing Autophagosomes

(A and B) HeLa cells or GFP-LC3 HeLa cells were treated, infected, and analyzed as in Figure 1A (A) or in Figure 1B (B), respectively. Representative pictures are shown and accompanied by a graph (means \pm SD of at least three independent experiments carried out in triplicates).

(C) mRFP-GFP-LC3 HeLa cells were first transfected with siCTRL or siNDP52 for 48 hr before a second transfection with the indicated construct-encoding plasmid. 24 hr later, cells were infected for 2 hr with *S. Typhimurium*, fixed, and labeled for intracellular bacteria (blue). Representative profiles of bacteria co-localizing with autophagosomes (RFP⁺GFP⁺ dots) or autolysosomes (RFP⁺GFP⁻ dots) are shown, and the percentage of total intracellular bacteria in autophagic vesicles is represented on a graph.

(D) HeLa cells were infected for 6 hr, fixed, and labeled for intracellular bacteria (red), LAMP1 (green), and nuclei (blue) detection by confocal microscopy. Representative infected cells are shown, and the percentage of labeled intracellular *S. Typhimurium* co-localized with LAMP1 is represented on a graph.

For (C) and (D), means \pm SD of two independent experiments carried out in triplicates for which a two-tailed Welch t test was performed to assess the fidelity with which the replicates were created and which displayed significant differences of experimental conditions compared with controls, except for the siNDP52 + NDP52 condition.

(E) HeLa cells were treated, infected, and analyzed as in Figure 1A (means \pm SD of two independent experiments carried out in triplicates; one of them is shown Figure S4B). See also Figures S3 and S4.

fusion ensured by its regulatory function in autophagy. Both functions are instrumental in xenophagy to optimize an efficient bacterial degradation and could be shared by other xenophagy receptors.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cells, Antibodies, and Reagents

HeLa, mRFP-GFP-LC3 HeLa, GFP-LC3 HeLa, and 293T cells were maintained in DMEM (Invitrogen) complemented with 10% FBS, 50 μ g/ml of Gentamicin. Additional 500 μ g/ml of Geneticin was added for mRFP-GFP-LC3 HeLa, GFP-LC3 HeLa cell cultures. Cell transfections were performed as follows: the day before transfection with siRNA, the cells were seeded in 6-well plates with 1×10^5 cells per well in OPTIMEM complemented with 10% FBS, 2 mM of L-glutamine, 50 μ g/ml of Gentamycin, 0.1 mM non-essential amino acid, 0.1 mM pyruvate sodium, and 0.1 g/L bicarbonate sodium. The cells were transfected with 100 pmol of siRNA using Lipofectamine RNAiMAX from Invitrogen according to the manufacturer's instructions. During rescue experiments, the cells were transferred 24 hr after siRNA transfection in a 24-well plate at 5×10^4 cells per well. 24 hr after, 250 ng total of DNA vector were transfected using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The expression of individual constructs was confirmed by western blot (Figure S1B). For flux analysis with mRFP-GFP-LC3-expressing cells, at least 100 cells per individual experiment were enumerated by confocal microscopy (see Supplemental Information). The references of antibodies and reagents used in this study are available in the Supplemental Information.

Molecular Cloning, Co-Affinity Purification, and siRNA

Human NDP52 encoding vector (Invitrogen) was used as matrix to generate all NDP52 mutants and constructs used in this study by QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent #210518) according to the manufacturer's instructions. The mutants/constructs were engineered as indicated in the Supplemental Information as well as the co-affinity purification experiments. The references of the used siRNA are in the Supplemental Information.

S. Typhimurium Infections

Salmonella enterica serovar Typhimurium (strain 12023) was grown overnight in LB broth (Sigma), and infections were carried out as indicated in the Supplemental Information, as previously reported (Thurston et al., 2009). For confocal microscopy (see Supplemental Information), the cells were fixed using cold acetone for 5 min after the indicated period of time of infection (50–100 bacteria in infected cells were analyzed).

Statistical Analysis

All p values were calculated using a two-tailed Welch t test (Student's t test assuming non-equal variances of the samples), except for the results of Figures 1A and 4A, for which a one-tailed Welch t test was applied; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures and four figures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2015.02.008>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. D.C. Rubinsztein and T. Henry for providing us with mRFP-GFP-LC3-Hela cells and *S. Typhimurium*, respectively. We acknowledge the framework of the LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0042) of Université de Lyon operated by the French National Research Agency (ANR-11-IDEX-0007). We thank the imagery PLATIM (C. Chamot) and the flow cytometry (T. Andrieu and S. Dussurgey) facilities of the SFR Biosciences Gerland. This work was supported by Institut Universitaire de France (IUF), Ligue Contre le Cancer, ANR, and Association François Aupetit. D.S.P. is supported by LNCC. P.V.

is a recipient of a fellowship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. M.F. is member of the Institut Universitaire de France.

Received: July 24, 2014

Revised: November 4, 2014

Accepted: January 23, 2015

Published: March 12, 2015

REFERENCES

- Barnett, T.C., Liebl, D., Seymour, L.M., Gillen, C.M., Lim, J.Y., Larock, C.N., Davies, M.R., Schulz, B.L., Nizet, V., Teasdale, R.D., and Walker, M.J. (2013). The globally disseminated M1T1 clone of group A *Streptococcus* evades autophagy for intracellular replication. *Cell Host Microbe* 14, 675–682.
- Deretic, V., and Levine, B. (2009). Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* 5, 527–549.
- Grégoire, I.P., Richetta, C., Meyniel-Schicklin, L., Borel, S., Pradezynski, F., Diaz, O., Deloire, A., Azocar, O., Baguet, J., Le Breton, M., et al. (2011). IRGM is a common target of RNA viruses that subvert the autophagy network. *PLoS Pathog.* 7, e1002422.
- Huang, J., and Brumell, J.H. (2014). Bacteria-autophagy interplay: a battle for survival. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 101–114.
- Huett, A., Heath, R.J., Begun, J., Sassi, S.O., Baxt, L.A., Vyas, J.M., Goldberg, M.B., and Xavier, R.J. (2012). The LRR and RING domain protein LRSAM1 is an E3 ligase crucial for ubiquitin-dependent autophagy of intracellular *Salmonella* Typhimurium. *Cell Host Microbe* 12, 778–790.
- Johansen, T., and Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 7, 279–296.
- Judith, D., Mostowy, S., Bourai, M., Gangneux, N., Lelek, M., Lucas-Hourani, M., Cayet, N., Jacob, Y., Prévost, M.C., Pierre, P., et al. (2013). Species-specific impact of the autophagy machinery on Chikungunya virus infection. *EMBO Rep.* 14, 534–544.
- Kim, B.W., Hong, S.B., Kim, J.H., Kwon, H., and Song, H.K. (2013). Structural basis for recognition of autophagic receptor NDP52 by the sugar receptor galectin-8. *Nat. Commun.* 4, 1613.
- Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., et al. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445–544.
- Levine, B. (2005). Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 120, 159–162.
- Levine, B., Mizushima, N., and Virgin, H.W. (2011). Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 469, 323–335.
- Morriswood, B., Ryzhakov, G., Puri, C., Arden, S.D., Roberts, R., Dendrou, C., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2007). T6BP and NDP52 are myosin VI binding partners with potential roles in cytokine signalling and cell adhesion. *J. Cell Sci.* 120, 2574–2585.
- Newman, A.C., Scholefield, C.L., Kemp, A.J., Newman, M., Mclver, E.G., Kamal, A., and Wilkinson, S. (2012). TBK1 kinase addiction in lung cancer cells is mediated via autophagy of Tax1bp1/NDp52 and non-canonical NF- κ B signalling. *PLoS ONE* 7, e50672.
- Randow, F., and Youle, R.J. (2014). Self and nonself: how autophagy targets mitochondria and bacteria. *Cell Host Microbe* 15, 403–411.
- Shahnazari, S., Yen, W.L., Birmingham, C.L., Shiu, J., Namolovan, A., Zheng, Y.T., Nakayama, K., Klionsky, D.J., and Brumell, J.H. (2010). A diacylglycerol-dependent signaling pathway contributes to regulation of antibacterial autophagy. *Cell Host Microbe* 8, 137–146.
- Sternsdorf, T., Jensen, K., Züchner, D., and Will, H. (1997). Cellular localization, expression, and structure of the nuclear dot protein 52. *J. Cell Biol.* 138, 435–448.
- Thurston, T.L., Ryzhakov, G., Bloor, S., von Muhlinen, N., and Randow, F. (2009). The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat. Immunol.* 10, 1215–1221.

Thurston, T.L., Wandel, M.P., von Muhlinen, N., Foeglein, A., and Randow, F. (2012). Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* 482, 414–418.

Tumbarello, D.A., Waxse, B.J., Arden, S.D., Bright, N.A., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2012). Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nat. Cell Biol.* 14, 1024–1035.

von Muhlinen, N., Akutsu, M., Ravenhill, B.J., Foeglein, Á., Bloor, S., Rutherford, T.J., Freund, S.M., Komander, D., and Randow, F. (2012). LC3C, bound selectively by a noncanonical LIR motif in NDP52, is required for anti-bacterial autophagy. *Mol. Cell* 48, 329–342.

Watson, R.O., Manzanillo, P.S., and Cox, J.S. (2012). Extracellular *M. tuberculosis* DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell* 150, 803–815.

Wild, P., Farhan, H., McEwan, D.G., Wagner, S., Rogov, V.V., Brady, N.R., Richter, B., Korac, J., Waidmann, O., Choudhary, C., et al. (2011). Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts *Salmonella* growth. *Science* 333, 228–233.

Zheng, Y.T., Shahnazari, S., Brech, A., Lamark, T., Johansen, T., and Brumell, J.H. (2009). The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J. Immunol.* 183, 5909–5916.

Cell Host & Microbe, Volume 17

Supplemental Information

Autophagy Receptor NDP52 Regulates Pathogen-Containing Autophagosome Maturation

Pauline Verlhac, Isabel P. Grégoire, Olga Azocar, Denitsa S. Petkova, Joël Baguet, Christophe Viret, and Mathias Faure

Figure S1

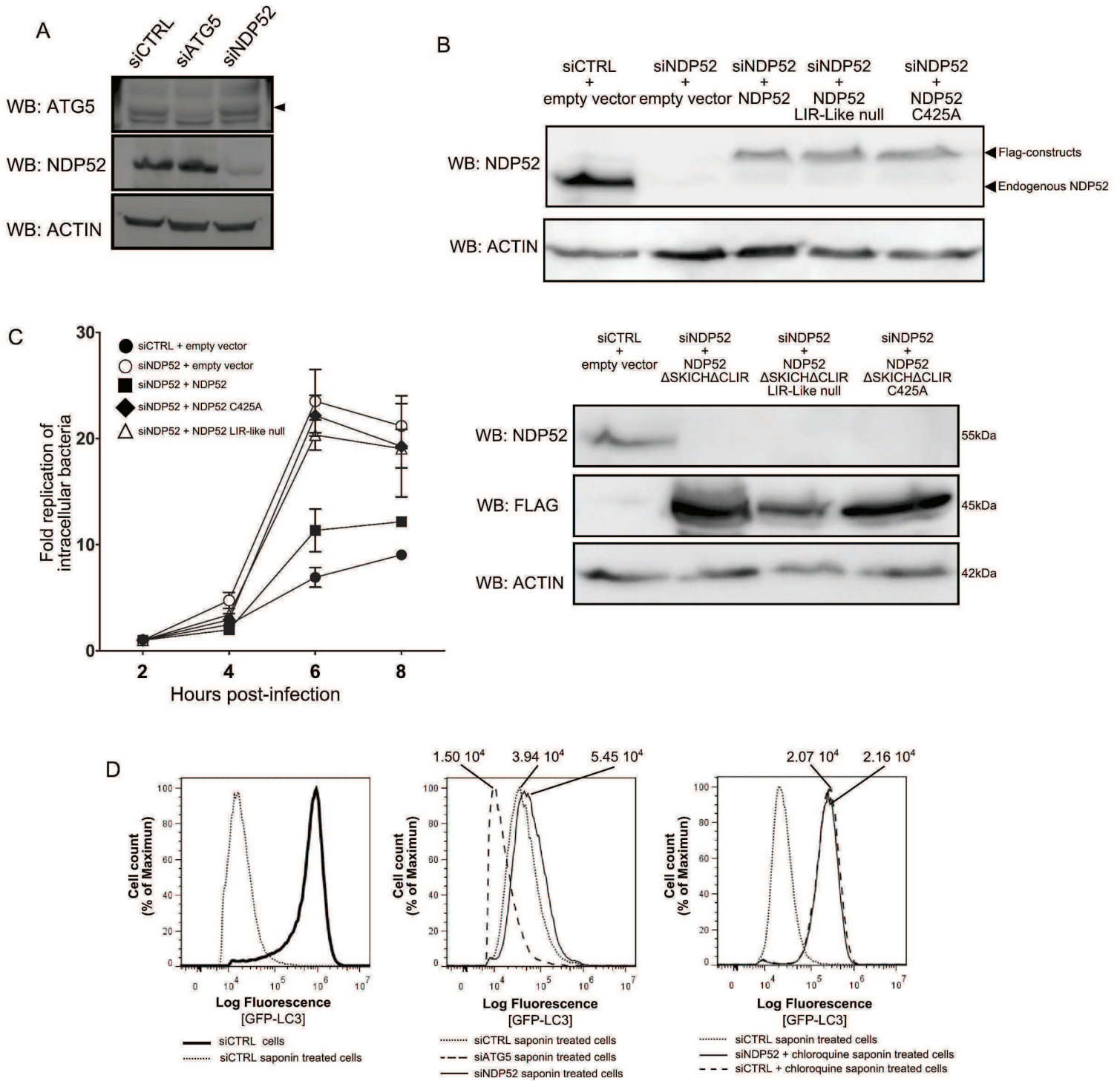


Figure S2

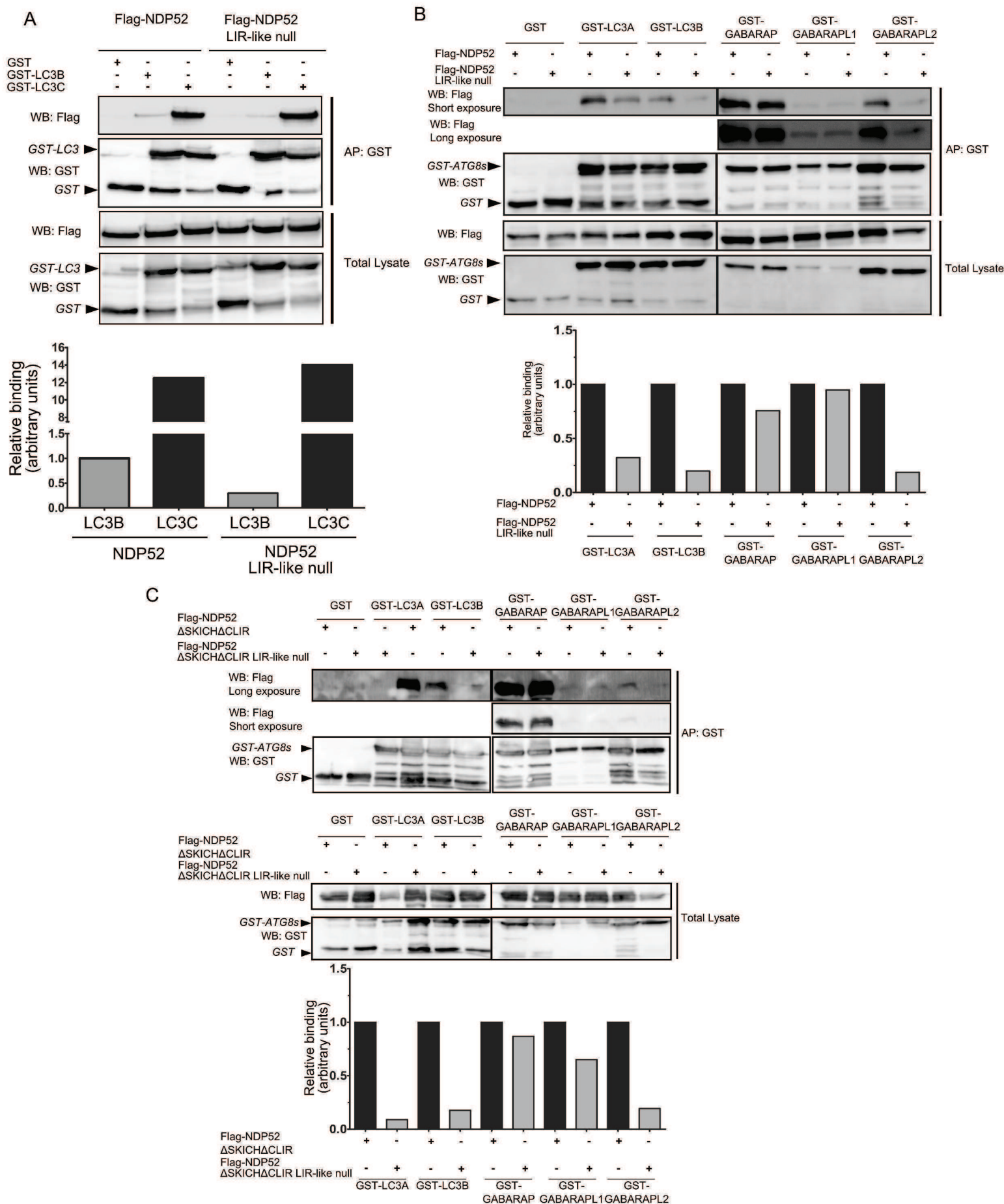
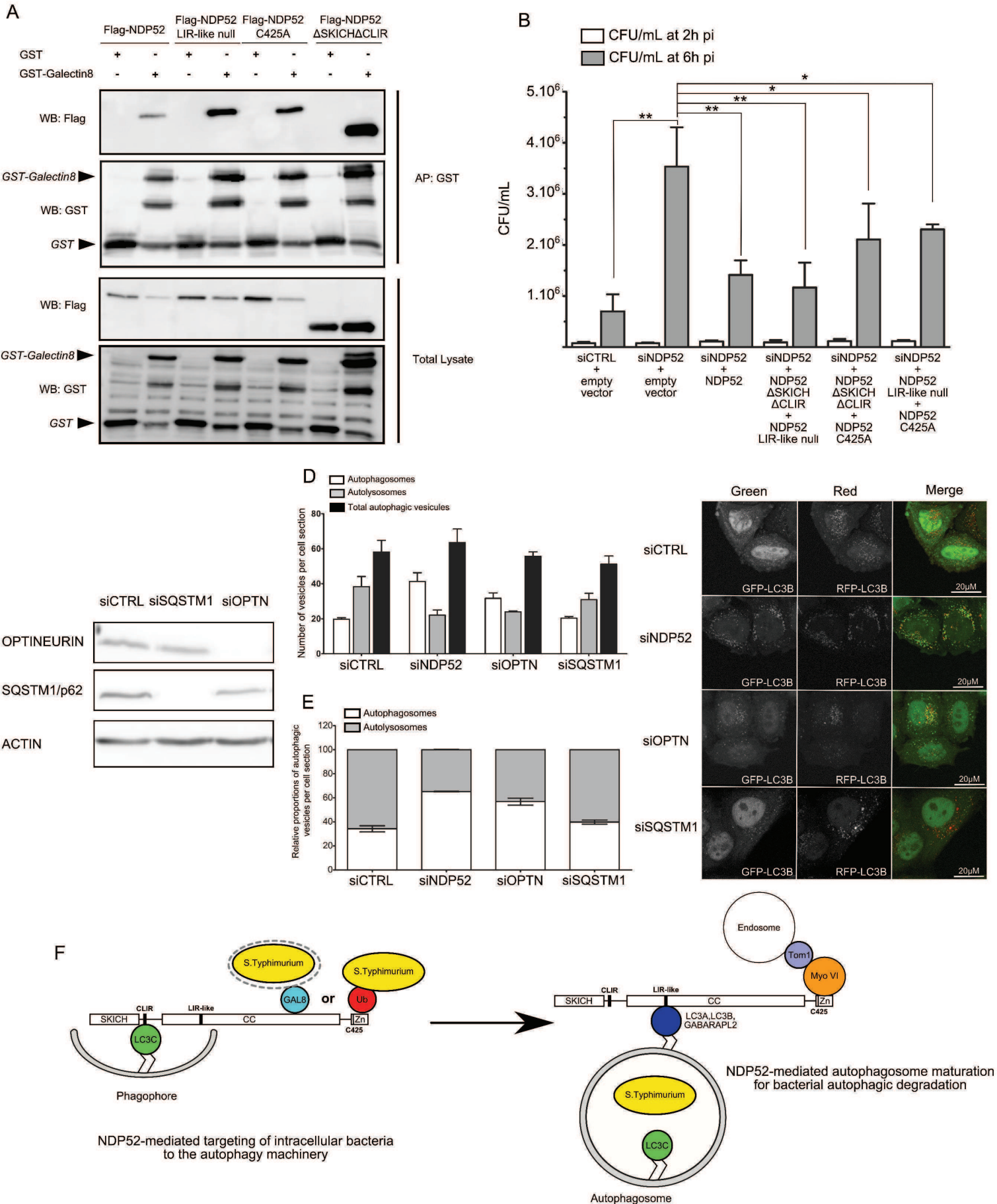


Figure S4



SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1 related to Figure 1: siRNA efficiency, expression of NDP52 constructs in complementation assays, and role of NDP52 in xenophagy and autophagosome maturation.

(A) siRNA efficiency. HeLa cells were treated with the indicated siRNA. Forty eight hours later, the expression of the respective proteins was assessed by western blot. Arrowhead indicates the ATG5 specific band.

(B) Constructs expression in complementation assays. HeLa cells were transfected with control siRNA or siNDP52 for 48hrs before a second transfection with the indicated Flag-tagged NDP52 constructs. Twenty four hours later, cells were lysed and expression of the indicated constructs were analysed by western blot using anti-Flag or anti-NDP52 antibodies.

(C) Kinetic of *S. Typhimurium* intracellular proliferation. HeLa cells were first transfected with control siRNA or siNDP52 for 48hrs before a second transfection with the indicated construct-encoding plasmid. Twenty-four hours later, cells were infected for 15min with *S. Typhimurium*. Cells were then washed and extracellular *S. Typhimurium* cells were killed by gentamicin treatment. Cells were cultured for two, four, six or eight additional hours. For each condition, intracellular *S. Typhimurium* viability is presented as fold replication compared to the initial time point of 2hrs pi (mean \pm SD of two independent experiments carried out in triplicates).

(D) NDP52 activity on autophagy analysed by flow cytometry. GFP-LC3 HeLa cells were transfected with the indicated siRNAs for 48hrs, and eventually treated with chloroquine for the last 4hrs of culture. Cells were then harvested and kept in normal saline buffer (PBS) or treated with saponine 0,05% to evacuate soluble GFP-LC3, whereas GFP-LC3 integrated within vesicles remained trapped within cells. Intensity of GFP-LC3 expression in cells was then analysed by flow cytometry. Left panel: remaining GFP-LC3 signal after saponine treatment of siCTRL-treated cells. Middle panel: GFP-LC3 signal is increased in siNDP52-treated cells, whereas decreased in siATG5-treated cells. Right panel: siNDP52 treatment did not modulate GFP-LC3 signal in chloroquine-treated cells (one experiment representative of at least three, numbers are geometric mean of fluorescence).

Figure S2 related to Figure 3: NDP52 interaction with LC3A, LC3B and GABARAPL2, via a LIR-like motif.

(A) NDP52 interaction with LC3B via a LIR-like motif. HeLa cells were transfected with vector encoding either GST alone, GST-LC3B or GST-LC3C, and the indicated Flag tagged NDP52 constructs (see Figure 3A for a schematic representation of the constructs). The cells were lysed 48hrs later. The GST tagged proteins were purified on Glutathione Sepharose and then blotted with anti-GST or anti-Flag (one representative experiment of at least three independent experiments). One representative Western Blot. Binding between the Flag-NDP52 constructs and GST-LC3s were

evaluated as the ratio between the anti-Flag Western blot signal in co-affinity purification and total lysate normalised by the anti-GST-LC3 signal in the co-affinity purification.

(B) LIR-like motif involvement in NDP52 interaction with LC3A, LC3B and GABARAPL2. HeLa cells were transfected with vector encoding either GST alone, GST-LC3A, GST-LC3B, GST-GABARAP, GST-GABARAPL1 or GST-GABARAPL2 and the indicated Flag tagged NDP52 mutants (see Figure 3A for a schematic representation of the NDP52 constructs). The cells were lysed 48hrs later. The GST tagged proteins were purified on Glutathione Sepharose and then blotted with anti-GST or anti-Flag antibodies. A representative Western Blot is shown and binding between the Flag-NDP52 constructs and GST-LC3s were evaluated as the ratio between the anti-Flag western blot signal in co-affinity purification and total lysate normalised by the anti-GST-LC3 signal in the co-affinity purification.

(C) LIR-like motif involvement in NDP52 Δ SKICH Δ CLIR interaction with LC3A, LC3B, GABARAP, GABARAPL1 and GABARAPL2. HeLa cells were transfected with the indicated vectors and protein interactions were analyzed as in (B).

Figure S3 related to Figure 3 and 4: Functions of NDP52 LIR-like motif and the C245 residue, and of ATG8s in autophagosome maturation

(A-D) NDP52 activity in autophagosome maturation required a functional LIR-like motif and the C245 residue. mRFP-GFP-LC3 HeLa cells were first transfected with control siRNA or siNDP52 for 48hrs before a second transfection with the indicated construct-encoding plasmid. Representative profiles of autophagosomes (RFP⁺GFP⁺ dots) and autolysosomes (RFP⁺GFP⁻ dots) per cell section assessed by confocal microscopy are shown and were quantified. Results are expressed as absolute numbers of individual vesicles (total autophagic vesicles = all RFP⁺ dots) (A/C), and as the percentage of total autophagic vesicles (B/D) (mean \pm SD of three independent experiments carried out in duplicates).

(E-F) ATG8s silencing in autophagosome maturation. (E) HeLa cells were transfected with siRNAs targeting LC3A (siLC3A), LC3A and LC3B (siLC3A/B), LC3C (siLC3C), GABARAP (siGABARAP), GABARAPL1 (siGABARAPL1), GABARAPL2 (siGABARAPL2) or a control sequence (siCTRL). After 48h, relative mRNA expression was assessed by qPCR. Each graph displays the relative mRNA quantity compared to siCTRL condition for each indicated gene. (F) HeLa cells transfected with the indicated siRNAs for 48hrs were lysed and anti-p62 and anti-ACTIN western blots were performed. Representative western blots of the results are shown (one experiment representative of three). GABARAP is abbreviated as GABA.

Figure S4 related to Figure 4: Interaction of NDP52 mutants with Galectin8, role of NDP52 in xenophagy and role of OPTINEURIN in autophagosome maturation.

(A) Interaction of NDP52 mutants with Galectin8. HeLa cells were transfected with vectors encoding either GST alone or GST-Galectin8, and the indicated Flag tagged NDP52 constructs (see Figure 3A for details on the constructs). The cells were lysed 48hrs later and GST tagged proteins were purified by co-affinity purification (AP) before western blotting the eluted complexes for revealing GST or Flag tagged proteins.

(B) NDP52 requirement for both bacterial targeting and degradation during xenophagy. HeLa cells were first transfected with control siRNA or siNDP52 for 48hrs before a second transfection with the indicated construct-encoding plasmids. Twenty-four hours later, cells were infected for 15min with *S. Typhimurium*. Cells were then washed and extracellular *S. Typhimurium* cells were killed by gentamicin treatment. Infected cells were then cultured for two or six additional hours. For each condition, intracellular *S. Typhimurium* viability is presented as the Colony forming Units (CFU) per ml at 2hrs or 6hrs pi of one experiment extracted from Figure 4D (mean of triplicate \pm SD). Two-tailed Welch T-test was performed on the triplicates of each individual condition to assess the fidelity with which the replicates were created, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

(C – E) SQSTM1/p62 and OPTINEURIN function in autophagosome maturation. (C) HeLa cells were treated with the indicated siRNA. 48hrs later, the expression of the respective proteins was assessed by western blot. (D, E) mRFP-GFP-LC3 HeLa cells were first transfected with control siRNA, siNDP52, siRNA against Optineurin (siOPTN) or siRNA against SQSTM1 (siSQSTM1) for 48hrs. Representative profiles of autophagosomes (RFP⁺GFP⁺ dots) and autolysosomes (RFP⁺GFP⁻ dots) per cell section assessed by confocal microscopy are shown and were quantified. Results are expressed as absolute numbers of individual vesicles (total autophagic vesicles = all RFP⁺ dots) (D), and as the percentage of total autophagic vesicles (E) (mean \pm SD of three independent experiments carried out in duplicates).

(F) Cartoon model for the dual function of NDP52 in xenophagy. NDP52 targets Galectin8 (Gal8)-bound bacteria-containing damaged vesicles or ubiquitin (Ub)-associated intracellular pathogens to autophagosomal membranes *via* engagement of the LC3C-interacting CLIR motif (Top representation). NDP52 regulates then the maturation of bacteria-containing autophagosomes *via* engagement of a MYOSIN VI (Myo VI) binding domain and recruitment of LC3A, LC3B or GABARAPL2-mediated by the LIR-like motif (Bottom representation).

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies and Reagents

Antibodies used were: anti-Flag (F1804), anti-GST (A7340), anti-NDP52 (HPA023195), anti-LC3B (L7543), anti-actin (A2066) and anti-ATG5 (A0856) all from Sigma-Aldrich, anti-Ubiquitinated (clone FK2 Millipore, 04-263), anti-LAMP1 (BD Pharmingen, 555798), anti-SQSTM1/p62 (Santa Cruz, sc-28359) and anti-Salmonella (Thermo Scientific PA1-7244). Secondary antibodies used were: anti-Mouse conjugated to Peroxydase (A2304) from Sigma-Aldrich and anti-Rabbit conjugated to

HRP (NA9340) from GE Healthcare for western blot and anti-rabbit conjugated to Alexa Fluor 568 (A11011), anti-mouse conjugated to Alexa Fluor 568 (A11031), anti-mouse conjugated to Alexa Fluor 488 (A21202) and anti-rabbit conjugated to Alexa Fluor 647 (A31573) from Molecular Probes for confocal microscopy. Pharmacological agents used were rapamycin (100 nM) or chloroquine (50 μ M), both purchased from Sigma.

Molecular Cloning, Co-affinity Purification and siRNA

The mutants/constructs were engineered into a pCR3-3xFlag vector allowing the expression of the proteins fused with a triple Flag tag in N-terminal position or in a pDest27 plasmid allowing the expression of Glutathione S-transferase (GST) tagged proteins for co-affinity purification experiments. LC3B, LC3C, LC3A, GABARAP, GABARAPL1 and GABARAPL2 were engineered into a pDest27 plasmid allowing the expression of Glutathione S-transferase (GST) tagged proteins for co-affinity purification experiments. All primer sequences are available upon request. For co-affinity purification assays HeLa cells were seeded at 2.5×10^5 cells per well in 6 well-plates. Twenty-four hours later, cells were transfected with 1 μ g/well of plasmid encoding the GST-tagged genes and 1 μ g/well of plasmid encoding the Flag-tagged genes. The cells were harvested 48hrs later and lysed in PBS containing Calcium and Magnesium with 0.5 % of Nonidet P40 and protease inhibitor cocktail (Complete Mini EDTA free, Roche Applied Science # 04693159001). The purified lysate was incubated overnight at 4°C on Glutathione Sepharose (GE Healthcare #17-0746-01). Elution and western blotting were performed the next day. The following siRNAs were purchased from Invitrogen: stealth siRNA specific of human NDP52 (HSS115635), human ATG5 (HSS114103) and Negative Control MED GC#3 (12935-113).

Confocal microscopy

All images were taken on a confocal Zeiss LSM 510 or Zeiss LSM 710 with a plan apochromat 63X objective. The quantification of fluorescent vesicles was carried out using ImageJ. The cells were cultured in 24 well-plates with a sterile coverslip in each well. The cells were fixed in 2% paraformaldehyde for 20min, or ice cold acetone for 5min in infections experiments. Co-localisation experiments were assessed using the JaCoP plugin for ImageJ and Mander's coefficient was used to quantify co-localisation of NDP52 and GFP-LC3 dots and 60 cells were analysed per sample for co-localisation experiments. For flux analysis with mRFP-GFP-expressing cells, at least 100 cells per individual experiment were enumerated.

S. Typhimurium Infections

Salmonella enterica serovar Typhimurium (strain 12023) was grown overnight in LB broth (Sigma). Before infection of the cells, this culture was diluted at 1:33 and cultured for another 3.5 hours. HeLa cells in 24 well-plates at 80% confluence were infected with 20 μ L of this culture diluted in 180 μ L of

DMEM with 10% FBS and no antibiotics for 15min. The cells were then washed 3 times with PBS and cultured in DMEM with 10% FBS and 100µg/mL gentamicin for 1 hour. For the rest of the experiment, the cells were cultured in DMEM with 10% FBS and 20µg/mL gentamicin. To count intracellular bacteria, cells in triplicate were washed 3 times with PBS and then lysed in 1mL of saponin 1% (diluted volume at volume in PBS). Each triplicate was plated individually in duplicate on LB agar plates prior to numeration and CFU calculation.

Flow cytometry

The cells were detached and washed once in PBS. The cells were then incubated 5min on ice either with saponin 0.05% in PBS or PBS alone. The cells were finally washed twice with PBS and 50 000 events were acquired on an Accuri C6 flow cytometer. The data were analysed using FlowJo software.

RNAi

For mammalian ATG8s, siRNAs targeting the following sequences (von Muhlinen et al. Molecular Cell 2012) were synthesized (Life technologies): si*LC3A* 5'GGC UUC CUC UAU AUG GUC UAC GCC U; si*LC3A/B* 5'CGG ACC AUG UCA ACA UGA GCG AGU U; si*LC3C* 5' GCU UGG CAA UCA GACA AGA GGA AGU; si*GABARAP* 5'GAG GGC GAG AAG AUC CGA AAG AAA U; si*GABARAPL1* 5'GAG GAC GCC UUA UUC UUC UUU GUC A; si*GABARAPL2* 5'GCC UAA CUA UGG GAC AGC UUU ACG A. The efficiency and specificity of each siRNA was validated using RT-qPCR. Silencing RNAs against Optineurin (si*OPTN*) and SQSTM1 (si*SQSTM1*) were from Dharmacon (references L-016269-00-0005 and L-010230-00-0005, respectively). The efficiency of each siRNA was validated by Western Blot using anti-Optineurin from Abcam (ab23666) and anti-SQSTM1 from Santa Cruz (sc-28359).

Quantitative PCR

Following total RNA isolation using Trizol (Life Technologies) and DNase Turbo (Ambion) treatment, cDNA was synthesized with the High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosciences) according to manufacturer's instructions. Gene expression was quantified using a Fast Start Universal SYBR green Master (ROX) kit (Roche) along with specific primers according to the manufacturer's instructions. Relative amounts of cDNA were calculated using the Ct method, corrected with actin cDNA levels in each samples and normalized to siCTRL condition for each gene. The following primers were used: 5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3' and 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3' for *ACTB*, encoding actin (control); 5'-CAGCACCCAGCAAATC-3' and 5'-TCTTTCTCCTGCTCGTAGA-3' for *MAP1LC3A*, encoding LC3A; 5'-GAGAAGCAGCTTCTGTTCTGG-3' and 5'-AAGAAGGCCTGATTAGCA-3' for *MAP1LC3B*, encoding LC3B; 5'-CCCAAGCGTCAGACCCTTC-3' and 5'-GCTCCGGATGATGCTGAG-3' for encoding *MAP1LC3C*, LC3C; 5'-TGCCGGTGATAGTAGAAA-3' and 5'-

GGTGTTCTGGTACAGCT-3' for *GABARAP*, encoding GABARAP; 5'-
TGCCCTCTGACCTTACTG-3' and 5'-AGTCTTCCTCATGATTGTC-3' for *GABARAPL1/GEC1*,
encoding GABARAPL1; 5'-TCGCTGGAACACAGATG-3' and 5'-TGTCCCATAGTTAGGCTG-3'
for *GABARAPL2/GATE-16*, encoding GABARAPL2.

Annexe II

Revue dans *Frontiers in Immunology* :
IRGM in autophagy and viral infections.

Petkova DS, Viret C, Faure M



IRGM in autophagy and viral infections

Denitsa S. Petkova, Christophe Viret and Mathias Faure*

Laboratory of Autophagy, Infections and Immunity, INSERM, U1111, CIRI, Université Lyon 1, Lyon, France

Edited by:

Christian Muenz, University of Zurich, Switzerland

Reviewed by:

Philippe Pierre, Centre National de La Recherche Scientifique, France
John D. MacMicking, Yale University School of Medicine, USA

*Correspondence:

Mathias Faure, Laboratory of Autophagy, Infections and Immunity, INSERM, U1111, CIRI, Université Lyon 1, 21 Avenue Tony Garnier, 69365 Lyon Cedex 07, France.
e-mail: mathias.faure@inserm.fr

Autophagy is a cell autonomous process allowing each individual cell to fight intracellular pathogens. Autophagy can destroy pathogens within the cytosol, and can elicit innate and adaptive immune responses against microorganisms. Nevertheless, numerous pathogens have developed molecular strategies enabling them to avoid or even exploit autophagy for their own benefit. IRGM (immunity-related GTPase family M) is a human protein recently highlighted for its contribution to autophagy upon infections. The physical association of IRGM with mitochondria and different autophagy-regulating proteins, ATG5, ATG10, SH3GLB1, and LC3, contribute to explain how IRGM could regulate autophagy. Whereas IRGM is involved in autophagy-mediated immunity against bacteria, certain viruses seem to have developed strategies to manipulate autophagy through the selective targeting of this protein. Furthermore, *irgm* variants are linked to infection-associated human pathologies such as the inflammatory Crohn's disease. Here, we discuss how IRGM might contribute to human autophagy upon viral infection, and why its targeting might be beneficial to virus replication.

Keywords: autophagy, IRGM, virus, infection, immunity, interferon

INTRODUCTION

As obligatory intracellular parasites, viruses are continually faced with the degradative mechanism of macroautophagy (hereafter referred to as autophagy; **Figure 1**). Autophagy can destroy infectious virions or virus components that are essential for replication (Levine, 2005; Richetta and Faure, 2012). Furthermore, autophagy can deliver viral genomes to TLR-containing endosomes, which sets off synthesis of antiviral type I interferon (IFN-I; Lee et al., 2007). Autophagy can also contribute to virus-derived peptide presentation on class I and class II major histocompatibility complex (MHC) molecules to trigger antiviral CD8⁺ and CD4⁺ T cells responses, respectively (English et al., 2009; Munz, 2009). Thus, autophagy is an intrinsic cellular antiviral process able to enhance innate responses and to link them to adaptive immunity to optimize the fight against viruses.

Numerous viruses have developed molecular strategies to counteract autophagy. Certain viruses developed properties enabling them to inhibit the autophagy flux. For instance, herpes simplex virus (HSV)-1 or the cytomegalovirus (CMV) can inhibit autophagy induction by targeting BECLIN1 (BECN1), an essential autophagy-associated protein, through interactions with viral proteins (Orvedahl et al., 2007; Chaumorcet et al., 2012). Other viruses avoid autophagy degradation by inhibiting autophagosome maturation such as human immunodeficiency virus (HIV)-1 and influenza A virus which prevent autophagosome maturation through the physical interaction of one viral protein with BECN1 (Gannage et al., 2009; Kyei et al., 2009). Finally, viruses can induce a complete productive autophagy process and exploit it as a source for metabolites or as a platform for improving their own replication (Jackson et al., 2005; Heaton and Randall, 2010). Thus, host-virus co-evolution may have led to the selection of very different mechanisms used by viruses to avoid or exploit autophagy.

The understanding of the molecular pathways linked to the proviral or antiviral functions of autophagy is still at its beginning, especially regarding the molecular interplay between viruses and autophagy proteins. The human immunity-related GTPase family M (IRGM) protein was shown to be widely targeted by RNA viruses, several among which can exploit autophagy in human cells to improve their replication (Gregoire et al., 2011, 2012). However, how IRGM regulates autophagy upon infections remains unknown. This aspect might be of great interest in several human pathologies for which *irgm* was recently found to be involved.

IRGM AND AUTOPHAGY IN INFECTIONS

Unlike its mouse ortholog, the human *irgm* gene expression is not under the control of IFN- γ (Bekpen et al., 2005). Whereas 23 immune-related genes (*irg*) genes exist in mice and play immune-related functions, the IRGM-mediated cell autonomous resistance mechanisms have been first lost in primates due to deleterious mutations. However, *irgm* gene function was restored in some primates including *Homo sapiens*, possibly due to the insertion of a retroviral element that promotes its expression (Bekpen et al., 2009). In human, five different IRGM splice isoforms that differ in their C-terminal ends could be expressed, but their individual endogenous expression has not yet been documented (Bekpen et al., 2005; Singh et al., 2010); endogenous IRGM as well as over-expressed IRGMd isoform can localize in mitochondria (Singh et al., 2010; Gregoire et al., 2011).

One of the first molecular demonstrations of a role of autophagy in immune responses against intracellular microorganisms, involved the murine ortholog of IRGM, IRGM1 (Gutierrez et al., 2004), previously described to be involved in the vacuolar trafficking of phagosomes containing *Mycobacterium tuberculosis* (MacMicking et al., 2003). *M. tuberculosis* entrapped within phagosomes can avoid its destruction by preventing

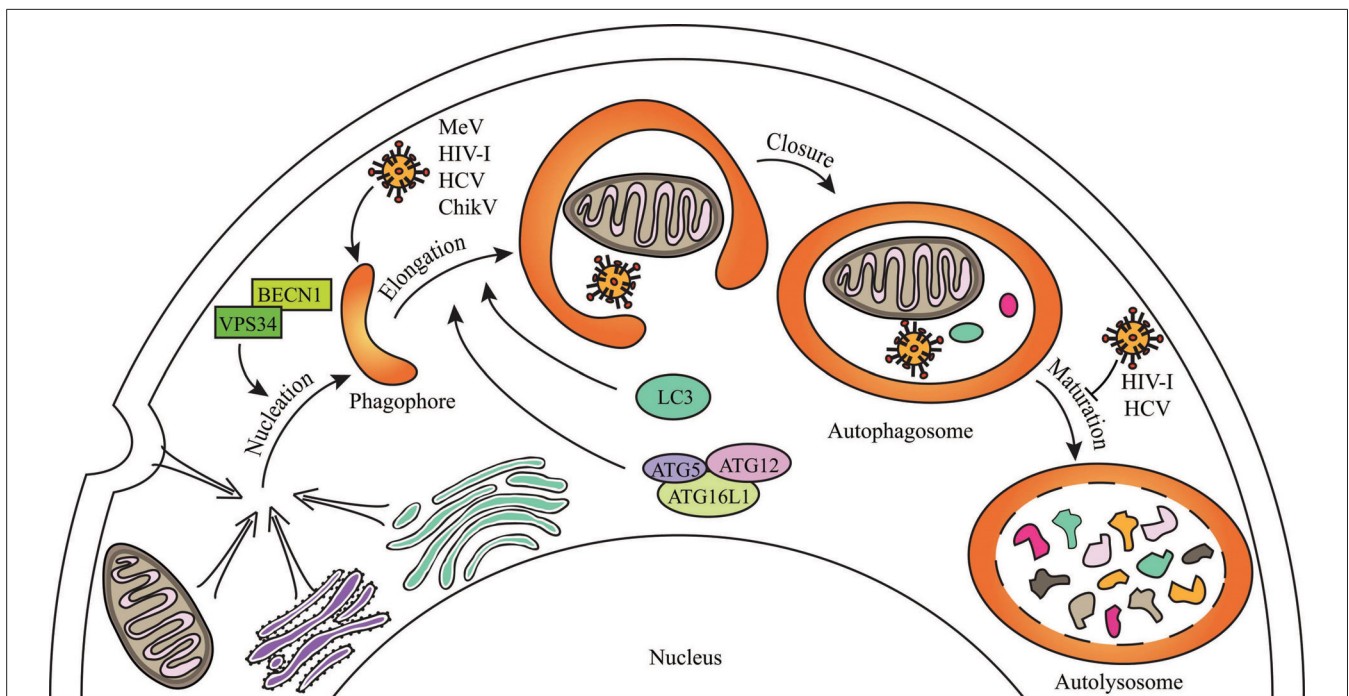


FIGURE 1 | General steps of mammalian autophagy. Autophagy engulfs portions of the cytosol through three main steps. The nucleation induces the formation of an isolation membrane which could emerge from different membrane sources (the endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus, the plasma membrane, the mitochondria) to form a phagophore which elongates to form double-membraned autophagosome vesicles. Autophagosome can sequester cytosolic material including senescent organelles such as mitochondria, long-lived proteins or intracellular pathogens, through

independent selective autophagies (for schematic simplification, all were represented within one single autophagosome). Autophagosome ultimately fuses with lysosomes during the maturation step to form autolysosomes where degradation occurs. Some of the crucial proteins involved in the different phases of autophagy are indicated. Several viruses can induce a complete autophagy flux, as MeV or ChikV, whereas others can inhibit autophagosome maturation, as HIV-1 and HCV, in order to improve their replication (see text for details).

phagosome fusion with lysosomes but the rerouting of *M. tuberculosis*-containing phagosomes to the autophagic machinery can ultimately degrade the bacteria. The treatment of murine macrophages with IFN- γ induces autophagy *via* IRGM1 and protects from *M. tuberculosis* (Gutierrez et al., 2004; Singh et al., 2006). IRGM-mediated autophagy also contributes to protection in human cells against intracellular *M. tuberculosis*, *Escherichia coli*, and *Salmonella typhimurium* (Singh et al., 2006; McCarroll et al., 2008; Lapaquette et al., 2010; Brest et al., 2011). The fact that there appears to be no role for IRGM or for its murine ortholog IRGM1 in the regulation of autophagy in absence of infection suggests a pathogen-specific function in autophagy for these proteins (Gregoire et al., 2011; Matsuzawa et al., 2012).

IRGM IN VIRUS-MEDIATED AUTOPHAGY

IRGM IS A COMMON TARGET OF RNA VIRUSES

RNA viruses genome encodes very few proteins including non-structural proteins that are often dedicated to prevent antiviral responses (Katze et al., 2008). To optimize replication, individual viral proteins could target several different host-cell proteins to counteract cellular antiviral responses. Alternatively, viral proteins could be dedicated to the efficient targeting of few host-cell proteins to counteract essential biological functions. The analysis of the interactions between 44 autophagy-associated human proteins and 83 viral proteins belonging to different RNA virus

families revealed IRGM as the most targeted autophagy-associated protein by these viruses. IRGM can interact with 12 viral proteins belonging to five different viruses, Chikungunya virus (ChikV), Mumps virus (MuV), Hepatitis C virus (HCV), Measles virus (MeV), and HIV-1 (Gregoire et al., 2011). Except for MuV for whom no autophagy-related studies were yet reported, all other viruses manipulate autophagy.

IRGM AND VIRUSES EXPLOITING THE AUTOPHAGY FLUX

Measles virus infection increases the formation of *de novo* autophagosomes by inducing the autophagy flux (Figure 1; Joubert et al., 2009; Meiffren et al., 2010; Gregoire et al., 2011). Genetic inhibition of autophagy limits MeV viral particles production, indicating that MeV exploits autophagy to replicate. The reduced expression of cellular IRGM with specific siRNA decreased MeV replication in HeLa cells. Furthermore, the non-structural MeV-C protein can interact with IRGM, and its single overexpression induces autophagy through an IRGM-dependent pathway (Gregoire et al., 2011). Thus, in the course of MeV infection, the MeV-C/IRGM interaction might contribute to the exploitation of autophagy by MeV.

Chikungunya virus infection also induces the autophagy flux (Figure 1; Krejbich-Trotot et al., 2011; Joubert et al., 2012). Whereas inhibition of autophagy limits ChikV viral particles production, the experimental promotion of autophagy improved

its replication (Krejebich-Trotot et al., 2011). ChikV replication is required to induce autophagy upon infection, and, as a consequence, autophagy delays cell death, which limits ChikV-associated pathogenesis, but favors its dissemination (Joubert et al., 2012). ChikV infection induces endoplasmic reticulum and oxidative stresses that independently can trigger autophagy (Joubert et al., 2012). However, it is unknown whether ChikV proteins contribute directly to autophagy induction and/or maintenance in infected cells. Especially, IRGM was found to interact with ChikV-NS2 and E3 proteins (Gregoire et al., 2011). It will be interesting to determine whether ChikV/IRGM interaction contributes to autophagy manipulation.

IRGM AND VIRUSES INHIBITING AUTOPHAGY MATURATION

During HIV-1 infection, autophagy manipulation strategies depend on the type of infected cells. The exposition of HIV-1-ENV protein on membranes of infected cells induces autophagy in uninfected CD4⁺ T cells leading to their apoptotic cell death (Espert et al., 2006). However, HIV-1 inhibits autophagy in infected CD4⁺ T cells, which facilitates replication (Espert et al., 2009). In dendritic cells (DC), HIV-1 inhibits autophagy through exhaustion of the mTOR signaling pathway (Blanchet et al., 2010). However, autophagy is induced in HIV-1-infected macrophages where HIV-1-NEF protein can interact with BECN1 to inhibit the maturation of autophagosomes, what is required for an efficient replication of HIV-1 (Espert et al., 2009; Kyei et al., 2009). NEF can also interact with IRGM and the overexpression of NEF induces an IRGM-dependent accumulation of autophagosomes (Kyei et al., 2009; Gregoire et al., 2011). Thus, while NEF-BECN1 interaction could prevent autophagosome maturation, NEF-IRGM interaction could be involved in autophagy induction upon HIV-1 infection in macrophages. Through its interaction with distinct autophagy-associated proteins, a unique HIV-1 protein could finely regulate autophagy. Interestingly, a NEF deficient strain of HIV-1 does not induce autophagosome accumulation, suggesting indeed that, besides preventing autophagosome maturation, NEF is involved in the induction of autophagy by HIV-1 (Kyei et al., 2009).

Infection by HCV also induces autophagy. This induction is independent of mTOR (Su et al., 2011; Shrivastava et al., 2012), and the contribution of the unfolded protein response remains unclear (Sir et al., 2008; Mohl et al., 2012). However, autophagy is required for an optimal HCV replication since inhibition of autophagy affects HCV replication (Dreux et al., 2009; Tanida et al., 2009; Gregoire et al., 2011). Reports have shown that HCV infection could either induce a complete autophagy flux or inhibit autophagosome maturation. This discrepancy might result from the models used and/or the kinetics of infection. HCV infection was shown to prevent autophagosome maturation at an early time of infection (Sir et al., 2008; Gregoire et al., 2011; Su et al., 2011). At a later one a complete autophagy flux was reported (Ke and Chen, 2011; Mohl et al., 2012). Interestingly, a subgenomic replicon expressing the non-structural NS3-5B proteins induces autophagy (Mohl et al., 2012). Furthermore, IRGM can interact with HCV-NS3, and the reduced expression of IRGM prevents HCV-induced and HCV-NS3-induced autophagy, and limits HCV replication (Gregoire et al., 2011).

Thus, viruses that manipulate autophagy either by benefiting from the complete autophagy flux or by inhibiting the maturation step, target IRGM. Beyond its role in virus biology, how IRGM contributes to the orchestration of autophagy upon viral infection remains to be understood.

IRGM IN AUTOPHAGY INDUCTION UPON VIRAL INFECTIONS IRGM AND AUTOPHAGY-ASSOCIATED PROTEINS

To date, only four cellular proteins were identified to interact with IRGM: ATG5, ATG10, MAP1LC3C, and SH3GLB1 (Figure 2). All these proteins contribute to autophagy, supporting the idea that IRGM plays an essential role in this process (Gregoire et al., 2011). ATG10, a conjugating E2-like protein, contributes to the assembly of the ATG12/ATG5 complex that binds ATG16L1 to form macromolecular ATG12/ATG5/ATG16L1 complexes essential for the elongation of the phagophore (Figure 1; Xie and Klionsky, 2007). MAP1LC3C is a member of the MAP1LC3 (known as LC3) sub-family and is also required for elongation of the phagophore through lipidation with phosphatidylethanolamine and anchoring within the extending phagophore (Figure 1; Weidberg et al., 2010). Finally, SH3GLB1 (also known as Bif-1) is a positive regulator of the nucleation process that initiates autophagosome formation, *via* its interaction with UVRAG, a protein of the BECN1/VPS34 complex. In nutrient deprived cells, SH3GLB1 colocalizes with ATG5 and LC3 to the autophagosome and potentiates the activation of the class III PI(3)-kinase VPS34 to promote autophagosome biogenesis (Figure 2; Takahashi et al., 2007). Thus, all the proteins known to interact with IRGM regulate one of the initial steps of autophagosome biogenesis, suggesting that IRGM might contribute to the nucleation and/or the elongation of autophagic vesicles through its interaction with one or several of these proteins. These interactions could be facilitated upon viral infection (Figure 2). Through the dampening of antiviral IFN-I synthesis, this targeting might be of further benefit to viruses as discussed below.

IRGM, MITOCHONDRIA, AUTOPHAGY, AND IFN-I IN VIRAL INFECTIONS

Overexpressed GFP-fused IRGMd was suggested to be translocated to the inner membrane of mitochondria *via* its association with cardiolipin (CL; Singh et al., 2010). CL is a phospholipid abundant in the inner mitochondrial membrane that is however also found in the outer membrane and at the contact sites between the two membranes (Schlame et al., 2000; Schug and Gottlieb, 2009). Thus IRGMd might also be associated to CL linked to the outer membrane of mitochondria, and exposed to the cytosol. The four other overexpressed GFP-fused IRGM isoforms (IRGMa/b/c/e) were not found associated to mitochondria (Singh et al., 2010). However, endogenous IRGM expression, detected with an antibody with putative ability to recognize all IRGM isoforms, is found associated to mitochondria suggesting that: (i) all endogenous IRGM can be located to mitochondria, (ii) IRGMd is the most expressed isoform, or (iii) due to possibly distinct folding among the isoforms, the epitope for the antibody is only accessible on IRGMd (Figure 2; Singh et al., 2010; Gregoire et al., 2011). Interestingly, among the proteins interacting with IRGM at least two were found partially associated with mitochondria, SH3GLB1 and ATG5. A fraction of SH3GLB1 localizes to mitochondria where

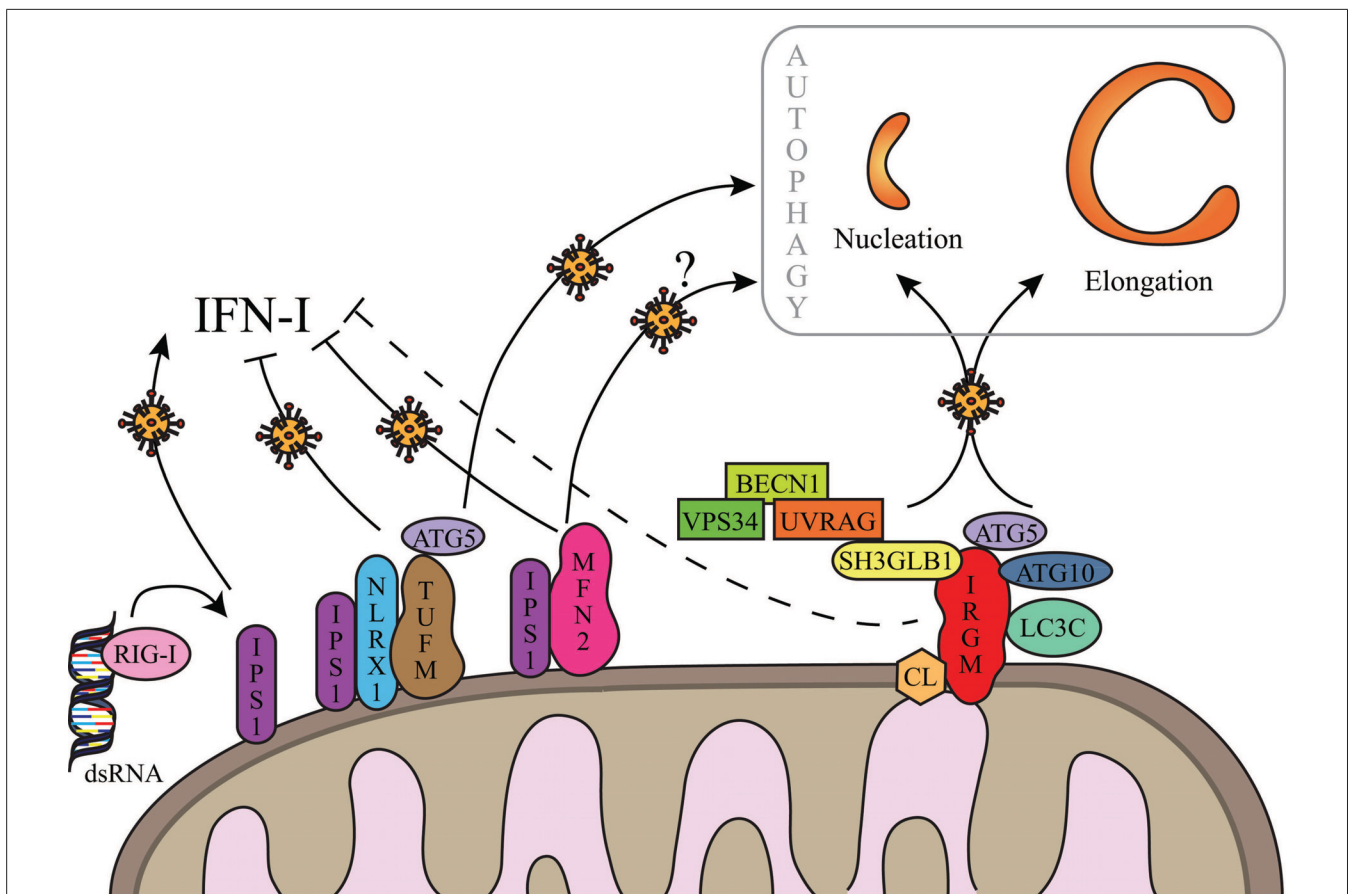


FIGURE 2 | Hypothetical regulation of autophagy by IRGM upon viral infections. IRGM is associated to mitochondria via cardiolipin (CL). Upon viral infection, IRGM could interact with four different autophagy-associated proteins which could support autophagosome biogenesis from mitochondria membrane, by regulating nucleation and/or elongation steps of autophagy. IRGM-mediated autophagy might correlate to a decrease of IFN-I synthesis similarly to what was described for TUFM and MFN2. Both

processes could benefit to viruses to improve their replication. Note that MFN2-mediated autophagy has not yet been reported in the context of viral infection (see text for details). As represented, viral double-stranded (ds)RNA can be recognized by RIG-I. IFN-I inhibition via IRGM is not yet demonstrated (dashed line) and putative not mitochondrial IRGM isoforms are not represented (see text for details).

it may contribute to the regulation of morphological dynamics of the outer mitochondrial membrane (Karbowski et al., 2004), and to mitochondria-dependent apoptotic signals by interacting with the proapoptotic protein BAX (Takahashi et al., 2005). ATG5 was also shown to associate with mitochondria through its binding to IPS-1, a mitochondria-associated adaptor which relays signals from viral genome-detecting cytosolic receptors RIG-I and MDA5, in order to promote IFN-I synthesis. This interaction contributes to the down-regulation of IFN-I production during viral infection (Jounai et al., 2007). A possible hypothesis for the molecular contribution of IRGM in autophagy would be that IRGM interacts/recruits its protein partners at the mitochondria to induce autophagy upon infections especially as mitochondria is one possible source of membrane for autophagosome biogenesis (Figures 1 and 2; Hailey et al., 2010). Furthermore, the IRGM targeting to mitochondria could allow viruses to limit IFN-I production similarly to two other mitochondrial proteins, MFN2 and TUFM, which were shown to dampen IFN-I production while inducing autophagy (Figure 2).

Indeed, MFN2 contributes to the supply of mitochondria membranes for the biogenesis of autophagosome (Hailey et al., 2010), and can down-regulate the production of IFN-I upon viral infection by interacting with IPS-1 (Yasukawa et al., 2009). Similarly, TUFM recruits the ATG5/ATG12 complex in order to induce autophagy, while it prevents RIG-I/IPS-1 signal transduction for IFN-I production *via* its interaction with NLRX1 (Lei et al., 2012). The antagonistic activities of TUFM and MFN2 on autophagy and IFN-I production were shown to benefit to virus replication (Yasukawa et al., 2009; Lei et al., 2012). As IRGM is associated to mitochondria and modulates autophagy induction upon virus infection, it would be important to evaluate its contribution to the ability of viruses to dampen IFN-I production; all the viruses described to date to target IRGM are known to inhibit IFN-I production. Thus, different mitochondrial proteins, including IRGM, might have dual functions upon virus infection, by inducing autophagy ultimately exploited by viruses, while restricting the innate antiviral response; the selective targeting of these proteins would offer an evident advantage for infectious viruses to

replicate within a cell. It remains however possible that cytosolic isoforms of IRGM contributes to autophagy induction upon viral infection.

IRGM AND AUTOPHAGY-MEDIATED VIRUS-DERIVED PEPTIDE MHC LOADING

It recently became clear that autophagy which is constitutively active in antigen-presenting cells (APCs), can regulate adaptive immune responses by promoting the access of antigens from intracellular pathogens to compartments that assemble peptide:MHC class II complexes for presentation to CD4⁺ T cells (Munz, 2009). Among viruses targeting IRGM, it was observed that the response of HIV-1 gag-specific CD4⁺ T cells to DC that process the virus was drastically reduced upon either pharmacological or genetic inhibition of autophagy, indicating a deficient capacity to process and present MHC class II-restricted HIV-1 determinants when autophagy is impaired (Blanchet et al., 2010). The negative regulation of autophagy in DCs by HIV-1 could thus help the virus evade CD4⁺ T cell responses. As to presentation by MHC class I molecules, it is known that in mouse DCs, IRGM3/IGTP (another murine ortholog or IRGM) plays an important role in cross-presentation of phagocytosed protein antigens to conventional CD8⁺ T cells without impacting antigen presentation to CD4⁺ T cells (Bougnères et al., 2009).

IRGM VARIANTS IN HUMAN PATHOLOGIES AND VIRAL INFECTIONS

Recent studies identified *irgm* variants as susceptibility genes for Crohn's disease (CD), tuberculosis (TB), gastric cancer and autoimmune systemic lupus erythematosus (SLE).

IRGM, CD, AND VIRAL INFECTION

Crohn's disease is a chronic inflammatory bowel disease resulting from an aberrant immune response toward the intestinal flora that leads to inflammation and tissue damages (Xavier et al., 2008). Genome-wide association studies identified polymorphisms in two autophagy-associated genes, *atg16L1* and *irgm*, that are linked to CD. CD-associated *irgm* polymorphisms, that influence or not the primary protein sequence, were both reported (Parkes et al., 2007; McCarroll et al., 2008; Moon et al., 2012). Interestingly, the gut mucosa of CD patients harbors an increased amount of the pathogenic Adherent-invasive *E. coli* (AIEC) and IRGM-dependent autophagy contributes to fight pathogenic AIEC (Lapaquette et al., 2012). Moreover, microRNA (miR)-196 binds strongly the *irgm* protective haplotype, whereas expression of the risk haplotype remains intact thus leading to overall deregulation of IRGM expression (Brest et al., 2011). miR-196 was found over-expressed in inflamed ileum and colon of patients, independently of the protective or risk *irgm* haplotype. As a result, IRGM was less expressed in individuals with the protective genotype. Furthermore, the transfection of HEK293T cells with miR-196 resulted in a decreased autophagy flux, indicating that miR-196 acts as a negative regulator of autophagy *via* IRGM upon AIEC infection. These studies suggested that the cornerstone of autophagy regulation by IRGM upon infection could be its fine tuned level of expression.

Interestingly, a viral infection-plus-susceptibility autophagy gene interaction could contribute to the onset of CD. Indeed, the

hypomorphic expression of *atg16L1* develops a CD-like pathology in mice only upon infection with a viral strain of murine norovirus (Cadwell et al., 2010). This study pointed toward a genotype-specific viral trigger of a pathology very similar to CD. It would be interesting to investigate the role of viral infections in *irgm* variant expressing CD patients, for a possible contribution of virus/IRGM interactions in the onset or the development of CD.

IRGM IN TB, GASTRIC CANCER, AND SLE

As mentioned above, IRGM contributes to the control of *M. tuberculosis* in macrophages *via* autophagy. Interestingly, an *irgm* polymorphism protects from TB caused by Euro-American subgroups of *M. tuberculosis* (Intemann et al., 2009). It was proposed that when the polymorphism occurs, IRGM is more expressed resulting in enhanced autophagy and explaining a more efficient destruction of bacteria. Conversely, several different polymorphisms in the *irgm* gene have been found to result in an increased susceptibility to TB in Chinese and African American populations (Che et al., 2010; King et al., 2011). In African American populations one CD-related polymorphism was associated positively with TB suggesting a possible link between CD and an infectious etiology. *Irgm* polymorphism is possibly also a risk factor for gastric cancer (Burada et al., 2012). Although deregulation of autophagy is well established to be associated with cancer (White, 2012), a role for IRGM in these diseases has to be further determined. Similarly, a genetic-association study suggested that *irgm* variants are linked to SLE, an autoimmune disease (Zhou et al., 2011). A role of IRGM in these diseases remains to be fully depicted as well as a potential influence of viral infections on such role.

CONCLUSION

In an infected cell a virus has to counteract cell autonomous defense mechanisms while exploiting elementary cellular processes to replicate efficiently. By selectively targeting autophagy, viruses might accomplish both. As discussed here, IRGM could be a key protein for autophagy manipulation upon viral infection. The molecular organization involving IRGM in autophagy during viral infections requires further investigations. While interactions of IRGM with its protein partners were only observed in transfected cells for the time being, it would be important to visualize these interactions between endogenous proteins and during productive infections. It would also be crucial to understand why and how IRGM plays an antibacterial function, whereas it seems to act as a proviral factor. Furthermore, the role of IRGM could be cell type-specific and, as described for several autophagy-related proteins, IRGM might have non-autophagy-related functions upon infections. In regards of the link of numerous *irgm* variants with human pathologies, the comprehension of the role(s) of IRGM in autophagy-mediated immunity could be of crucial importance to fight infectious viruses and human pathologies.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge grants from INSERM, CNRS, University Lyon-1, Institut universitaire de France and ANR-08-JCJC-0064-01. Denitsa S. Petkova is the recipient of a fellowship from Ligue Nationale Contre le Cancer.

REFERENCES

- Bekpen, C., Hunn, J. P., Rohde, C., Parvanova, I., Guethlein, L., Dunn, D. M., et al. (2005). The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. *Genome Biol.* 6, R92.
- Bekpen, C., Marques-Bonet, T., Alkan, C., Antonacci, F., Leogrande, M. B., Ventura, M., et al. (2009). Death and resurrection of the human IRGM gene. *PLoS Genet.* 5:e1000403. doi: 10.1371/journal.pgen.1000403
- Blanchet, F. P., Moris, A., Nikolic, D. S., Lehmann, M., Cardinaud, S., Stalder, R., et al. (2010). Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunoamphisomes in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses. *Immunity* 32, 654–669.
- Bougneres, L., Helft, J., Tiwari, S., Vargas, P., Chang, B. H., Chan, L., et al. (2009). A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC class I in dendritic cells. *Immunity* 31, 232–244.
- Brest, P., Lapaquette, P., Souidi, M., Lebrigand, K., Cesaro, A., Vouret-Craviari, V., et al. (2011). A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat. Genet.* 43, 242–245.
- Burada, F., Plantinga, T. S., Ioana, M., Rosentul, D., Angelescu, C., Joosten, L. A., et al. (2012). IRGM gene polymorphisms and risk of gastric cancer. *J. Dig. Dis.* 13, 360–365.
- Cadwell, K., Patel, K. K., Maloney, N. S., Liu, T. C., Ng, A. C., Storer, C. E., et al. (2010). Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell* 141, 1135–1145.
- Chaumorcet, M., Lussignol, M., Mouna, L., Cavignac, Y., Fahie, K., Cotte-Lafitte, J., et al. (2012). The human cytomegalovirus protein TRS1 inhibits autophagy via its interaction with Beclin 1. *J. Virol.* 86, 2571–2584.
- Che, N., Li, S., Gao, T., Zhang, Z., Han, Y., Zhang, X., et al. (2010). Identification of a novel IRGM promoter single nucleotide polymorphism associated with tuberculosis. *Clin. Chim. Acta* 411, 1645–1649.
- Dreux, M., Gastaminza, P., Wieland, S. F., and Chisari, F. V. (2009). The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 14046–14051.
- English, L., Chemali, M., Duron, J., Rondeau, C., Laplante, A., Gingras, D., et al. (2009). Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat. Immunol.* 10, 480–487.
- Espert, L., Denizot, M., Grimaldi, M., Robert-Hebmann, V., Gay, B., Varbanov, M., et al. (2006). Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J. Clin. Invest.* 116, 2161–2172.
- Espert, L., Varbanov, M., Robert-Hebmann, V., Sagnier, S., Robbins, L., Sanchez, F., et al. (2009). Differential role of autophagy in CD4 T cells and macrophages during X4 and R5 HIV-1 infection. *PLoS ONE* 4:e5787. doi: 10.1371/journal.pone.0005787
- Gannage, M., Dormann, D., Albrecht, R., Dengjel, J., Torossi, T., Ramer, P. C., et al. (2009). Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe* 6, 367–380.
- Gregoire, I. P., Rabourdin-Combe, C., and Faure, M. (2012). Autophagy and RNA virus interactomes reveal IRGM as a common target. *Autophagy* 8, 1136–1137.
- Gregoire, I. P., Richetta, C., Meyniel-Schicklin, L., Borel, S., Pradezynski, F., Diaz, O., et al. (2011). IRGM is a common target of RNA viruses that subvert the autophagy network. *PLoS Pathog.* 7:e1002422. doi: 10.1371/journal.ppat.1002422
- Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I., and Deretic, V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 119, 753–766.
- Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K., et al. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141, 656–667.
- Heaton, N. S., and Randall, G. (2010). Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe* 8, 422–432.
- Intemann, C. D., Thye, T., Niemann, S., Browne, E. N., Amanua Chinbuah, M., Enimil, A., et al. (2009). Autophagy gene variant IRGM -261T contributes to protection from tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* but not by *M. africanum* strains. *PLoS Pathog.* 5:e1000577. doi: 10.1371/journal.ppat.1000577
- Jackson, W. T., Giddings, T. H. Jr., Taylor, M. P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R. R., et al. (2005). Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* 3:e156. doi: 10.1371/journal.pbio.0030156
- Joubert, P. E., Meiffren, G., Gregoire, I. P., Pontini, G., Richetta, C., Flacher, M., et al. (2009). Autophagy induction by the pathogen receptor CD46. *Cell Host Microbe* 6, 354–366.
- Joubert, P. E., Werneke, S., de la Calle, C., Guivel-Benhassine, F., Giordini, A., Peduto, L., et al. (2012). Chikungunya-induced cell death is limited by ER and oxidative stress-induced autophagy. *Autophagy* 8, 1261–1263.
- Jounai, N., Takeshita, F., Kobiyama, K., Sawano, A., Miyawaki, A., Xin, K. Q., et al. (2007). The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 14050–14055.
- Karbowski, M., Jeong, S. Y., and Youle, R. J. (2004). Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J. Cell Biol.* 166, 1027–1039.
- Katze, M. G., Fornek, J. L., Palermo, R. E., Walters, K. A., and Korth, M. J. (2008). Innate immune modulation by RNA viruses: emerging insights from functional genomics. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 644–654.
- Ke, P. Y., and Chen, S. S. (2011). Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 121, 37–56.
- King, K. Y., Lew, J. D., Ha, N. P., Lin, J. S., Ma, X., Graviss, E. A., et al. (2011). Polymorphic allele of human IRGM1 is associated with susceptibility to tuberculosis in African Americans. *PLoS ONE* 6:e16317. doi: 10.1371/journal.pone.0016317
- Krejchich-Trotot, P., Gay, B., Li-Pat-Yuen, G., Hoarau, J. J., Jaffar-Bandjee, M. C., Briant, L., et al. (2011). Chikungunya triggers an autophagic process which promotes viral replication. *Virol. J.* 8, 432.
- Kyei, G. B., Dinkins, C., Davis, A. S., Roberts, E., Singh, S. B., Dong, C., et al. (2009). Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J. Cell Biol.* 186, 255–268.
- Lapaquette, P., Bringer, M. A., and Darfeuille-Michaud, A. (2012). Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell. Microbiol.* 14, 791–807.
- Lapaquette, P., Glasser, A. L., Huett, A., Xavier, R. J., and Darfeuille-Michaud, A. (2010). Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell. Microbiol.* 12, 99–113.
- Lee, H. K., Lund, J. M., Ramanathan, B., Mizushima, N., and Iwasaki, A. (2007). Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* 315, 1398–1401.
- Lei, Y., Wen, H., Yu, Y., Taxman, D. J., Zhang, L., Widman, D. G., et al. (2012). The mitochondrial proteins NLRX1 and TUFM form a complex that regulates type I interferon and autophagy. *Immunity* 36, 933–946.
- Levine, B. (2005). Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 120, 159–162.
- MacMicking, J. D., Taylor, G. A., and McKinney, J. D. (2003). Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible IRG-47. *Science* 302, 654–659.
- Matsuzawa, T., Kim, B. H., Shenoy, A. R., Kamitani, S., Miyake, M., and Macmicking, J. D. (2012). IFN-gamma elicits macrophage autophagy via the p38 MAPK signaling pathway. *J. Immunol.* 189, 813–818.
- McCarroll, S. A., Huett, A., Kuballa, P., Chilewski, S. D., Landry, A., Goyette, P., et al. (2008). Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat. Genet.* 40, 1107–1112.
- Meiffren, G., Joubert, P. E., Gregoire, I. P., Codogno, P., Rabourdin-Combe, C., and Faure, M. (2010). Pathogen recognition by the cell surface receptor CD46 induces autophagy. *Autophagy* 6, 299–300.
- Mohl, B. P., Tedbury, P. R., Griffin, S., and Harris, M. (2012). Hepatitis C virus-induced autophagy is independent of the unfolded protein response. *J. Virol.* 86, 10724–10732.
- Moon, C. M., Shin, D. J., Kim, S. W., Son, N. H., Park, A., Park, B., et al. (2012). Associations between genetic variants in the IRGM gene and inflammatory bowel diseases in the Korean population. *Inflamm. Bowel Dis.* doi: 10.1002/ibd.22972. [Epub ahead of print].
- Munz, C. (2009). Enhancing immunity through autophagy. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 423–449.
- Orvedahl, A., Alexander, D., Tallozy, Z., Sun, Q., Wei, Y., Zhang, W., et al.

- (2007). HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* 1, 23–35.
- Parkes, M., Barrett, J. C., Prescott, N. J., Tremelling, M., Anderson, C. A., Fisher, S. A., et al. (2007). Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.* 39, 830–832.
- Richetta, C., and Faure, M. (2012). Autophagy in antiviral innate immunity. *Cell. Microbiol.* doi: 10.1111/cmi.12043. [Epub ahead of print].
- Schlame, M., Rua, D., and Greenberg, M. L. (2000). The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* 39, 257–288.
- Schug, Z. T., and Gottlieb, E. (2009). Cardiolipin acts as a mitochondrial signalling platform to launch apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 2022–2031.
- Shrivastava, S., Bhanja Chowdhury, J., Steele, R., Ray, R., and Ray, R. B. (2012). Hepatitis C virus upregulates Beclin1 for induction of autophagy and activates mTOR signaling. *J. Virol.* 86, 8705–8712.
- Singh, S. B., Davis, A. S., Taylor, G. A., and Deretic, V. (2006). Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 313, 1438–1441.
- Singh, S. B., Ornatowski, W., Vergne, I., Naylor, J., Delgado, M., Roberts, E., et al. (2010). Human IRGM regulates autophagy and cell-autonomous immunity functions through mitochondria. *Nat. Cell Biol.* 12, 1154–1165.
- Sir, D., Chen, W. L., Choi, J., Wakita, T., Yen, T. S., and Ou, J. H. (2008). Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology* 48, 1054–1061.
- Su, W. C., Chao, T. C., Huang, Y. L., Weng, S. C., Jeng, K. S., and Lai, M. M. (2011). Rab5 and class III phosphoinositide 3-kinase Vps34 are involved in hepatitis C virus NS4B-induced autophagy. *J. Virol.* 85, 10561–10571.
- Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cualing, H. D., Sun, M., Sato, Y., et al. (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* 9, 1142–1151.
- Takahashi, Y., Karbowski, M., Yamaguchi, H., Kazi, A., Wu, J., Sebt, S. M., et al. (2005). Loss of Bif-1 suppresses Bax/Bak conformational change and mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9369–9382.
- Tanida, I., Fukasawa, M., Ueno, T., Kominami, E., Wakita, T., and Hanada, K. (2009). Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles. *Autophagy* 5, 937–945.
- Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., and Elazar, Z. (2010). LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J.* 29, 1792–1802.
- White, E. (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12, 401–410.
- Xavier, R. J., Huett, A., and Rioux, J. D. (2008). Autophagy as an important process in gut homeostasis and Crohn's disease pathogenesis. *Gut* 57, 717–720.
- Xie, Z., and Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* 9, 1102–1109.
- Yasukawa, K., Oshiumi, H., Takeda, M., Ishihara, N., Yanagi, Y., Seya, T., et al. (2009). Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. *Sci. Signal.* 2, ra47.
- Zhou, X. J., Lu, X. L., Lv, J. C., Yang, H. Z., Qin, L. X., Zhao, M. H., et al. (2011). Genetic association of PRDM1-ATG5 intergenic region and autophagy with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 1330–1337.

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

Received: 30 October 2012; accepted: 23 December 2012; published online: 17 January 2013.

Citation: Petkova DS, Viret C and Faure M (2013) IRGM in autophagy and viral infections. *Front. Immun.* 3:426. doi: 10.3389/fimmu.2012.00426

This article was submitted to *Frontiers in Antigen Presenting Cell Biology*, a specialty of *Frontiers in Immunology*.

Copyright © 2013 Petkova, Viret and Faure. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

Références bibliographiques

Ader, N., Brindley, M.A., Avila, M., Origgi, F.C., Langedijk, J.P.M., Örvell, C., Vandeveld, M., Zurbriggen, A., Plemper, R.K., and Plattet, P. (2012). Structural rearrangements of the central region of the morbillivirus attachment protein stalk domain trigger F protein refolding for membrane fusion. *J. Biol. Chem.* *287*, 16324–16334.

Aichinger, M., Wu, C., Nedjic, J., and Klein, L. (2013). Macroautophagy substrates are loaded onto MHC class II of medullary thymic epithelial cells for central tolerance. *J. Exp. Med.* *210*, 287–300.

Al Rawi, S., Louvet-Vallée, S., Djeddi, A., Sachse, M., Culetto, E., Hajjar, C., Boyd, L., Legouis, R., and Galy, V. (2011). Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science* *334*, 1144–1147.

Al-Zeer, M.A., Al-Younes, H.M., Braun, P.R., Zerrahn, J., and Meyer, T.F. (2009). IFN-gamma-inducible Irga6 mediates host resistance against *Chlamydia trachomatis* via autophagy. *PloS One* *4*, e4588.

Ambjørn, M., Ejlerskov, P., Liu, Y., Lees, M., Jäätelä, M., and Issazadeh-Navikas, S. (2013). IFNB1/interferon- β -induced autophagy in MCF-7 breast cancer cells counteracts its proapoptotic function. *Autophagy* *9*, 287–302.

Antonioli, M., Albiero, F., Nazio, F., Vescovo, T., Perdomo, A.B., Corazzari, M., Marsella, C., Piselli, P., Gretzmeier, C., Dengjel, J., et al. (2014). AMBRA1 interplay with cullin E3 ubiquitin ligases regulates autophagy dynamics. *Dev. Cell* *31*, 734–746.

Asano, T., Komatsu, M., Yamaguchi-Iwai, Y., Ishikawa, F., Mizushima, N., and Iwai, K. (2011). Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and iron-replete cells. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 2040–2052.

Astier, A., Trescol-Biémont, M.C., Azocar, O., Lamouille, B., and Rabourdin-Combe, C. (2000). Cutting edge: CD46, a new costimulatory molecule for T cells, that induces p120CBL and LAT phosphorylation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 6091–6095.

Aversa, G., Carballido, J., Punnonen, J., Chang, C.C., Hauser, T., Cocks, B.G., and De Vries, J.E. (1997). SLAM and its role in T cell activation and Th cell responses. *Immunol. Cell Biol.* *75*, 202–205.

Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* *182*, 685–701.

Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., and Cuervo, A.M. (2008). The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 5747–5763.

Bandyopadhyay, U., Sridhar, S., Kaushik, S., Kiffin, R., and Cuervo, A.M. (2010). Identification of regulators of chaperone-mediated autophagy. *Mol. Cell* *39*, 535–547.

Barnett, T.C., Liebl, D., Seymour, L.M., Gillen, C.M., Lim, J.Y., Larock, C.N., Davies, M.R., Schulz, B.L., Nizet, V., Teasdale, R.D., et al. (2013). The globally disseminated M1T1 clone of group A *Streptococcus* evades autophagy for intracellular replication. *Cell Host Microbe* *14*, 675–682.

Beale, R., Wise, H., Stuart, A., Ravenhill, B.J., Digard, P., and Randow, F. (2014). A LC3-interacting motif in the influenza A virus M2 protein is required to subvert autophagy and maintain virion stability. *Cell Host Microbe* *15*, 239–247.

- Beare, P.A., Gilk, S.D., Larson, C.L., Hill, J., Stead, C.M., Omsland, A., Cockrell, D.C., Howe, D., Voth, D.E., and Heinzen, R.A. (2011). Dot/Icm type IVB secretion system requirements for *Coxiella burnetii* growth in human macrophages. *mBio* 2, e00175–00111.
- Bellini, W.J., Englund, G., Rozenblatt, S., Arnheiter, H., and Richardson, C.D. (1985). Measles virus P gene codes for two proteins. *J. Virol.* 53, 908–919.
- Berger, S.B., Romero, X., Ma, C., Wang, G., Faubion, W.A., Liao, G., Compeer, E., Keszei, M., Rameh, L., Wang, N., et al. (2010). SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages. *Nat. Immunol.* 11, 920–927.
- Bernales, S., McDonald, K.L., and Walter, P. (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol.* 4, e423.
- Berón, W., Gutierrez, M.G., Rabinovitch, M., and Colombo, M.I. (2002). *Coxiella burnetii* localizes in a Rab7-labeled compartment with autophagic characteristics. *Infect. Immun.* 70, 5816–5821.
- Berryman, S., Brooks, E., Burman, A., Hawes, P., Roberts, R., Netherton, C., Monaghan, P., Whelband, M., Cottam, E., Elazar, Z., et al. (2012). Foot-and-mouth disease virus induces autophagosomes during cell entry via a class III phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway. *J. Virol.* 86, 12940–12953.
- Bhattacharyya, S., Sen, U., and Vрати, S. (2014). Regulated IRE1-dependent decay pathway is activated during Japanese encephalitis virus-induced unfolded protein response and benefits viral replication. *J. Gen. Virol.* 95, 71–79.
- van Binnendijk, R.S., Poelen, M.C., Kuijpers, K.C., Osterhaus, A.D., and Uytdehaag, F.G. (1990). The predominance of CD8⁺ T cells after infection with measles virus suggests a role for CD8⁺ class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes (CTL) in recovery from measles. Clonal analyses of human CD8⁺ class I MHC-restricted CTL. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 144, 2394–2399.
- Birmingham, C.L., Smith, A.C., Bakowski, M.A., Yoshimori, T., and Brumell, J.H. (2006). Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the *Salmonella*-containing vacuole. *J. Biol. Chem.* 281, 11374–11383.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Øvervatn, A., Stenmark, H., and Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* 171, 603–614.
- Black, F.L., and Rosen, L. (1962). Patterns of measles antibodies in residents of Tahiti and their stability in the absence of re-exposure. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 88, 725–731.
- Blanchet, F.P., Moris, A., Nikolic, D.S., Lehmann, M., Cardinaud, S., Stalder, R., Garcia, E., Dinkins, C., Leuba, F., Wu, L., et al. (2010). Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunoamphisomes in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses. *Immunity* 32, 654–669.
- Blau, D.M., and Compans, R.W. (1995). Entry and release of measles virus are polarized in epithelial cells. *Virology* 210, 91–99.
- Bohn, W., Rutter, G., Hohenberg, H., Mannweiler, K., and Nobis, P. (1986). Involvement of actin filaments in budding of measles virus: studies on cytoskeletons of infected cells. *Virology* 149, 91–106.

- Boone, D.L., Turer, E.E., Lee, E.G., Ahmad, R.-C., Wheeler, M.T., Tsui, C., Hurley, P., Chien, M., Chai, S., Hitotsumatsu, O., et al. (2004). The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat. Immunol.* *5*, 1052–1060.
- Borel, S., Robert-Hebmann, V., Alfaisal, J., Jain, A., Faure, M., Espert, L., Chaloin, L., Paillart, J.-C., Johansen, T., and Biard-Piechaczyk, M. (2015). HIV-1 viral infectivity factor interacts with microtubule-associated protein light chain 3 and inhibits autophagy. *AIDS Lond. Engl.* *29*, 275–286.
- Boström, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., Lidberg, U., Johansson, B.R., Fernandez-Rodriguez, J., Ericson, J., Nilsson, T., Borén, J., et al. (2007). SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1286–1293.
- Bourhis, J.-M., Canard, B., and Longhi, S. (2006). Structural disorder within the replicative complex of measles virus: functional implications. *Virology* *344*, 94–110.
- Brest, P., Lapaquette, P., Souidi, M., Lebrigand, K., Cesaro, A., Vouret-Craviari, V., Mari, B., Barbry, P., Mosnier, J.-F., Hébuterne, X., et al. (2011). A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat. Genet.* *43*, 242–245.
- Brindley, M.A., Suter, R., Schestak, I., Kiss, G., Wright, E.R., and Plemper, R.K. (2013). A stabilized headless measles virus attachment protein stalk efficiently triggers membrane fusion. *J. Virol.* *87*, 11693–11703.
- Broberg, E.K., Peltoniemi, J., Nygårdas, M., Vahlberg, T., Røyttä, M., and Hukkanen, V. (2004). Spread and replication of and immune response to gamma134.5-negative herpes simplex virus type 1 vectors in BALB/c mice. *J. Virol.* *78*, 13139–13152.
- Brunel, J., Chopy, D., Dosnon, M., Bloyet, L.-M., Devaux, P., Urzua, E., Cattaneo, R., Longhi, S., and Gerlier, D. (2014). Sequence of events in measles virus replication: role of phosphoprotein-nucleocapsid interactions. *J. Virol.* *88*, 10851–10863.
- Cadwell, K., Patel, K.K., Komatsu, M., Virgin, H.W., and Stappenbeck, T.S. (2009). A common role for Atg16L1, Atg5 and Atg7 in small intestinal Paneth cells and Crohn disease. *Autophagy* *5*, 250–252.
- Campbell, G.R., Rawat, P., Bruckman, R.S., and Spector, S.A. (2015). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Inhibits Autophagy through Transcription Factor EB Sequestration. *PLoS Pathog.* *11*, e1005018.
- Cardone, J., Le Friec, G., Vantourout, P., Roberts, A., Fuchs, A., Jackson, I., Suddason, T., Lord, G., Atkinson, J.P., Cope, A., et al. (2010). Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells. *Nat. Immunol.* *11*, 862–871.
- Carsillo, T., Huey, D., Levinsky, A., Obojes, K., Schneider-Schaulies, J., and Niewiesk, S. (2014). Cotton rat (*Sigmodon hispidus*) signaling lymphocyte activation molecule (CD150) is an entry receptor for measles virus. *PLoS One* *9*, e110120.
- Caseris, M., Burdet, C., Lepeule, R., Houhou, N., Yeni, P., Yazdanpanah, Y., and Joly, V. (2015). [An update on measles]. *Rev. Médecine Interne Fondée Par Société Natl. Française Médecine Interne* *36*, 339–345.

- Cathomen, T., Mrkic, B., Spehner, D., Drillien, R., Naef, R., Pavlovic, J., Aguzzi, A., Billeter, M.A., and Cattaneo, R. (1998). A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *EMBO J.* *17*, 3899–3908.
- Cattaneo, R. (2004). Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet. *J. Virol.* *78*, 4385–4388.
- Cattaneo, R., Rebmann, G., Schmid, A., Baczko, K., ter Meulen, V., and Billeter, M.A. (1987). Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain. *EMBO J.* *6*, 681–688.
- Cattaneo, R., Kaelin, K., Baczko, K., and Billeter, M.A. (1989). Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* *56*, 759–764.
- Ceregido, M.A., Spínola Amilibia, M., Buts, L., Rivera-Torres, J., Garcia-Pino, A., Bravo, J., and van Nuland, N.A.J. (2014). The structure of TAX1BP1 UBZ1+2 provides insight into target specificity and adaptability. *J. Mol. Biol.* *426*, 674–690.
- Chang, A., and Dutch, R.E. (2012). Paramyxovirus Fusion and Entry: Multiple Paths to a Common End. *Viruses* *4*, 613–636.
- Chauhan, S., Mandell, M.A., and Deretic, V. (2015). IRGM governs the core autophagy machinery to conduct antimicrobial defense. *Mol. Cell* *58*, 507–521.
- Chaumorcel, M., Lussignol, M., Mouna, L., Cavignac, Y., Fahie, K., Cotte-Laffitte, J., Geballe, A., Brune, W., Beau, I., Codogno, P., et al. (2012). The human cytomegalovirus protein TRS1 inhibits autophagy via its interaction with Beclin 1. *J. Virol.* *86*, 2571–2584.
- Chen, D., Fan, W., Lu, Y., Ding, X., Chen, S., and Zhong, Q. (2012). A mammalian autophagosome maturation mechanism mediated by TECPR1 and the Atg12-Atg5 conjugate. *Mol. Cell* *45*, 629–641.
- Chen, M., Hong, M.J., Sun, H., Wang, L., Shi, X., Gilbert, B.E., Corry, D.B., Kheradmand, F., and Wang, J. (2014). Essential role for autophagy in the maintenance of immunological memory against influenza infection. *Nat. Med.* *20*, 503–510.
- Chen, R.T., Goldbaum, G.M., Wassilak, S.G.F., Markowitz, L.E., and Orenstein, W.A. (1989). An Explosive Point-Source Measles Outbreak in a Highly Vaccinated Population Modes of Transmission and Risk Factors for Disease. *Am. J. Epidemiol.* *129*, 173–182.
- Chi, P.I., Huang, W.R., Lai, I.H., Cheng, C.Y., and Liu, H.J. (2013). The p17 nonstructural protein of avian reovirus triggers autophagy enhancing virus replication via activation of phosphatase and tensin deleted on chromosome 10 (PTEN) and AMP-activated protein kinase (AMPK), as well as dsRNA-dependent protein kinase (PKR)/eIF2 α signaling pathways. *J. Biol. Chem.* *288*, 3571–3584.
- Chiang, H.L., Terlecky, S.R., Plant, C.P., and Dice, J.F. (1989). A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* *246*, 382–385.
- Childs, K., Stock, N., Ross, C., Andrejeva, J., Hilton, L., Skinner, M., Randall, R., and Goodbourn, S. (2007). mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins. *Virology* *359*, 190–200.
- Childs, K., Randall, R., and Goodbourn, S. (2012). Paramyxovirus V proteins interact with the RNA Helicase LGP2 to inhibit RIG-I-dependent interferon induction. *J. Virol.* *86*, 3411–3421.

- Cho, M.-C., Lee, K., Paik, S.-G., and Yoon, D.-Y. (2008). Peroxisome Proliferators-Activated Receptor (PPAR) Modulators and Metabolic Disorders. *PPAR Res.* 2008, 679137.
- Choy, A., Dancourt, J., Mugo, B., O'Connor, T.J., Isberg, R.R., Melia, T.J., and Roy, C.R. (2012). The Legionella effector RavZ inhibits host autophagy through irreversible Atg8 deconjugation. *Science* 338, 1072–1076.
- Clausen, T.H., Lamark, T., Isakson, P., Finley, K., Larsen, K.B., Brech, A., Øvervatn, A., Stenmark, H., Bjørkøy, G., Simonsen, A., et al. (2010). p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy* 6, 330–344.
- Cocks, B.G., Chang, C.C., Carballido, J.M., Yssel, H., de Vries, J.E., and Aversa, G. (1995). A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 376, 260–263.
- Colf, L.A., Juo, Z.S., and Garcia, K.C. (2007). Structure of the measles virus hemagglutinin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1227–1228.
- Coovadia, H.M., Wesley, A., Henderson, L.G., Brain, P., Vos, G.H., and Hallett, A.F. (1978). Alterations in immune responsiveness in acute measles and chronic post-measles chest disease. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 56, 14–23.
- Copetti, T., Bertoli, C., Dalla, E., Demarchi, F., and Schneider, C. (2009). p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2594–2608.
- Couturier, M., Buccellato, M., Costanzo, S., Bourhis, J.-M., Shu, Y., Nicaise, M., Desmadril, M., Flaudrops, C., Longhi, S., and Oglesbee, M. (2010). High affinity binding between Hsp70 and the C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein requires an Hsp40 co-chaperone. *J. Mol. Recognit. JMR* 23, 301–315.
- Criollo, A., Niso-Santano, M., Malik, S.A., Michaud, M., Morselli, E., Mariño, G., Lachkar, S., Arkhipenko, A.V., Harper, F., Pierron, G., et al. (2011). Inhibition of autophagy by TAB2 and TAB3. *EMBO J.* 30, 4908–4920.
- Criollo, A., Chereau, F., Malik, S.A., Niso-Santano, M., Mariño, G., Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Baud, V., and Kroemer, G. (2012). Autophagy is required for the activation of NFκB. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 194–199.
- Cruz, C.D., Palosaari, H., Parisien, J.-P., Devaux, P., Cattaneo, R., Ouchi, T., and Horvath, C.M. (2006). Measles Virus V Protein Inhibits p53 Family Member p73. *J. Virol.* 80, 5644–5650.
- Cuervo, A.M., and Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* 24, 92–104.
- Curran, J. (1996). Reexamination of the Sendai virus P protein domains required for RNA synthesis: a possible supplemental role for the P protein. *Virology* 221, 130–140.
- Curran, J., Pelet, T., and Kolakofsky, D. (1994). An acidic activation-like domain of the Sendai virus P protein is required for RNA synthesis and encapsidation. *Virology* 202, 875–884.
- Curran, J., Marq, J.B., and Kolakofsky, D. (1995). An N-terminal domain of the Sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. *J. Virol.* 69, 849–855.

- Czaja, M.J., and Cuervo, A.M. (2009). Lipases in lysosomes, what for? *Autophagy* 5, 866–867.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., and Colombel, J.F. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115, 1405–1413.
- Davis, M.E., Wang, M.K., Rennick, L.J., Full, F., Gableske, S., Mesman, A.W., Gringhuis, S.I., Geijtenbeek, T.B.H., Duprex, W.P., and Gack, M.U. (2014). Antagonism of the phosphatase PP1 by the measles virus V protein is required for innate immune escape of MDA5. *Cell Host Microbe* 16, 19–30.
- Dawson, J.R. (1933). Cellular Inclusions in Cerebral Lesions of Lethargic Encephalitis. *Am. J. Pathol.* 9, 7–16.3.
- De Duve, C. (1963). The lysosome. *Sci. Am.* 208, 64–72.
- Delgado, M.A., Elmaoued, R.A., Davis, A.S., Kyei, G., and Deretic, V. (2008). Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J.* 27, 1110–1121.
- Delpeut, S., Rudd, P.A., Labonté, P., and von Messling, V. (2012). Membrane fusion-mediated autophagy induction enhances morbillivirus cell-to-cell spread. *J. Virol.* 86, 8527–8535.
- Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Müller, M., Kreymborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., et al. (2005). Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7922–7927.
- Denizot, M., Varbanov, M., Espert, L., Robert-Hebmann, V., Sagnier, S., Garcia, E., Curriu, M., Mamoun, R., Blanco, J., and Biard-Piechaczyk, M. (2008). HIV-1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells. *Autophagy* 4, 998–1008.
- Deosaran, E., Larsen, K.B., Hua, R., Sargent, G., Wang, Y., Kim, S., Lamark, T., Jauregui, M., Law, K., Lippincott-Schwartz, J., et al. (2013). NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes. *J. Cell Sci.* 126, 939–952.
- Desai, M.M., Gong, B., Chan, T., Davey, R.A., Soong, L., Kolokoltsov, A.A., and Sun, J. (2011). Differential, type I interferon-mediated autophagic trafficking of hepatitis C virus proteins in mouse liver. *Gastroenterology* 141, 674–685, 685.e1–e6.
- De Valck, D., Jin, D.Y., Heyninck, K., Van de Craen, M., Contreras, R., Fiers, W., Jeang, K.T., and Beyaert, R. (1999). The zinc finger protein A20 interacts with a novel anti-apoptotic protein which is cleaved by specific caspases. *Oncogene* 18, 4182–4190.
- Devaux, P., Hodge, G., McChesney, M.B., and Cattaneo, R. (2008). Attenuation of V- or C-defective measles viruses: infection control by the inflammatory and interferon responses of rhesus monkeys. *J. Virol.* 82, 5359–5367.
- Devaux, P., Priniski, L., and Cattaneo, R. (2013). The measles virus phosphoprotein interacts with the linker domain of STAT1. *Virology* 444, 250–256.
- Diao, J., Liu, R., Rong, Y., Zhao, M., Zhang, J., Lai, Y., Zhou, Q., Wilz, L.M., Li, J., Vivona, S., et al. (2015). ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature advance online publication*.

- Di Bartolomeo, S., Corazzari, M., Nazio, F., Oliverio, S., Lisi, G., Antonioli, M., Pagliarini, V., Matteoni, S., Fuoco, C., Giunta, L., et al. (2010). The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J. Cell Biol.* *191*, 155–168.
- Dice, J.F. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* *15*, 305–309.
- Dice, J.F., Walker, C.D., Byrne, B., and Cardiel, A. (1978). General characteristics of protein degradation in diabetes and starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *75*, 2093–2097.
- Dietzel, E., Kolesnikova, L., and Maisner, A. (2013). Actin filaments disruption and stabilization affect measles virus maturation by different mechanisms. *Virology* *10*, 249.
- Ding, W.-X., Li, M., Chen, X., Ni, H.-M., Lin, C.-W., Gao, W., Lu, B., Stolz, D.B., Clemens, D.L., and Yin, X.-M. (2010). Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice. *Gastroenterology* *139*, 1740–1752.
- Djavaheri-Mergny, M., Amelotti, M., Mathieu, J., Besançon, F., Bauvy, C., Souquère, S., Pierron, G., and Codogno, P. (2006). NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J. Biol. Chem.* *281*, 30373–30382.
- Dong, N., Zhu, Y., Lu, Q., Hu, L., Zheng, Y., and Shao, F. (2012). Structurally distinct bacterial TBC-like GAPs link Arf GTPase to Rab1 inactivation to counteract host defenses. *Cell* *150*, 1029–1041.
- Dooley, H.C., Razi, M., Polson, H.E.J., Girardin, S.E., Wilson, M.I., and Tooze, S.A. (2014). WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol. Cell* *55*, 238–252.
- Dorn, B.R., Dunn, W.A., and Progulski-Fox, A. (2001). Porphyromonas gingivalis traffics to autophagosomes in human coronary artery endothelial cells. *Infect. Immun.* *69*, 5698–5708.
- Dortet, L., Mostowy, S., Samba-Louaka, A., Louaka, A.S., Gouin, E., Nahori, M.-A., Wiemer, E.A.C., Dussurget, O., and Cossart, P. (2011). Recruitment of the major vault protein by InlK: a Listeria monocytogenes strategy to avoid autophagy. *PLoS Pathog.* *7*, e1002168.
- Dowdle, W.E., Nyfeler, B., Nagel, J., Elling, R.A., Liu, S., Triantafellow, E., Menon, S., Wang, Z., Honda, A., Pardee, G., et al. (2014). Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis in vivo. *Nat. Cell Biol.* *16*, 1069–1079.
- Duke, T., and Mgone, C.S. (2003). Measles: not just another viral exanthem. *Lancet Lond. Engl.* *361*, 763–773.
- Dupont, N., Jiang, S., Pilli, M., Ornatowski, W., Bhattacharya, D., and Deretic, V. (2011). Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *EMBO J.* *30*, 4701–4711.
- Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., et al. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* *331*, 456–461.
- Egelman, E.H., Wu, S.S., Amrein, M., Portner, A., and Murti, G. (1989). The Sendai virus nucleocapsid exists in at least four different helical states. *J. Virol.* *63*, 2233–2243.

- Ellinghaus, D., Zhang, H., Zeissig, S., Lipinski, S., Till, A., Jiang, T., Stade, B., Bromberg, Y., Ellinghaus, E., Keller, A., et al. (2013). Association between variants of PRDM1 and NDP52 and Crohn's disease, based on exome sequencing and functional studies. *Gastroenterology* *145*, 339–347.
- Elmore, S.P., Qian, T., Grissom, S.F., and Lemasters, J.J. (2001). The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *15*, 2286–2287.
- Enders, J.F., and Peebles, T.C. (1954). Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* *86*, 277–286.
- Engel, P., Eck, M.J., and Terhorst, C. (2003). The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 813–821.
- Escoffier, C., Manié, S., Vincent, S., Muller, C.P., Billeter, M., and Gerlier, D. (1999). Nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells. *J. Virol.* *73*, 1695–1698.
- Espert, L., Denizot, M., Grimaldi, M., Robert-Hebmann, V., Gay, B., Varbanov, M., Codogno, P., and Biard-Piechaczyk, M. (2006). Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J. Clin. Invest.* *116*, 2161–2172.
- Fader, C.M., Sánchez, D., Furlán, M., and Colombo, M.I. (2008). Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic Cph. Den.* *9*, 230–250.
- Faure, M., and Lafont, F. (2013). Pathogen-induced autophagy signaling in innate immunity. *J. Innate Immun.* *5*, 456–470.
- Filimonenko, M., Isakson, P., Finley, K.D., Anderson, M., Jeong, H., Melia, T.J., Bartlett, B.J., Myers, K.M., Birkeland, H.C.G., Lamark, T., et al. (2010). The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alfy. *Mol. Cell* *38*, 265–279.
- Fliiss, P.M., Jowers, T.P., Brinkmann, M.M., Holstermann, B., Mack, C., Dickinson, P., Hohenberg, H., Ghazal, P., and Brune, W. (2012). Viral mediated redirection of NEMO/IKK γ to autophagosomes curtails the inflammatory cascade. *PLoS Pathog.* *8*, e1002517.
- Fu, M., Nirschl, J.J., and Holzbaur, E.L.F. (2014). LC3 binding to the scaffolding protein JIP1 regulates processive dynein-driven transport of autophagosomes. *Dev. Cell* *29*, 577–590.
- Fuchs, A., Atkinson, J.P., Fremeaux-Bacchi, V., and Kemper, C. (2009). CD46-induced human Treg enhance B-cell responses. *Eur. J. Immunol.* *39*, 3097–3109.
- Fugier-Vivier, I., Servet-Delprat, C., Rivaller, P., Risoan, M.C., Liu, Y.J., and Roubourdin-Combe, C. (1997). Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J. Exp. Med.* *186*, 813–823.
- Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2092–2100.
- Fung, T.S., and Liu, D.X. (2014). Coronavirus infection, ER stress, apoptosis and innate immunity. *Front. Microbiol.* *5*, 296.

- Furuta, N., Fujita, N., Noda, T., Yoshimori, T., and Amano, A. (2010). Combinational soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vti1b mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes. *Mol. Biol. Cell* *21*, 1001–1010.
- Gachon, F., Peleraux, A., Thebault, S., Dick, J., Lemasson, I., Devaux, C., and Mesnard, J.M. (1998). CREB-2, a cellular CRE-dependent transcription repressor, functions in association with Tax as an activator of the human T-cell leukemia virus type 1 promoter. *J. Virol.* *72*, 8332–8337.
- Gaggar, A., Shayakhmetov, D.M., and Lieber, A. (2003). CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat. Med.* *9*, 1408–1412.
- Ganley, I.G. (2013). Autophagosome maturation and lysosomal fusion. *Essays Biochem.* *55*, 65–78.
- Gannagé, M., Dormann, D., Albrecht, R., Dengjel, J., Torossi, T., Rämer, P.C., Lee, M., Strowig, T., Arrey, F., Conenello, G., et al. (2009). Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe* *6*, 367–380.
- Ge, L., Melville, D., Zhang, M., and Schekman, R. (2013). The ER-Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *eLife* *2*, e00947.
- Geraghty, R.J., Krummenacher, C., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., and Spear, P.G. (1998). Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* *280*, 1618–1620.
- Gerlier, D., Trescol-Biémont, M.C., Varior-Krishnan, G., Nanche, D., Fugier-Vivier, I., and Rabourdin-Combe, C. (1994a). Efficient major histocompatibility complex class II-restricted presentation of measles virus relies on hemagglutinin-mediated targeting to its cellular receptor human CD46 expressed by murine B cells. *J. Exp. Med.* *179*, 353–358.
- Gerlier, D., Trescol-Biémont, M.C., Varior-Krishnan, G., Nanche, D., Fugier-Vivier, I., and Rabourdin-Combe, C. (1994b). Efficient MHC class II-restricted presentation of measles virus to T cells relies on its targeting to its cellular receptor human CD46 and involves an endosomal pathway. *Cell Biol. Int.* *18*, 315–320.
- Graef, M., Friedman, J.R., Graham, C., Babu, M., and Nunnari, J. (2013). ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *Mol. Biol. Cell* *24*, 2918–2931.
- Grégoire, I.P., Richetta, C., Meyniel-Schicklin, L., Borel, S., Pradezynski, F., Diaz, O., Deloire, A., Azocar, O., Baguet, J., Le Breton, M., et al. (2011). IRGM is a common target of RNA viruses that subvert the autophagy network. *PLoS Pathog.* *7*, e1002422.
- Griffin, D.E. (1991). Immunologic abnormalities accompanying acute and chronic viral infections. *Rev. Infect. Dis.* *13 Suppl 1*, S129–S133.
- Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Tollefsen, B.L., Kemper, C., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* *104*, 2840–2848.
- Gutierrez, J., Issacson, R.S., and Koppel, B.S. (2010). Subacute sclerosing panencephalitis: an update. *Dev. Med. Child Neurol.* *52*, 901–907.

- Gutierrez, M.G., Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I., and Deretic, V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 119, 753–766.
- Gutierrez, M.G., Vázquez, C.L., Munafó, D.B., Zoppino, F.C.M., Berón, W., Rabinovitch, M., and Colombo, M.I. (2005). Autophagy induction favours the generation and maturation of the Coxiella-replicative vacuoles. *Cell. Microbiol.* 7, 981–993.
- Gutsche, I., Desfosses, A., Effantin, G., Ling, W.L., Haupt, M., Ruigrok, R.W.H., Sachse, C., and Schoehn, G. (2015). Structural virology. Near-atomic cryo-EM structure of the helical measles virus nucleocapsid. *Science* 348, 704–707.
- Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K., and Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141, 656–667.
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., et al. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 495, 389–393.
- Hanna, R.A., Quinsay, M.N., Orogo, A.M., Giang, K., Rikka, S., and Gustafsson, Å.B. (2012). Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *J. Biol. Chem.* 287, 19094–19104.
- Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S., Natsume, T., Guan, J.-L., and Mizushima, N. (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 181, 497–510.
- Harris, J. (2011). Autophagy and cytokines. *Cytokine* 56, 140–144.
- Harris, J., Hartman, M., Roche, C., Zeng, S.G., O’Shea, A., Sharp, F.A., Lambe, E.M., Creagh, E.M., Golenbock, D.T., Tschopp, J., et al. (2011). Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *J. Biol. Chem.* 286, 9587–9597.
- Harrison, M.S., Sakaguchi, T., and Schmitt, A.P. (2010). Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1416–1429.
- Hashiguchi, T., Maenaka, K., and Yanagi, Y. (2011a). Measles virus hemagglutinin: structural insights into cell entry and measles vaccine. *Front. Microbiol.* 2, 247.
- Hashiguchi, T., Ose, T., Kubota, M., Maita, N., Kamishikiryo, J., Maenaka, K., and Yanagi, Y. (2011b). Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 135–141.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.* 11, 1433–1437.
- Hayden, M.S., West, A.P., and Ghosh, S. (2006). NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25, 6758–6780.
- He, C., and Levine, B. (2010). The Beclin 1 interactome. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 140–149.

Heaton, N.S., and Randall, G. (2010). Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe* 8, 422–432.

Henault, J., Martinez, J., Riggs, J.M., Tian, J., Mehta, P., Clarke, L., Sasai, M., Latz, E., Brinkmann, M.M., Iwasaki, A., et al. (2012). Noncanonical autophagy is required for type I interferon secretion in response to DNA-immune complexes. *Immunity* 37, 986–997.

Henning, G., Kraft, M.S., Derfuss, T., Pirzer, R., de Saint-Basile, G., Aversa, G., Fleckenstein, B., and Meini, E. (2001). Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) regulates T cellular cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 31, 2741–2750.

Hinz, M., and Scheidereit, C. (2014). The I κ B kinase complex in NF- κ B regulation and beyond. *EMBO Rep.* 15, 46–61.

Homer, C.R., Richmond, A.L., Rebert, N.A., Achkar, J.-P., and McDonald, C. (2010). ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology* 139, 1630–1641, 1641.e1–e2.

Honda, S., Arakawa, S., Nishida, Y., Yamaguchi, H., Ishii, E., and Shimizu, S. (2014). Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes. *Nat. Commun.* 5, 4004.

Horenkamp, F.A., Kauffman, K.J., Kohler, L.J., Sherwood, R.K., Krueger, K.P., Shteyn, V., Roy, C.R., Melia, T.J., and Reinisch, K.M. (2015). The Legionella Anti-autophagy Effector RavZ Targets the Autophagosome via PI3P- and Curvature-Sensing Motifs. *Dev. Cell* 34, 569–576.

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* 20, 1981–1991.

Huang, J., and Brumell, J.H. (2014). Bacteria-autophagy interplay: a battle for survival. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 101–114.

Huang, H., Kang, R., Wang, J., Luo, G., Yang, W., and Zhao, Z. (2013). Hepatitis C virus inhibits AKT-tuberous sclerosis complex (TSC), the mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway, through endoplasmic reticulum stress to induce autophagy. *Autophagy* 9, 175–195.

Huang, Y.-H., Tsai, K., Ma, C., Vallance, B.A., Priatel, J.J., and Tan, R. (2014). SLAM-SAP signaling promotes differentiation of IL-17-producing T cells and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 5841–5853.

Huynh, K.K., Eskelinen, E.-L., Scott, C.C., Malevanets, A., Saftig, P., and Grinstein, S. (2007). LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J.* 26, 313–324.

Hwang, S., Maloney, N.S., Bruinsma, M.W., Goel, G., Duan, E., Zhang, L., Shrestha, B., Diamond, M.S., Dani, A., Sosnovtsev, S.V., et al. (2012). Nondegradative role of Atg5-Atg12/ Atg16L1 autophagy protein complex in antiviral activity of interferon gamma. *Cell Host Microbe* 11, 397–409.

Hyttinen, J.M.T., Amadio, M., Viiri, J., Pascale, A., Salminen, A., and Kaarniranta, K. (2014). Clearance of misfolded and aggregated proteins by aggrephagy and implications for aggregation diseases. *Ageing Res. Rev.* 18, 16–28.

Iha, H., Peloponese, J.-M., Verstrepen, L., Zapart, G., Ikeda, F., Smith, C.D., Starost, M.F., Yedavalli, V., Heyninck, K., Dikic, I., et al. (2008). Inflammatory cardiac valvulitis in TAX1BP1-deficient mice through selective NF-kappaB activation. *EMBO J.* *27*, 629–641.

Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* *115*, 577–590.

Inomata, M., Niida, S., Shibata, K., and Into, T. (2012). Regulation of Toll-like receptor signaling by NDP52-mediated selective autophagy is normally inactivated by A20. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *69*, 963–979.

Irie, T., Kiyotani, K., Igarashi, T., Yoshida, A., and Sakaguchi, T. (2012). Inhibition of interferon regulatory factor 3 activation by paramyxovirus V protein. *J. Virol.* *86*, 7136–7145.

Isomäki, P., Aversa, G., Cocks, B.G., Luukkainen, R., Saario, R., Toivanen, P., de Vries, J.E., and Punnonen, J. (1997). Increased expression of signaling lymphocytic activation molecule in patients with rheumatoid arthritis and its role in the regulation of cytokine production in rheumatoid synovium. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *159*, 2986–2993.

Itakura, E., and Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* *6*, 764–776.

Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., and Mizushima, N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol. Biol. Cell* *19*, 5360–5372.

Itakura, E., Kishi-Itakura, C., Koyama-Honda, I., and Mizushima, N. (2012a). Structures containing Atg9A and the ULK1 complex independently target depolarized mitochondria at initial stages of Parkin-mediated mitophagy. *J. Cell Sci.* *125*, 1488–1499.

Itakura, E., Kishi-Itakura, C., and Mizushima, N. (2012b). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* *151*, 1256–1269.

Iwasaki, M., Takeda, M., Shirogane, Y., Nakatsu, Y., Nakamura, T., and Yanagi, Y. (2009). The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein. *J. Virol.* *83*, 10374–10383.

Jackson, W.T., Giddings, T.H., Taylor, M.P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R.R., and Kirkegaard, K. (2005). Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* *3*, e156.

Jäger, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., and Eskelinen, E.-L. (2004). Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J. Cell Sci.* *117*, 4837–4848.

Jardetzky, T.S., and Lamb, R.A. (2014). Activation of paramyxovirus membrane fusion and virus entry. *Curr. Opin. Virol.* *5*, 24–33.

Jiang, S., Wells, C.D., and Roach, P.J. (2011). Starch-binding domain-containing protein 1 (Stbd1) and glycogen metabolism: Identification of the Atg8 family interacting motif (AIM) in Stbd1 required for interaction with GABARAP1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *413*, 420–425.

Jin, R., Zhu, W., Cao, S., Chen, R., Jin, H., Liu, Y., Wang, S., Wang, W., and Xiao, G. (2013). Japanese encephalitis virus activates autophagy as a viral immune evasion strategy. *PLoS One* *8*, e52909.

- Johansen, T., and Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 7, 279–296.
- Johansson, K., Bourhis, J.-M., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B., and Longhi, S. (2003). Crystal structure of the measles virus phosphoprotein domain responsible for the induced folding of the C-terminal domain of the nucleoprotein. *J. Biol. Chem.* 278, 44567–44573.
- Johnson, R.T., Griffin, D.E., Hirsch, R.L., Wolinsky, J.S., Roedenbeck, S., Lindo de Soriano, I., and Vaisberg, A. (1984). Measles encephalomyelitis—clinical and immunologic studies. *N. Engl. J. Med.* 310, 137–141.
- Johnstone, R.W., Russell, S.M., Loveland, B.E., and McKenzie, I.F. (1993). Polymorphic expression of CD46 protein isoforms due to tissue-specific RNA splicing. *Mol. Immunol.* 30, 1231–1241.
- Joubert, P.-E., Meiffren, G., Grégoire, I.P., Pontini, G., Richetta, C., Flacher, M., Azocar, O., Vidalain, P.-O., Vidal, M., Lotteau, V., et al. (2009). Autophagy induction by the pathogen receptor CD46. *Cell Host Microbe* 6, 354–366.
- Joubert, P.-E., Werneke, S.W., de la Calle, C., Guivel-Benhassine, F., Giodini, A., Peduto, L., Levine, B., Schwartz, O., Lenschow, D.J., and Albert, M.L. (2012). Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. *J. Exp. Med.* 209, 1029–1047.
- Jounai, N., Takeshita, F., Kobiyama, K., Sawano, A., Miyawaki, A., Xin, K.-Q., Ishii, K.J., Kawai, T., Akira, S., Suzuki, K., et al. (2007). The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14050–14055.
- Jounai, N., Kobiyama, K., Shiina, M., Ogata, K., Ishii, K.J., and Takeshita, F. (2011). NLRP4 Negatively Regulates Autophagic Processes through an Association with Beclin1. *J. Immunol.* 186, 1646–1655.
- Judith, D., Mostowy, S., Bourai, M., Gangneux, N., Lelek, M., Lucas-Hourani, M., Cayet, N., Jacob, Y., Prévost, M.-C., Pierre, P., et al. (2013). Species-specific impact of the autophagy machinery on Chikungunya virus infection. *EMBO Rep.* 14, 534–544.
- Kachaner, D., Génin, P., Laplantine, E., and Weil, R. (2012). Toward an integrative view of Optineurin functions. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 2808–2818.
- Kalvari, I., Tsompanis, S., Mulakkal, N.C., Osgood, R., Johansen, T., Nezis, I.P., and Promponas, V.J. (2014). iLIR: A web resource for prediction of Atg8-family interacting proteins. *Autophagy* 10, 913–925.
- Kanayama, M., Inoue, M., Danzaki, K., Hammer, G., He, Y.-W., and Shinohara, M.L. (2015). Autophagy enhances NFκB activity in specific tissue macrophages by sequestering A20 to boost antifungal immunity. *Nat. Commun.* 6, 5779.
- Kario, E., Amar, N., Elazar, Z., and Navon, A. (2011). A new autophagy-related checkpoint in the degradation of an ERAD-M target. *J. Biol. Chem.* 286, 11479–11491.
- Karlin, D., Longhi, S., Receveur, V., and Canard, B. (2002). The N-terminal domain of the phosphoprotein of Morbilliviruses belongs to the natively unfolded class of proteins. *Virology* 296, 251–262.
- Kaufmann, A., Beier, V., Franquelim, H.G., and Wollert, T. (2014). Molecular mechanism of autophagic membrane-scaffold assembly and disassembly. *Cell* 156, 469–481.

- Kaur, J., and Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 461–472.
- Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2012). Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* *22*, 407–417.
- Kawai, T., and Akira, S. (2011). Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins. *EMBO Mol. Med.* *3*, 513–527.
- Ke, P.-Y., and Chen, S.S.-L. (2011). Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J. Clin. Invest.* *121*, 37–56.
- Kemper, C., Chan, A.C., Green, J.M., Brett, K.A., Murphy, K.M., and Atkinson, J.P. (2003). Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* *421*, 388–392.
- Khaminets, A., Heinrich, T., Mari, M., Grumati, P., Huebner, A.K., Akutsu, M., Liebmann, L., Stolz, A., Nietzsche, S., Koch, N., et al. (2015). Regulation of endoplasmic reticulum turnover by selective autophagy. *Nature* *522*, 354–358.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* *13*, 132–141.
- Kim, J., Kim, Y.C., Fang, C., Russell, R.C., Kim, J.H., Fan, W., Liu, R., Zhong, Q., and Guan, K.-L. (2013). Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell* *152*, 290–303.
- Kim, J.H., Hong, S.B., Lee, J.K., Han, S., Roh, K.-H., Lee, K.-E., Kim, Y.K., Choi, E.-J., and Song, H.K. (2015a). Insights into autophagosome maturation revealed by the structures of ATG5 with its interacting partners. *Autophagy* *11*, 75–87.
- Kim, P.K., Hailey, D.W., Mullen, R.T., and Lippincott-Schwartz, J. (2008). Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 20567–20574.
- Kim, Y.-M., Jung, C.H., Seo, M., Kim, E.K., Park, J.-M., Bae, S.S., and Kim, D.-H. (2015b). mTORC1 phosphorylates UVRAG to negatively regulate autophagosome and endosome maturation. *Mol. Cell* *57*, 207–218.
- Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct. Funct.* *33*, 109–122.
- Kimura, T., Jain, A., Choi, S.W., Mandell, M.A., Schroder, K., Johansen, T., and Deretic, V. (2015). TRIM-mediated precision autophagy targets cytoplasmic regulators of innate immunity. *J. Cell Biol.*
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.* *151*, 263–276.
- Kirkin, V., Lamark, T., Sou, Y.-S., Bjørkøy, G., Nunn, J.L., Bruun, J.-A., Shvets, E., McEwan, D.G., Clausen, T.H., Wild, P., et al. (2009). A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol. Cell* *33*, 505–516.

- Kishi-Itakura, C., Koyama-Honda, I., Itakura, E., and Mizushima, N. (2014). Ultrastructural analysis of autophagosome organization using mammalian autophagy-deficient cells. *J. Cell Sci.* *127*, 4089–4102.
- Kissova, I., Salin, B., Schaeffer, J., Bhatia, S., Manon, S., and Camougrand, N. (2007). Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy* *3*, 329–336.
- Klinkenberg, M., Van Huffel, S., Heyninck, K., and Beyaert, R. (2001). Functional redundancy of the zinc fingers of A20 for inhibition of NF-kappaB activation and protein-protein interactions. *FEBS Lett.* *498*, 93–97.
- Klionsky, D.J., and Schulman, B.A. (2014). Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *21*, 336–345.
- Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., et al. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* *8*, 445–544.
- Komune, N., Ichinohe, T., Ito, M., and Yanagi, Y. (2011). Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1 β secretion. *J. Virol.* *85*, 13019–13026.
- Kondomerkos, D.J., Kalamidas, S.A., Kotoulas, O.B., and Hann, A.C. (2005). Glycogen autophagy in the liver and heart of newborn rats. The effects of glucagon, adrenalin or rapamycin. *Histol. Histopathol.* *20*, 689–696.
- Korac, J., Schaeffer, V., Kovacevic, I., Clement, A.M., Jungblut, B., Behl, C., Terzic, J., and Dikic, I. (2013). Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates. *J. Cell Sci.* *126*, 580–592.
- Korolchuk, V.I., Saiki, S., Lichtenberg, M., Siddiqi, F.H., Roberts, E.A., Imarisio, S., Jahreiss, L., Sarkar, S., Futter, M., Menzies, F.M., et al. (2011). Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat. Cell Biol.* *13*, 453–460.
- Koyama-Honda, I., Itakura, E., Fujiwara, T.K., and Mizushima, N. (2013). Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy* *9*, 1491–1499.
- Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., and Peter, M. (2008). Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat. Cell Biol.* *10*, 602–610.
- Kranzusch, P.J., and Whelan, S.P.J. (2012). Architecture and regulation of negative-strand viral enzymatic machinery. *RNA Biol.* *9*, 941–948.
- Krumm, S.A., Takeda, M., and Plemper, R.K. (2013). The measles virus nucleocapsid protein tail domain is dispensable for viral polymerase recruitment and activity. *J. Biol. Chem.* *288*, 29943–29953.
- Kuballa, P., Nolte, W.M., Castoreno, A.B., and Xavier, R.J. (2012). Autophagy and the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 611–646.
- Kundu, M., Lindsten, T., Yang, C.-Y., Wu, J., Zhao, F., Zhang, J., Selak, M.A., Ney, P.A., and Thompson, C.B. (2008). Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood* *112*, 1493–1502.

Kyei, G.B., Dinkins, C., Davis, A.S., Roberts, E., Singh, S.B., Dong, C., Wu, L., Kominami, E., Ueno, T., Yamamoto, A., et al. (2009). Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J. Cell Biol.* *186*, 255–268.

Laine, D., Trescol-Biémont, M.-C., Longhi, S., Libeau, G., Marie, J.C., Vidalain, P.-O., Azocar, O., Diallo, A., Canard, B., Rabourdin-Combe, C., et al. (2003). Measles virus (MV) nucleoprotein binds to a novel cell surface receptor distinct from FcγRII via its C-terminal domain: role in MV-induced immunosuppression. *J. Virol.* *77*, 11332–11346.

Laine, D., Bourhis, J.M., Longhi, S., Flacher, M., Cassard, L., Canard, B., Sautès-Fridman, C., Rabourdin-Combe, C., and Valentin, H. (2005). Measles virus nucleoprotein induces cell-proliferation arrest and apoptosis through NTAIL-NR and NCORE-FcγRIIB1 interactions, respectively. *J. Gen. Virol.* *86*, 1771–1784.

Lamb, R.A., and Jardetzky, T.S. (2007). Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *17*, 427–436.

Lamb, C.A., Yoshimori, T., and Tooze, S.A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 759–774.

Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* *157*, 1013–1022.

Lapaquette, P., Glasser, A.-L., Huett, A., Xavier, R.J., and Darfeuille-Michaud, A. (2010). Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell. Microbiol.* *12*, 99–113.

Lapaquette, P., Bringer, M.-A., and Darfeuille-Michaud, A. (2012). Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell. Microbiol.* *14*, 791–807.

Lazarou, M., Sliter, D.A., Kane, L.A., Sarraf, S.A., Wang, C., Burman, J.L., Sideris, D.P., Fogel, A.I., and Youle, R.J. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* *524*, 309–314.

Lee, H.K., Lund, J.M., Ramanathan, B., Mizushima, N., and Iwasaki, A. (2007a). Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* *315*, 1398–1401.

Lee, H.K., Mattei, L.M., Steinberg, B.E., Alberts, P., Lee, Y.H., Chervonsky, A., Mizushima, N., Grinstein, S., and Iwasaki, A. (2010a). In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. *Immunity* *32*, 227–239.

Lee, H.-M., Shin, D.-M., Yuk, J.-M., Shi, G., Choi, D.-K., Lee, S.-H., Huang, S.M., Kim, J.-M., Kim, C.D., Lee, J.-H., et al. (2011). Autophagy negatively regulates keratinocyte inflammatory responses via scaffolding protein p62/SQSTM1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 1248–1258.

Lee, J.-A., Beigneux, A., Ahmad, S.T., Young, S.G., and Gao, F.-B. (2007b). ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr. Biol. CB* *17*, 1561–1567.

Lee, J.-Y., Koga, H., Kawaguchi, Y., Tang, W., Wong, E., Gao, Y.-S., Pandey, U.B., Kaushik, S., Tresse, E., Lu, J., et al. (2010b). HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J.* *29*, 969–980.

- Legakis, J.E., Koepke, J.I., Jedeszko, C., Barlaskar, F., Terlecky, L.J., Edwards, H.J., Walton, P.A., and Terlecky, S.R. (2002). Peroxisome senescence in human fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* *13*, 4243–4255.
- Lei, Y., Wen, H., Yu, Y., Taxman, D.J., Zhang, L., Widman, D.G., Swanson, K.V., Wen, K.-W., Damania, B., Moore, C.B., et al. (2012). The mitochondrial proteins NLRX1 and TUFM form a complex that regulates type I interferon and autophagy. *Immunity* *36*, 933–946.
- Lemon, K., de Vries, R.D., Mesman, A.W., McQuaid, S., van Amerongen, G., Yüksel, S., Ludlow, M., Rennick, L.J., Kuiken, T., Rima, B.K., et al. (2011). Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates. *PLoS Pathog.* *7*, e1001263.
- Levine, B. (2005). Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* *120*, 159–162.
- Li, J., Liu, Y., Wang, Z., Liu, K., Wang, Y., Liu, J., Ding, H., and Yuan, Z. (2011a). Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment. *J. Virol.* *85*, 6319–6333.
- Li, K., Feito, M.J., Sacks, S.H., and Sheerin, N.S. (2006). CD46 (membrane cofactor protein) acts as a human epithelial cell receptor for internalization of opsonized uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 2543–2551.
- Li, M., Hou, Y., Wang, J., Chen, X., Shao, Z.-M., and Yin, X.-M. (2011b). Kinetics comparisons of mammalian Atg4 homologues indicate selective preferences toward diverse Atg8 substrates. *J. Biol. Chem.* *286*, 7327–7338.
- Li, P., Du, Q., Cao, Z., Guo, Z., Evankovich, J., Yan, W., Chang, Y., Shao, L., Stolz, D.B., Tsung, A., et al. (2012a). Interferon- γ induces autophagy with growth inhibition and cell death in human hepatocellular carcinoma (HCC) cells through interferon-regulatory factor-1 (IRF-1). *Cancer Lett.* *314*, 213–222.
- Li, W., Li, J., and Bao, J. (2012b). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *69*, 1125–1136.
- Li, Y., Sassano, A., Majchrzak, B., Deb, D.K., Levy, D.E., Gaestel, M., Nebreda, A.R., Fish, E.N., and Platanias, L.C. (2004). Role of p38 α Map kinase in Type I interferon signaling. *J. Biol. Chem.* *279*, 970–979.
- Lichtner, M., Marañón, C., Vidalain, P.-O., Azocar, O., Hanau, D., Lebon, P., Burgard, M., Rouzioux, C., Vullo, V., Yagita, H., et al. (2004). HIV type 1-infected dendritic cells induce apoptotic death in infected and uninfected primary CD4 T lymphocytes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *20*, 175–182.
- Liljeroos, L., Huiskonen, J.T., Ora, A., Susi, P., and Butcher, S.J. (2011). Electron cryotomography of measles virus reveals how matrix protein coats the ribonucleocapsid within intact virions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 18085–18090.
- Lim, Y.-M., Lim, H., Hur, K.Y., Quan, W., Lee, H.-Y., Cheon, H., Ryu, D., Koo, S.-H., Kim, H.L., Kim, J., et al. (2014). Systemic autophagy insufficiency compromises adaptation to metabolic stress and facilitates progression from obesity to diabetes. *Nat. Commun.* *5*, 4934.
- Lipatova, Z., and Segev, N. (2015). A Role for Macro-ER-Phagy in ER Quality Control. *PLoS Genet.* *11*, e1005390.

- Lipatova, Z., Shah, A.H., Kim, J.J., Mulholland, J.W., and Segev, N. (2013). Regulation of ER-phagy by a Ypt/Rab GTPase module. *Mol. Biol. Cell* *24*, 3133–3144.
- Liston, P., and Briedis, D.J. (1994). Measles virus V protein binds zinc. *Virology* *198*, 399–404.
- Liszewski, M.K., Post, T.W., and Atkinson, J.P. (1991). Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu. Rev. Immunol.* *9*, 431–455.
- Liszewski, M.K., Farries, T.C., Lublin, D.M., Rooney, I.A., and Atkinson, J.P. (1996). Control of the complement system. *Adv. Immunol.* *61*, 201–283.
- Liu, K., and Czaja, M.J. (2013). Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell Death Differ.* *20*, 3–11.
- Liu, L., Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, Q., Song, P., Ma, Q., Zhu, C., Wang, R., Qi, W., et al. (2012). Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* *14*, 177–185.
- Longhi, S., Receveur-Bréchet, V., Karlin, D., Johansson, K., Darbon, H., Bhella, D., Yeo, R., Finet, S., and Canard, B. (2003). The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein. *J. Biol. Chem.* *278*, 18638–18648.
- Lopez, M., Cocchi, F., Menotti, L., Avitabile, E., Dubreuil, P., and Campadelli-Fiume, G. (2000). Nectin2alpha (PRR2alpha or HveB) and nectin2delta are low-efficiency mediators for entry of herpes simplex virus mutants carrying the Leu25Pro substitution in glycoprotein D. *J. Virol.* *74*, 1267–1274.
- Lu, L.L., Puri, M., Horvath, C.M., and Sen, G.C. (2008). Select paramyxoviral V proteins inhibit IRF3 activation by acting as alternative substrates for inhibitor of kappaB kinase epsilon (IKKe)/TBK1. *J. Biol. Chem.* *283*, 14269–14276.
- Lund, G.A., Tyrrell, D.L., Bradley, R.D., and Scraba, D.G. (1984). The molecular length of measles virus RNA and the structural organization of measles nucleocapsids. *J. Gen. Virol.* *65 (Pt 9)*, 1535–1542.
- Luo, M.X.M., Wong, S.H., Chan, M.T.V., Yu, L., Yu, S.S.B., Wu, F., Xiao, Z., Wang, X., Zhang, L., Cheng, A.S.L., et al. (2015). Autophagy Mediates HBx-Induced Nuclear Factor- κ B Activation and Release of IL-6, IL-8, and CXCL2 in Hepatocytes. *J. Cell. Physiol.* *230*, 2382–2389.
- Lussignol, M., Queval, C., Bernet-Camard, M.-F., Cotte-Laffitte, J., Beau, I., Codogno, P., and Esclatine, A. (2013). The herpes simplex virus 1 Us11 protein inhibits autophagy through its interaction with the protein kinase PKR. *J. Virol.* *87*, 859–871.
- Maisner, A., Klenk, H., and Herrler, G. (1998). Polarized budding of measles virus is not determined by viral surface glycoproteins. *J. Virol.* *72*, 5276–5278.
- Maisner, A., Mrkic, B., Herrler, G., Moll, M., Billeter, M.A., Cattaneo, R., and Klenk, H.D. (2000). Recombinant measles virus requiring an exogenous protease for activation of infectivity. *J. Gen. Virol.* *81*, 441–449.
- Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.-C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., et al. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* *26*, 2527–2539.

- Majcher, V., Goode, A., James, V., and Layfield, R. (2015). Autophagy receptor defects and ALS-FTLD. *Mol. Cell. Neurosci.* *66*, 43–52.
- Mancias, J.D., Wang, X., Gygi, S.P., Harper, J.W., and Kimmelman, A.C. (2014). Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature* *509*, 105–109.
- Manié, S.N., de Breyne, S., Debreyne, S., Vincent, S., and Gerlier, D. (2000). Measles virus structural components are enriched into lipid raft microdomains: a potential cellular location for virus assembly. *J. Virol.* *74*, 305–311.
- Manjithaya, R., Nazarko, T.Y., Farré, J.-C., and Subramani, S. (2010). Molecular mechanism and physiological role of pexophagy. *FEBS Lett.* *584*, 1367–1373.
- Marie, J.C., Astier, A.L., Rivallier, P., Rabourdin-Combe, C., Wild, T.F., and Horvat, B. (2002). Linking innate and acquired immunity: divergent role of CD46 cytoplasmic domains in T cell induced inflammation. *Nat. Immunol.* *3*, 659–666.
- Martinez, J., Malireddi, R.K.S., Lu, Q., Cunha, L.D., Pelletier, S., Gingras, S., Orchard, R., Guan, J.-L., Tan, H., Peng, J., et al. (2015). Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nat. Cell Biol.* *17*, 893–906.
- Mateo, R., Nagamine, C.M., Spagnolo, J., Méndez, E., Rahe, M., Gale, M., Yuan, J., and Kirkegaard, K. (2013). Inhibition of cellular autophagy deranges dengue virion maturation. *J. Virol.* *87*, 1312–1321.
- Matsui, Y., Takagi, H., Qu, X., Abdellatif, M., Sakoda, H., Asano, T., Levine, B., and Sadoshima, J. (2007). Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ. Res.* *100*, 914–922.
- Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., et al. (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat. Cell Biol.* *11*, 385–396.
- Matsunaga, K., Morita, E., Saitoh, T., Akira, S., Ktistakis, N.T., Izumi, T., Noda, T., and Yoshimori, T. (2010). Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J. Cell Biol.* *190*, 511–521.
- Matsuzawa, T., Kim, B.-H., Shenoy, A.R., Kamitani, S., Miyake, M., and Macmicking, J.D. (2012). IFN- γ elicits macrophage autophagy via the p38 MAPK signaling pathway. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *189*, 813–818.
- Maurer, K., Krey, T., Moennig, V., Thiel, H.-J., and Rüménapf, T. (2004). CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* *78*, 1792–1799.
- Maurer, K., Reyes-Robles, T., Alonzo, F., Durbin, J., Torres, V.J., and Cadwell, K. (2015). Autophagy mediates tolerance to *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Cell Host Microbe* *17*, 429–440.
- McAlpine, F., Williamson, L.E., Tooze, S.A., and Chan, E.Y.W. (2013). Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. *Autophagy* *9*, 361–373.
- McChesney, M.B., Miller, C.J., Rota, P.A., Zhu, Y.D., Antipa, L., Lerche, N.W., Ahmed, R., and Bellini, W.J. (1997). Experimental measles. I. Pathogenesis in the normal and the immunized host. *Virology* *233*, 74–84.

- McEwan, D.G., Popovic, D., Gubas, A., Terawaki, S., Suzuki, H., Stadel, D., Coxon, F.P., Miranda de Stegmann, D., Bhogaraju, S., Maddi, K., et al. (2015). PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Mol. Cell* 57, 39–54.
- Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., and Codogno, P. (2010). Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res.* 20, 748–762.
- Meiffren, G., Flacher, M., Azocar, O., Rabourdin-Combe, C., and Faure, M. (2006). Cutting edge: abortive proliferation of CD46-induced Tr1-like cells due to a defective Akt/Survivin signaling pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 4957–4961.
- Meiffren, G., Joubert, P.-E., Grégoire, I.P., Codogno, P., Rabourdin-Combe, C., and Faure, M. (2010). Pathogen recognition by the cell surface receptor CD46 induces autophagy. *Autophagy* 6, 299–300.
- Meley, D., Bauvy, C., Houben-Weerts, J.H.P.M., Dubbelhuis, P.F., Helmond, M.T.J., Codogno, P., and Meijer, A.J. (2006). AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *J. Biol. Chem.* 281, 34870–34879.
- Mendelsohn, C.L., Wimmer, E., and Racaniello, V.R. (1989). Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* 56, 855–865.
- Meng, W., and Takeichi, M. (2009). Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a002899.
- Mercer, C.A., Kaliappan, A., and Dennis, P.B. (2009). A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy* 5, 649–662.
- Mestre, M.B., Fader, C.M., Sola, C., and Colombo, M.I. (2010). Alpha-hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus*-infected cells. *Autophagy* 6, 110–125.
- Mimouna, S., Bazin, M., Mograbi, B., Darfeuille-Michaud, A., Brest, P., Hofman, P., and Vouret-Craviari, V. (2014). HIF1A regulates xenophagic degradation of adherent and invasive *Escherichia coli* (AIEC). *Autophagy* 10, 2333–2345.
- Mochida, K., Oikawa, Y., Kimura, Y., Kirisako, H., Hirano, H., Ohsumi, Y., and Nakatogawa, H. (2015). Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature* 522, 359–362.
- Moll, M., Pfeuffer, J., Klenk, H.-D., Niewiesk, S., and Maisner, A. (2004). Polarized glycoprotein targeting affects the spread of measles virus in vitro and in vivo. *J. Gen. Virol.* 85, 1019–1027.
- Monastyrska, I., Rieter, E., Klionsky, D.J., and Reggiori, F. (2009). Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 84, 431–448.
- Moreau, K., Ravikumar, B., Renna, M., Puri, C., and Rubinsztein, D.C. (2011). Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion. *Cell* 146, 303–317.
- Morris, S., Swanson, M.S., Lieberman, A., Reed, M., Yue, Z., Lindell, D.M., and Lukacs, N.W. (2011). Autophagy-mediated dendritic cell activation is essential for innate cytokine production and APC function with respiratory syncytial virus responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 3953–3961.

- Morriswood, B., Ryzhakov, G., Puri, C., Arden, S.D., Roberts, R., Dendrou, C., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2007). T6BP and NDP52 are myosin VI binding partners with potential roles in cytokine signalling and cell adhesion. *J. Cell Sci.* *120*, 2574–2585.
- Mortensen, M., Soilleux, E.J., Djordjevic, G., Tripp, R., Lutteropp, M., Sadighi-Akha, E., Stranks, A.J., Glanville, J., Knight, S., Jacobsen, S.-E.W., et al. (2011). The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J. Exp. Med.* *208*, 455–467.
- Moss, W.J., and Griffin, D.E. (2012). Measles. *The Lancet* *379*, 153–164.
- Mühlebach, M.D., Mateo, M., Sinn, P.L., Prüfer, S., Uhlig, K.M., Leonard, V.H.J., Navaratnarajah, C.K., Frenzke, M., Wong, X.X., Sawatzky, B., et al. (2011). Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* *480*, 530–533.
- von Muhlinen, N., Akutsu, M., Ravenhill, B.J., Foeglein, Á., Bloor, S., Rutherford, T.J., Freund, S.M.V., Komander, D., and Randow, F. (2012). LC3C, bound selectively by a noncanonical LIR motif in NDP52, is required for antibacterial autophagy. *Mol. Cell* *48*, 329–342.
- Münz, C. (2009). Enhancing immunity through autophagy. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 423–449.
- Naim, H.Y., Ehler, E., and Billeter, M.A. (2000). Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells. *EMBO J.* *19*, 3576–3585.
- Nair, U., Jotwani, A., Geng, J., Gammoh, N., Richerson, D., Yen, W.-L., Griffith, J., Nag, S., Wang, K., Moss, T., et al. (2011). SNARE proteins are required for macroautophagy. *Cell* *146*, 290–302.
- Nair, U., Yen, W.-L., Mari, M., Cao, Y., Xie, Z., Baba, M., Reggiori, F., and Klionsky, D.J. (2012). A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis. *Autophagy* *8*, 780–793.
- Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., et al. (2004). Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* *306*, 1037–1040.
- Nakashima, A., Tanaka, N., Tamai, K., Kyuuma, M., Ishikawa, Y., Sato, H., Yoshimori, T., Saito, S., and Sugamura, K. (2006). Survival of parvovirus B19-infected cells by cellular autophagy. *Virology* *349*, 254–263.
- Nakatsu, Y., Takeda, M., Ohno, S., Koga, R., and Yanagi, Y. (2006). Translational inhibition and increased interferon induction in cells infected with C protein-deficient measles virus. *J. Virol.* *80*, 11861–11867.
- Nakatsu, Y., Takeda, M., Ohno, S., Shirogane, Y., Iwasaki, M., and Yanagi, Y. (2008). Measles Virus Circumvents the Host Interferon Response by Different Actions of the C and V Proteins. *J. Virol.* *82*, 8296–8306.
- Nakatsu, Y., Ma, X., Seki, F., Suzuki, T., Iwasaki, M., Yanagi, Y., Komase, K., and Takeda, M. (2013). Intracellular transport of the measles virus ribonucleoprotein complex is mediated by Rab11A-positive recycling endosomes and drives virus release from the apical membrane of polarized epithelial cells. *J. Virol.* *87*, 4683–4693.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., and Youle, R.J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* *183*, 795–803.

- Nath, S., Dancourt, J., Shteyn, V., Puente, G., Fong, W.M., Nag, S., Bewersdorf, J., Yamamoto, A., Antonny, B., and Melia, T.J. (2014). Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3. *Nat. Cell Biol.* *16*, 415–424.
- Navaratnarajah, C.K., Oezguen, N., Rupp, L., Kay, L., Leonard, V.H.J., Braun, W., and Cattaneo, R. (2011). The heads of the measles virus attachment protein move to transmit the fusion-triggering signal. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 128–134.
- Naydenov, N.G., Harris, G., Morales, V., and Ivanov, A.I. (2012). Loss of a membrane trafficking protein α SNAP induces non-canonical autophagy in human epithelia. *Cell Cycle Georget. Tex* *11*, 4613–4625.
- Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., Mizushima, N., and Klein, L. (2008). Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* *455*, 396–400.
- Neff, N.T., Bourret, L., Miao, P., and Dice, J.F. (1981). Degradation of proteins microinjected into IMR-90 human diploid fibroblasts. *J. Cell Biol.* *91*, 184–194.
- Netea-Maier, R.T., Plantinga, T.S., Van De Veerdonk, F.L., Smit, J.W., and Netea, M.G. (2015). Modulation of inflammation by autophagy: consequences for human disease. *Autophagy* *0*.
- Newman, A.C., Scholefield, C.L., Kemp, A.J., Newman, M., McIver, E.G., Kamal, A., and Wilkinson, S. (2012). TBK1 kinase addiction in lung cancer cells is mediated via autophagy of Tax1bp1/Ndp52 and non-canonical NF- κ B signalling. *PloS One* *7*, e50672.
- Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Behrends, U., Jaffee, E.M., Pardoll, D.M., Bornkamm, G.W., and Mautner, J. (2003). Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur. J. Immunol.* *33*, 1250–1259.
- Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2009). Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* *461*, 654–658.
- Nishie, T., and Nagata, K. (2015). Measles virus C protein facilitates transcription by the control of N protein-viral genomic RNA interaction in early phases of infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *463*, 1262–1266.
- Nishimura, T., Kaizuka, T., Cadwell, K., Sahani, M.H., Saitoh, T., Akira, S., Virgin, H.W., and Mizushima, N. (2013). FIP200 regulates targeting of Atg16L1 to the isolation membrane. *EMBO Rep.* *14*, 284–291.
- Niso-Santano, M., Malik, S.A., Pietrocola, F., Bravo-San Pedro, J.M., Mariño, G., Cianfanelli, V., Ben-Younès, A., Troncoso, R., Markaki, M., Sica, V., et al. (2015). Unsaturated fatty acids induce non-canonical autophagy. *EMBO J.* *34*, 1025–1041.
- Nivon, M., Richet, E., Codogno, P., Arrigo, A.-P., and Kretz-Remy, C. (2009). Autophagy activation by NF κ B is essential for cell survival after heat shock. *Autophagy* *5*, 766–783.
- Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D.G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., Rogov, V., Löhr, F., Popovic, D., Occhipinti, A., et al. (2010). Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep.* *11*, 45–51.

- Noyce, R.S., Bondre, D.G., Ha, M.N., Lin, L.-T., Sisson, G., Tsao, M.-S., and Richardson, C.D. (2011). Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog.* *7*, e1002240.
- Nozawa, T., Aikawa, C., Goda, A., Maruyama, F., Hamada, S., and Nakagawa, I. (2012). The small GTPases Rab9A and Rab23 function at distinct steps in autophagy during Group A Streptococcus infection. *Cell. Microbiol.* *14*, 1149–1165.
- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., and Sasakawa, C. (2005). Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science* *307*, 727–731.
- Okada, N., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P., and Caparon, M. (1995). Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 2489–2493.
- Oliaro, J., Pasam, A., Waterhouse, N.J., Browne, K.A., Ludford-Menting, M.J., Trapani, J.A., and Russell, S.M. (2006). Ligation of the cell surface receptor, CD46, alters T cell polarity and response to antigen presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 18685–18690.
- Orsi, A., Razi, M., Dooley, H.C., Robinson, D., Weston, A.E., Collinson, L.M., and Tooze, S.A. (2012). Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* *23*, 1860–1873.
- Orvedahl, A., Alexander, D., Tallóczy, Z., Sun, Q., Wei, Y., Zhang, W., Burns, D., Leib, D.A., and Levine, B. (2007). HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* *1*, 23–35.
- Orvedahl, A., MacPherson, S., Sumpter, R., Tallóczy, Z., Zou, Z., and Levine, B. (2010). Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host Microbe* *7*, 115–127.
- Palgen, J.-L., Jurgens, E.M., Moscona, A., Porotto, M., and Palermo, L.M. (2015). Unity in diversity: shared mechanism of entry among paramyxoviruses. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *129*, 1–32.
- Palosaari, H., Parisien, J.-P., Rodriguez, J.J., Ulane, C.M., and Horvath, C.M. (2003). STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J. Virol.* *77*, 7635–7644.
- Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T., and Münz, C. (2005). Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* *307*, 593–596.
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* *282*, 24131–24145.
- Pankiv, S., Alemu, E.A., Brech, A., Bruun, J.-A., Lamark, T., Overvatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2010). FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J. Cell Biol.* *188*, 253–269.
- Panyasrivanit, M., Khakpoor, A., Wikan, N., and Smith, D.R. (2009). Co-localization of constituents of the dengue virus translation and replication machinery with amphisomes. *J. Gen. Virol.* *90*, 448–456.

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927–939.

Peeples, M.E. (1991). Paramyxovirus M Proteins. In *The Paramyxoviruses*, D.W. Kingsbury, ed. (Springer US), pp. 427–456.

Pengo, N., Scolari, M., Oliva, L., Milan, E., Mainoldi, F., Raimondi, A., Fagioli, C., Merlini, A., Mariani, E., Pasqualetto, E., et al. (2013). Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production. *Nat. Immunol.* 14, 298–305.

Petkova, D.S., Viret, C., and Faure, M. (2012). IRGM in autophagy and viral infections. *Front. Immunol.* 3, 426.

Pfaller, C.K., Radeke, M.J., Cattaneo, R., and Samuel, C.E. (2014). Measles virus C protein impairs production of defective copyback double-stranded viral RNA and activation of protein kinase R. *J. Virol.* 88, 456–468.

Pirquet, C. (1908). Verhalten der kutanen Tuberkulin-Reaktion während der Masern. *Dtsch. Med. Wochenschr. - DEUT MED WOCHENSCHR* 34, 1297–1300.

Plempner, R.K., Hammond, A.L., Gerlier, D., Fielding, A.K., and Cattaneo, R. (2002). Strength of envelope protein interaction modulates cytopathicity of measles virus. *J. Virol.* 76, 5051–5061.

Plumet, S., Duprex, W.P., and Gerlier, D. (2005). Dynamics of viral RNA synthesis during measles virus infection. *J. Virol.* 79, 6900–6908.

Poch, O., Blumberg, B.M., Bougueleret, L., and Tordo, N. (1990). Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J. Gen. Virol.* 71 (Pt 5), 1153–1162.

Pohl, C., Duprex, W.P., Krohne, G., Rima, B.K., and Schneider-Schaulies, S. (2007). Measles virus M and F proteins associate with detergent-resistant membrane fractions and promote formation of virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 88, 1243–1250.

Polson, H.E.J., de Lartigue, J., Rigden, D.J., Reedijk, M., Urbé, S., Clague, M.J., and Tooze, S.A. (2010). Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* 6, 506–522.

Ponpuak, M., Davis, A.S., Roberts, E.A., Delgado, M.A., Dinkins, C., Zhao, Z., Virgin, H.W., Kyei, G.B., Johansen, T., Vergne, I., et al. (2010). Delivery of cytosolic components by autophagic adaptor protein p62 endows autophagosomes with unique antimicrobial properties. *Immunity* 32, 329–341.

Ponpuak, M., Mandell, M.A., Kimura, T., Chauhan, S., Cleyrat, C., and Deretic, V. (2015). Secretory autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 35, 106–116.

Proikas-Cezanne, T., Waddell, S., Gaugel, A., Frickey, T., Lupas, A., and Nordheim, A. (2004). WIPI-1alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy. *Oncogene* 23, 9314–9325.

Proikas-Cezanne, T., Ruckerbauer, S., Stierhof, Y.-D., Berg, C., and Nordheim, A. (2007). Human WIPI-1 puncta-formation: a novel assay to assess mammalian autophagy. *FEBS Lett.* 581, 3396–3404.

- Pua, H.H., Guo, J., Komatsu, M., and He, Y.-W. (2009). Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 4046–4055.
- Punnonen, J., Cocks, B.G., Carballido, J.M., Bennett, B., Peterson, D., Aversa, G., and de Vries, J.E. (1997). Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J. Exp. Med.* *185*, 993–1004.
- Purcell, D.F., Russell, S.M., Deacon, N.J., Brown, M.A., Hooker, D.J., and McKenzie, I.F. (1991). Alternatively spliced RNAs encode several isoforms of CD46 (MCP), a regulator of complement activation. *Immunogenetics* *33*, 335–344.
- Radecke, F., and Billeter, M.A. (1996). The nonstructural C protein is not essential for multiplication of Edmonston B strain measles virus in cultured cells. *Virology* *217*, 418–421.
- Randall, R.E., and Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* *89*, 1–47.
- Ravel, K., Castelle, C., Defrance, T., Wild, T.F., Charron, D., Lotteau, V., and Roubourdin-Combe, C. (1997). Measles virus nucleocapsid protein binds to FcγRII and inhibits human B cell antibody production. *J. Exp. Med.* *186*, 269–278.
- Ravikumar, B., Acevedo-Arozena, A., Imarisio, S., Berger, Z., Vacher, C., O’Kane, C.J., Brown, S.D.M., and Rubinsztein, D.C. (2005). Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat. Genet.* *37*, 771–776.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., et al. (2010a). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* *90*, 1383–1435.
- Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., and Rubinsztein, D.C. (2010b). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.* *12*, 747–757.
- Ravindran, R., Khan, N., Nakaya, H.I., Li, S., Loebbermann, J., Maddur, M.S., Park, Y., Jones, D.P., Chappert, P., Davoust, J., et al. (2014). Vaccine activation of the nutrient sensor GCN2 in dendritic cells enhances antigen presentation. *Science* *343*, 313–317.
- Reymond, N., Fabre, S., Lecocq, E., Adelaïde, J., Dubreuil, P., and Lopez, M. (2001). Nectin4/PRR4, a new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction. *J. Biol. Chem.* *276*, 43205–43215.
- Richetta, C. (2013). Etude du rôle de l'autophagie dans l'infection par le virus de la rougeole : mécanismes d'induction et conséquences sur le cycle viral. phdthesis. Université Claude Bernard - Lyon I. Français. <NNT : 2013LYO10151>. <tel-01045022>.
- Richetta, C., Grégoire, I.P., Verlhac, P., Azocar, O., Baguet, J., Flacher, M., Tangy, F., Roubourdin-Combe, C., and Faure, M. (2013). Sustained autophagy contributes to measles virus infectivity. *PLoS Pathog.* *9*, e1003599.
- Riedl, P., Moll, M., Klenk, H.-D., and Maisner, A. (2002). Measles virus matrix protein is not cotransported with the viral glycoproteins but requires virus infection for efficient surface targeting. *Virus Res.* *83*, 1–12.

- Rivailler, P., Trescol-Biémont, M.C., Gimenez, C., Rabourdin-Combe, C., and Horvat, B. (1998). Enhanced MHC class II-restricted presentation of measles virus (MV) hemagglutinin in transgenic mice expressing human MV receptor CD46. *Eur. J. Immunol.* *28*, 1301–1314.
- Robinson, S.M., Tsueng, G., Sin, J., Mangale, V., Rahawi, S., McIntyre, L.L., Williams, W., Kha, N., Cruz, C., Hancock, B.M., et al. (2014). Coxsackievirus B exits the host cell in shed microvesicles displaying autophagosomal markers. *PLoS Pathog.* *10*, e1004045.
- Rodriguez-Navarro, J.A., Kaushik, S., Koga, H., Dall’Armi, C., Shui, G., Wenk, M.R., Di Paolo, G., and Cuervo, A.M. (2012). Inhibitory effect of dietary lipids on chaperone-mediated autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E705–E714.
- Rogov, V.V., Suzuki, H., Fiskin, E., Wild, P., Kniss, A., Rozenknop, A., Kato, R., Kawasaki, M., McEwan, D.G., Löhr, F., et al. (2013). Structural basis for phosphorylation-triggered autophagic clearance of Salmonella. *Biochem. J.* *454*, 459–466.
- Roos, R.P., Graves, M.C., Wollmann, R.L., Chilcote, R.R., and Nixon, J. (1981). Immunologic and virologic studies of measles inclusion body encephalitis in an immunosuppressed host: the relationship to subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology* *31*, 1263–1270.
- Ruland, J. (2011). Return to homeostasis: downregulation of NF- κ B responses. *Nat. Immunol.* *12*, 709–714.
- Runkler, N., Pohl, C., Schneider-Schaulies, S., Klenk, H.-D., and Maisner, A. (2007). Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein. *Cell. Microbiol.* *9*, 1203–1214.
- Ryon, J.J., Moss, W.J., Monze, M., and Griffin, D.E. (2002). Functional and phenotypic changes in circulating lymphocytes from hospitalized zambian children with measles. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* *9*, 994–1003.
- Sagnier, S., Daussy, C.F., Borel, S., Robert-Hebmann, V., Faure, M., Blanchet, F.P., Beaumelle, B., Biard-Piechaczyk, M., and Espert, L. (2015). Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* *89*, 615–625.
- Sahlender, D.A., Roberts, R.C., Arden, S.D., Spudich, G., Taylor, M.J., Luzio, J.P., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2005). Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J. Cell Biol.* *169*, 285–295.
- Saitoh, T., Fujita, N., Hayashi, T., Takahara, K., Satoh, T., Lee, H., Matsunaga, K., Kageyama, S., Omori, H., Noda, T., et al. (2009). Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 20842–20846.
- Sakurai, A., Maruyama, F., Funao, J., Nozawa, T., Aikawa, C., Okahashi, N., Shintani, S., Hamada, S., Ooshima, T., and Nakagawa, I. (2010). Specific behavior of intracellular *Streptococcus pyogenes* that has undergone autophagic degradation is associated with bacterial streptolysin O and host small G proteins Rab5 and Rab7. *J. Biol. Chem.* *285*, 22666–22675.
- Saleiro, D., Mehrotra, S., Kroczyńska, B., Beauchamp, E.M., Lisowski, P., Majchrzak-Kita, B., Bhagat, T.D., Stein, B.L., McMahon, B., Altman, J.K., et al. (2015). Central role of ULK1 in type I interferon signaling. *Cell Rep.* *11*, 605–617.

- Salvador, N., Aguado, C., Horst, M., and Knecht, E. (2000). Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J. Biol. Chem.* *275*, 27447–27456.
- Sanjuan, M.A., Dillon, C.P., Tait, S.W.G., Moshiah, S., Dorsey, F., Connell, S., Komatsu, M., Tanaka, K., Cleveland, J.L., Withoff, S., et al. (2007). Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* *450*, 1253–1257.
- Santoro, F., Kennedy, P.E., Locatelli, G., Malnati, M.S., Berger, E.A., and Lusso, P. (1999). CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* *99*, 817–827.
- Scarlatti, F., Maffei, R., Beau, I., Codogno, P., and Ghidoni, R. (2008). Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ.* *15*, 1318–1329.
- Schmid, D., Pypaert, M., and Münz, C. (2007). Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* *26*, 79–92.
- Schneider, H., Kaelin, K., and Billeter, M.A. (1997). Recombinant measles viruses defective for RNA editing and V protein synthesis are viable in cultured cells. *Virology* *227*, 314–322.
- Schuhmann, K.M., Pfaller, C.K., and Conzelmann, K.-K. (2011). The measles virus V protein binds to p65 (RelA) to suppress NF-kappaB activity. *J. Virol.* *85*, 3162–3171.
- Schulze, R.J., Weller, S.G., Schroeder, B., Krueger, E.W., Chi, S., Casey, C.A., and McNiven, M.A. (2013). Lipid droplet breakdown requires dynamin 2 for vesiculation of autolysosomal tubules in hepatocytes. *J. Cell Biol.* *203*, 315–326.
- Schwartzberg, P.L., Mueller, K.L., Qi, H., and Cannons, J.L. (2009). SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 39–46.
- Severa, M., Giacomini, E., Gafa, V., Anastasiadou, E., Rizzo, F., Corazzari, M., Romagnoli, A., Trivedi, P., Fimia, G.M., and Coccia, E.M. (2013). EBV stimulates TLR- and autophagy-dependent pathways and impairs maturation in plasmacytoid dendritic cells: implications for viral immune escape. *Eur. J. Immunol.* *43*, 147–158.
- Shaffer, J.A., Bellini, W.J., and Rota, P.A. (2003). The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology* *315*, 389–397.
- Shang, L., Chen, S., Du, F., Li, S., Zhao, L., and Wang, X. (2011). Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 4788–4793.
- Sharma, M., Bhattacharyya, S., Nain, M., Kaur, M., Sood, V., Gupta, V., Khansa, R., Abdin, M.Z., Vrati, S., and Kalia, M. (2014). Japanese encephalitis virus replication is negatively regulated by autophagy and occurs on LC3-I- and EDEM1-containing membranes. *Autophagy* *10*, 1637–1651.
- Shembade, N., Pujari, R., Harhaj, N.S., Abbott, D.W., and Harhaj, E.W. (2011). The kinase IKK α inhibits activation of the transcription factor NF- κ B by phosphorylating the regulatory molecule TAX1BP1. *Nat. Immunol.* *12*, 834–843.

- Shi, C.-S., and Kehrl, J.H. (2008). MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *J. Biol. Chem.* *283*, 33175–33182.
- Shi, J., and Luo, H. (2012). Interplay between the cellular autophagy machinery and positive-stranded RNA viruses. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* *44*, 375–384.
- Shi, C.-S., Shenderov, K., Huang, N.-N., Kabat, J., Abu-Asab, M., Fitzgerald, K.A., Sher, A., and Kehrl, J.H. (2012). Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat. Immunol.* *13*, 255–263.
- Shintani, T., Huang, W.-P., Stromhaug, P.E., and Klionsky, D.J. (2002). Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Dev. Cell* *3*, 825–837.
- Shishkova, Y., Harms, H., Krohne, G., Avota, E., and Schneider-Schaulies, S. (2007). Immune synapses formed with measles virus-infected dendritic cells are unstable and fail to sustain T cell activation. *Cell. Microbiol.* *9*, 1974–1986.
- Shu, Y., Habchi, J., Costanzo, S., Padilla, A., Brunel, J., Gerlier, D., Oglesbee, M., and Longhi, S. (2012). Plasticity in structural and functional interactions between the phosphoprotein and nucleoprotein of measles virus. *J. Biol. Chem.* *287*, 11951–11967.
- Siddiqui, M.A., and Malathi, K. (2012). RNase L induces autophagy via c-Jun N-terminal kinase and double-stranded RNA-dependent protein kinase signaling pathways. *J. Biol. Chem.* *287*, 43651–43664.
- Siddiqui, M.A., Mukherjee, S., Manivannan, P., and Malathi, K. (2015). RNase L Cleavage Products Promote Switch from Autophagy to Apoptosis by Caspase-Mediated Cleavage of Beclin-1. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 17611–17636.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* *458*, 1131–1135.
- Singh, S.B., Davis, A.S., Taylor, G.A., and Deretic, V. (2006). Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* *313*, 1438–1441.
- Sinha, S., Colbert, C.L., Becker, N., Wei, Y., and Levine, B. (2008). Molecular basis of the regulation of Beclin 1-dependent autophagy by the gamma-herpesvirus 68 Bcl-2 homolog M11. *Autophagy* *4*, 989–997.
- Sir, D., Liang, C., Chen, W., Jung, J.U., and Ou, J.J. (2008). Perturbation of autophagic pathway by hepatitis C virus. *Autophagy* *4*, 830–831.
- Sir, D., Tian, Y., Chen, W., Ann, D.K., Yen, T.-S.B., and Ou, J.-H.J. (2010). The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 4383–4388.
- Sirena, D., Lilienfeld, B., Eisenhut, M., Kälin, S., Boucke, K., Beerli, R.R., Vogt, L., Ruedl, C., Bachmann, M.F., Greber, U.F., et al. (2004). The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J. Virol.* *78*, 4454–4462.
- Smith, E.C., Smith, S.E., Carter, J.R., Webb, S.R., Gibson, K.M., Hellman, L.M., Fried, M.G., and Dutch, R.E. (2013). Trimeric transmembrane domain interactions in paramyxovirus fusion proteins: roles in protein folding, stability, and function. *J. Biol. Chem.* *288*, 35726–35735.

- Soubannier, V., McLelland, G.-L., Zunino, R., Braschi, E., Rippstein, P., Fon, E.A., and McBride, H.M. (2012a). A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes. *Curr. Biol. CB* *22*, 135–141.
- Soubannier, V., Rippstein, P., Kaufman, B.A., Shoubridge, E.A., and McBride, H.M. (2012b). Reconstitution of mitochondria derived vesicle formation demonstrates selective enrichment of oxidized cargo. *PLoS One* *7*, e52830.
- Strappazzon, F., Nazio, F., Corrado, M., Cianfanelli, V., Romagnoli, A., Fimia, G.M., Campello, S., Nardacci, R., Piacentini, M., Campanella, M., et al. (2015). AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell Death Differ.* *22*, 419–432.
- Sugai, A., Sato, H., Yoneda, M., and Kai, C. (2013). Phosphorylation of measles virus nucleoprotein affects viral growth by changing gene expression and genomic RNA stability. *J. Virol.* *87*, 11684–11692.
- Sun, Q., Fan, W., Chen, K., Ding, X., Chen, S., and Zhong, Q. (2008). Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 19211–19216.
- Suzuki, H., Tabata, K., Morita, E., Kawasaki, M., Kato, R., Dobson, R.C.J., Yoshimori, T., and Wakatsuki, S. (2014). Structural basis of the autophagy-related LC3/Atg13 LIR complex: recognition and interaction mechanism. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *22*, 47–58.
- Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., and Ohsumi, Y. (2007). Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *12*, 209–218.
- Suzuki, K., Akioka, M., Kondo-Kakuta, C., Yamamoto, H., and Ohsumi, Y. (2013). Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* *126*, 2534–2544.
- Swiecki, M., and Colonna, M. (2011). Type I interferons: diversity of sources, production pathways and effects on immune responses. *Curr. Opin. Virol.* *1*, 463–475.
- Szatmári, Z., Kis, V., Lippai, M., Hegedus, K., Faragó, T., Lorincz, P., Tanaka, T., Juhász, G., and Sass, M. (2014). Rab11 facilitates cross-talk between autophagy and endosomal pathway through regulation of Hook localization. *Mol. Biol. Cell* *25*, 522–531.
- Tahara, M., Takeda, M., and Yanagi, Y. (2007). Altered interaction of the matrix protein with the cytoplasmic tail of hemagglutinin modulates measles virus growth by affecting virus assembly and cell-cell fusion. *J. Virol.* *81*, 6827–6836.
- Takeuchi, K., Miyajima, N., Nagata, N., Takeda, M., and Tashiro, M. (2003). Wild-type measles virus induces large syncytium formation in primary human small airway epithelial cells by a SLAM(CD150)-independent mechanism. *Virus Res.* *94*, 11–16.
- Takeuchi, K., Takeda, M., Miyajima, N., Ami, Y., Nagata, N., Suzaki, Y., Shahnewaz, J., Kadota, S.-I., and Nagata, K. (2005). Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques. *J. Virol.* *79*, 7838–7844.
- Tal, M.C., Sasai, M., Lee, H.K., Yordy, B., Shadel, G.S., and Iwasaki, A. (2009). Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 2770–2775.

- Tallóczy, Z., Virgin, H.W., and Levine, B. (2006). PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy* 2, 24–29.
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E.L., Hartmann, D., Lüllmann-Rauch, R., Janssen, P.M., Blanz, J., von Figura, K., and Saftig, P. (2000). Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 406, 902–906.
- Tang, H., Da, L., Mao, Y., Li, Y., Li, D., Xu, Z., Li, F., Wang, Y., Tiollais, P., Li, T., et al. (2009). Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via up-regulation of beclin 1 expression. *Hepatology* 49, 60–71.
- Tangye, S.G., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (2000). The CD2-subset of the Ig superfamily of cell surface molecules: receptor-ligand pairs expressed by NK cells and other immune cells. *Semin. Immunol.* 12, 149–157.
- Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K., and Yanagi, Y. (2000). SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406, 893–897.
- Taylor, M.P., and Kirkegaard, K. (2007). Modification of cellular autophagy protein LC3 by poliovirus. *J. Virol.* 81, 12543–12553.
- Taylor, M.P., Burgon, T.B., Kirkegaard, K., and Jackson, W.T. (2009). Role of microtubules in extracellular release of poliovirus. *J. Virol.* 83, 6599–6609.
- Teckman, J.H., and Perlmutter, D.H. (2000). Retention of mutant alpha(1)-antitrypsin Z in endoplasmic reticulum is associated with an autophagic response. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G961–G974.
- tenOever, B.R., Servant, M.J., Grandvaux, N., Lin, R., and Hiscott, J. (2002). Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *J. Virol.* 76, 3659–3669.
- Theil, D., Farina, C., and Meinel, E. (2005). Differential expression of CD150 (SLAM) on monocytes and macrophages in chronic inflammatory contexts: abundant in Crohn's disease, but not in multiple sclerosis. *J. Clin. Pathol.* 58, 110–111.
- Thurston, T.L.M., Ryzhakov, G., Bloor, S., von Muhlinen, N., and Randow, F. (2009). The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat. Immunol.* 10, 1215–1221.
- Thurston, T.L.M., Wandel, M.P., von Muhlinen, N., Foeglein, A., and Randow, F. (2012). Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* 482, 414–418.
- Tober, C., Seufert, M., Schneider, H., Billeter, M.A., Johnston, I.C., Niewiesk, S., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (1998). Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J. Virol.* 72, 8124–8132.
- Tooze, S.A. (2013). Current views on the source of the autophagosome membrane. *Essays Biochem.* 55, 29–38.
- Toth, A.M., Devaux, P., Cattaneo, R., and Samuel, C.E. (2009). Protein kinase PKR mediates the apoptosis induction and growth restriction phenotypes of C protein-deficient measles virus. *J. Virol.* 83, 961–968.

- Tumbarello, D.A., Waxse, B.J., Arden, S.D., Bright, N.A., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2012). Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nat. Cell Biol.* *14*, 1024–1035.
- Tumbarello, D.A., Manna, P.T., Allen, M., Bycroft, M., Arden, S.D., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2015). The Autophagy Receptor TAX1BP1 and the Molecular Motor Myosin VI Are Required for Clearance of *Salmonella Typhimurium* by Autophagy. *PLoS Pathog.* *11*, e1005174.
- Uhl, M., Kepp, O., Jusforgues-Saklani, H., Vicencio, J.-M., Kroemer, G., and Albert, M.L. (2009). Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8⁺ T cells. *Cell Death Differ.* *16*, 991–1005.
- van der Vaart, A., Griffith, J., and Reggiori, F. (2010). Exit from the Golgi is required for the expansion of the autophagosomal phagophore in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *21*, 2270–2284.
- Valsamakis, A., Schneider, H., Auwaerter, P.G., Kaneshima, H., Billeter, M.A., and Griffin, D.E. (1998). Recombinant measles viruses with mutations in the C, V, or F gene have altered growth phenotypes in vivo. *J. Virol.* *72*, 7754–7761.
- Verlhac, P., Grégoire, I.P., Azocar, O., Petkova, D.S., Baguet, J., Viret, C., and Faure, M. (2015). Autophagy Receptor NDP52 Regulates Pathogen-Containing Autophagosome Maturation. *Cell Host Microbe* *17*, 515–525.
- Vicinanza, M., Korolchuk, V.I., Ashkenazi, A., Puri, C., Menzies, F.M., Clarke, J.H., and Rubinsztein, D.C. (2015). PI(5)P regulates autophagosome biogenesis. *Mol. Cell* *57*, 219–234.
- Vincent, S., Gerlier, D., and Manié, S.N. (2000). Measles virus assembly within membrane rafts. *J. Virol.* *74*, 9911–9915.
- de Vries, R.D., Lemon, K., Ludlow, M., McQuaid, S., Yüksel, S., van Amerongen, G., Rennick, L.J., Rima, B.K., Osterhaus, A.D.M.E., de Swart, R.L., et al. (2010). In vivo tropism of attenuated and pathogenic measles virus expressing green fluorescent protein in macaques. *J. Virol.* *84*, 4714–4724.
- Wakimoto, H., Shimodo, M., Satoh, Y., Kitagawa, Y., Takeuchi, K., Gotoh, B., and Itoh, M. (2013). F-actin modulates measles virus cell-cell fusion and assembly by altering the interaction between the matrix protein and the cytoplasmic tail of hemagglutinin. *J. Virol.* *87*, 1974–1984.
- Wang, H., Sun, H.-Q., Zhu, X., Zhang, L., Albanesi, J., Levine, B., and Yin, H. (2015). GABARAPs regulate PI4P-dependent autophagosome:lysosome fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 7015–7020.
- Wang, J., Kang, R., Huang, H., Xi, X., Wang, B., Wang, J., and Zhao, Z. (2014). Hepatitis C virus core protein activates autophagy through EIF2AK3 and ATF6 UPR pathway-mediated MAP1LC3B and ATG12 expression. *Autophagy* *10*, 766–784.
- Wang, N., Satoskar, A., Faubion, W., Howie, D., Okamoto, S., Feske, S., Gullo, C., Clarke, K., Sosa, M.R., Sharpe, A.H., et al. (2004). The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. *J. Exp. Med.* *199*, 1255–1264.
- Ward, B.J., Johnson, R.T., Vaisberg, A., Jauregui, E., and Griffin, D.E. (1991). Cytokine production in vitro and the lymphoproliferative defect of natural measles virus infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.* *61*, 236–248.

- Warr, M.R., Binnewies, M., Flach, J., Reynaud, D., Garg, T., Malhotra, R., Debnath, J., and Passegué, E. (2013). FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature* *494*, 323–327.
- Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., and Elazar, Z. (2010). LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J.* *29*, 1792–1802.
- Weiergräber, O.H., Stangler, T., Thielmann, Y., Mohrlüder, J., Wiesehan, K., and Willbold, D. (2008). Ligand binding mode of GABAA receptor-associated protein. *J. Mol. Biol.* *381*, 1320–1331.
- Wies, E., Wang, M.K., Maharaj, N.P., Chen, K., Zhou, S., Finberg, R.W., and Gack, M.U. (2013). Dephosphorylation of the RNA sensors RIG-I and MDA5 by the phosphatase PP1 is essential for innate immune signaling. *Immunity* *38*, 437–449.
- Wild, P., Farhan, H., McEwan, D.G., Wagner, S., Rogov, V.V., Brady, N.R., Richter, B., Korac, J., Waidmann, O., Choudhary, C., et al. (2011). Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* *333*, 228–233.
- Wild, T.F., Malvoisin, E., and Buckland, R. (1991). Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J. Gen. Virol.* *72* (Pt 2), 439–442.
- Wildenberg, M.E., Vos, A.C.W., Wolfkamp, S.C.S., Duijvestein, M., Verhaar, A.P., Te Velde, A.A., van den Brink, G.R., and Hommes, D.W. (2012). Autophagy attenuates the adaptive immune response by destabilizing the immunologic synapse. *Gastroenterology* *142*, 1493–1503.e6.
- Witko, S.E., Kotash, C., Sidhu, M.S., Udem, S.A., and Parks, C.L. (2006). Inhibition of measles virus minireplicon-encoded reporter gene expression by V protein. *Virology* *348*, 107–119.
- Wong, Y.C., and Holzbaur, E.L.F. (2014). Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E4439–E4448.
- Wong, J., Zhang, J., Si, X., Gao, G., Mao, I., McManus, B.M., and Luo, H. (2008). Autophagosome Supports Coxsackievirus B3 Replication in Host Cells. *J. Virol.* *82*, 9143–9153.
- Wu, E., Trauger, S.A., Pache, L., Mullen, T.-M., von Seggern, D.J., Siuzdak, G., and Nemerow, G.R. (2004). Membrane cofactor protein is a receptor for adenoviruses associated with epidemic keratoconjunctivitis. *J. Virol.* *78*, 3897–3905.
- Wu, Y., Zhang, Y., Wang, L., Diao, Z., and Liu, W. (2015). The Role of Autophagy in Kidney Inflammatory Injury via the NF-κB Route Induced by LPS. *Int. J. Med. Sci.* *12*, 655–667.
- Xia, M., Gonzalez, P., Li, C., Meng, G., Jiang, A., Wang, H., Gao, Q., Debatin, K.-M., Beltinger, C., and Wei, J. (2014). Mitophagy enhances oncolytic measles virus replication by mitigating DDX58/RIG-I-like receptor signaling. *J. Virol.* *88*, 5152–5164.
- Xie, R., Nguyen, S., McKeehan, K., Wang, F., McKeehan, W.L., and Liu, L. (2011). Microtubule-associated protein 1S (MAP1S) bridges autophagic components with microtubules and mitochondria to affect autophagosomal biogenesis and degradation. *J. Biol. Chem.* *286*, 10367–10377.

- Xu, D., Zhang, T., Xiao, J., Zhu, K., Wei, R., Wu, Z., Meng, H., Li, Y., and Yuan, J. (2015). Modification of BECN1 by ISG15 plays a crucial role in autophagy regulation by type I IFN/interferon. *Autophagy* 11, 617–628.
- Xu, Y., Jagannath, C., Liu, X.-D., Sharafkhaneh, A., Kolodziejska, K.E., and Eissa, N.T. (2007). Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* 27, 135–144.
- Yi, C., Liu, X., Liu, Y., Lu, S., and Qi, Y. (2013). Hemagglutinin protein of measles virus induces apoptosis of HeLa cells via both extrinsic and intrinsic pathways. *Can. J. Microbiol.* 59, 814–824.
- Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Eskelinen, E.-L. (2009). 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* 5, 1180–1185.
- Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2006). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J. Biol. Chem.* 281, 30299–30304.
- Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Yoshida, M., Fukumatsu, M., Kim, M., Mimuro, H., Nakagawa, I., Yanagawa, T., Ishii, T., et al. (2009). *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat. Cell Biol.* 11, 1233–1240.
- Yu, Z.-Q., Ni, T., Hong, B., Wang, H.-Y., Jiang, F.-J., Zou, S., Chen, Y., Zheng, X.-L., Klionsky, D.J., Liang, Y., et al. (2012). Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy* 8, 883–892.
- Zaffran, Y., Destaing, O., Roux, A., Ory, S., Nheu, T., Jurdic, P., Roubourdin-Combe, C., and Astier, A.L. (2001). CD46/CD3 costimulation induces morphological changes of human T cells and activation of Vav, Rac, and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 6780–6785.
- Zhang, X., Bourhis, J.-M., Longhi, S., Carsillo, T., Buccellato, M., Morin, B., Canard, B., and Oglesbee, M. (2005). Hsp72 recognizes a P binding motif in the measles virus N protein C-terminus. *Virology* 337, 162–174.
- Zhao, Z., Fux, B., Goodwin, M., Dunay, I.R., Strong, D., Miller, B.C., Cadwell, K., Delgado, M.A., Ponpuak, M., Green, K.G., et al. (2008). Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens. *Cell Host Microbe* 4, 458–469.
- Zheng, Y.T., Shahnazari, S., Brech, A., Lamark, T., Johansen, T., and Brumell, J.H. (2009). The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 5909–5916.
- Zhong, Y., Wang, Q.J., Li, X., Yan, Y., Backer, J.M., Chait, B.T., Heintz, N., and Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat. Cell Biol.* 11, 468–476.
- Zhou, D., Li, P., Lin, Y., Lott, J.M., Hislop, A.D., Canaday, D.H., Brutkiewicz, R.R., and Blum, J.S. (2005). Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity* 22, 571–581.
- Zhou, D., Kang, K.H., and Spector, S.A. (2012). Production of interferon α by human immunodeficiency virus type 1 in human plasmacytoid dendritic cells is dependent on induction of autophagy. *J. Infect. Dis.* 205, 1258–1267.

- Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221–225.
- Zhou, X., Wang, L., Hasegawa, H., Amin, P., Han, B.-X., Kaneko, S., He, Y., and Wang, F. (2010). Deletion of PIK3C3/Vps34 in sensory neurons causes rapid neurodegeneration by disrupting the endosomal but not the autophagic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 9424–9429.
- Zhu, S., Cao, L., Yu, Y., Yang, L., Yang, M., Liu, K., Huang, J., Kang, R., Livesey, K.M., and Tang, D. (2013a). Inhibiting autophagy potentiates the anticancer activity of IFN1 β /IFN α in chronic myeloid leukemia cells. *Autophagy* 9, 317–327.
- Zhu, Y., Massen, S., Terenzio, M., Lang, V., Chen-Lindner, S., Eils, R., Novak, I., Dikic, I., Hamacher-Brady, A., and Brady, N.R. (2013b). Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis. *J. Biol. Chem.* 288, 1099–1113.
- van Zutphen, T., Todde, V., de Boer, R., Kreim, M., Hofbauer, H.F., Wolinski, H., Veenhuis, M., van der Klei, I.J., and Kohlwein, S.D. (2014). Lipid droplet autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 25, 290–301.

Etude du rôle de récepteurs autophagiques lors de l'infection par le virus de la rougeole

La macroautophagie assure l'homéostasie cellulaire en recyclant du matériel cytosolique obsolète ou délétère et sa dérégulation est associée à plusieurs pathologies. Elle constitue aussi un mécanisme de défense car elle peut éliminer des pathogènes intracellulaires. L'étape cruciale de l'autophagie est la maturation lors de laquelle la vésicule renfermant des substrats cytosoliques, l'autophagosome, fusionne avec des lysosomes et la dégradation a lieu.

Nous nous intéressons à la régulation de l'autophagie et aux conséquences de sa perturbation lors des infections, notamment par le virus de la rougeole (VR). Les données de l'équipe montrent qu'il induit et utilise toutes les étapes de l'autophagie, afin de se répliquer efficacement. Mes travaux montrent que des protéines du virus peuvent interagir avec au moins deux protéines cellulaires NDP52 et T6BP qui sont des récepteurs autophagiques (protéines cytosoliques ayant un domaine de liaison aux autophagosomes et un domaine de liaison au substrat à dégrader, par exemple des pathogènes). J'ai alors étudié le rôle des récepteurs autophagiques T6BP, NDP52 et Optineurine dans la réplication virale. J'ai aussi participé à une étude décrivant que NDP52 et Optineurine régulent en plus la maturation.

Mes travaux de thèse démontrent un tel double rôle pour T6BP. Cependant, seuls T6BP et NDP52 sont nécessaires à la réplication du VR bien qu'elle requiert la maturation autophagique. Ainsi mes résultats suggèrent d'une part que les trois récepteurs puissent réguler la maturation d'autophagosomes distincts. D'autre part, le VR pourrait exploiter individuellement les autophagosomes dont la maturation dépend de T6BP et NDP52 pour se répliquer.

Mots clés : Autophagie, virus de la rougeole, récepteur autophagique, maturation autophagique

Role of autophagy receptors in measles virus replication

Macroautophagy ensures cell homeostasis through the recycling of obsolete or deleterious cytosolic components and its deregulation is associated with several pathologies. It is also a defense mechanism as it allows the elimination of intracellular pathogens. The most important autophagic step is maturation, during which the cytosolic substrate-containing vesicle, the autophagosome, fuses with lysosomes and the degradation occurs.

We study autophagy regulation and the consequences of its disruption during infections and in particular by measles virus (MeV). Our team has shown that MeV induces and exploits all steps of autophagy, to replicate more efficiently. My results indicate that viral proteins can interact with at least two cellular proteins, NDP52 and T6BP, which are autophagy receptors (cytosolic proteins that carry an autophagosome-binding domain and a domain binding substrates that would be degraded, such as intracellular pathogens). I then studied the role of autophagic receptors T6BP, NDP52 and OPTINEURIN in viral replication. I also took part in a study describing NDP52 and OPTINEURIN as autophagosome maturation regulators.

My work depicts the same dual role for T6BP. However, only T6BP and NDP52 are necessary for MeV replication even though it requires autophagosome maturation. Thus, my results suggest that the three autophagy receptors might regulate distinct autophagosome maturation on one hand. On the other, MeV could individually exploit autophagosomes, the maturation of which is regulated by T6BP or NDP2 to replicate efficiently.

Key words: Autophagy, Measles virus, autophagy receptor, autophagy maturation